

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UACPyP del CCH

10
24

**Caracterización funcional del gene c3 de
Drosophila melanogaster.**

**Tesis de posgrado
que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
Presenta:**

M. en C. Enrique Alejandro Reynaud Garza

**Director de tesis:
Dr. Mario Enrique Zurita Ortega.**

Cuernavaca, Mor.

Agosto de 1997.

**TESIS CON
FALIA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

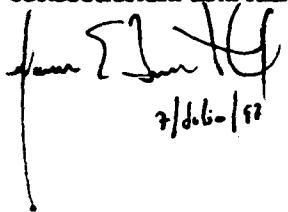
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

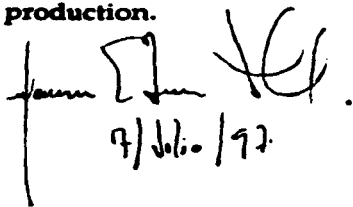
Resumen

En este trabajo, fue aislado y caracterizado el gene c3 de *Drosophila melanogaster* mediante el análisis de su secuencia. La proteína codificada se localizó en embriones y ovarios enteros mediante métodos inmunoquímicos e inmunocitoquímicos. La proteína C3 de *Drosophila* comparte una alta similitud con proteínas homólogas que han sido identificadas en hongos, plantas y animales, sin embargo, no se le ha definido claramente ninguna función. La proteína codificada por c3 es ubicua y se localiza en el citoplasma. Así mismo, se demostró C3 copurifica con la subunidad ribosomal 40s. El gene c3 fue mapeado mediante hibridación *in situ* y se localizó en la sección 101F del cromosoma 4 de *D. melanogaster*. La expresión de un transcrito antisentido de c3 en moscas transgénicas demostró que este gene es esencial para la ovogénesis. El fenotipo más evidente causado por la disminución de c3 es la desaparición de las células foliculares del ovario (donde la concentración de c3 es normalmente alta) y anormalidades en los linajes celulares derivados de la línea germinal que tienen como consecuencia una falla en la producción de huevos.

U.B. 
7/d.6.1/97

Abstract

The *Drosophila melanogaster* homologue of the *Anopheles gambiae* C3 cDNA has been isolated and characterized by sequence analysis. The encoded protein has been localized by immunochemical and immunocytochemical methods. The *Drosophila* C3 protein is highly similar to homologues of disputed function, which have been previously identified in fungi, plants and animals. The protein is ubiquitous and localized in the cytoplasm. Cell fractionation followed by detection with a specific antibody preparation shows that the protein is associated with the 40s ribosomal subunit. The C3 gene is located in section 101F of chromosome 4. Antisense transgenic analysis shows that this gene is essential for oogenesis. The most prominent phenotype of antisense depletion of C3 is disappearance of the follicular cells of the ovary (where the concentration of C3 protein is normally high) and abnormalities of the associated germ line derivatives, leading to failure of egg production.

U.B. .
7/26/92

I.- Prólogo	1
II.- justificación	2
III.- Antecedentes	10
Ovogénesis en dípteros	10
Ovogénesis en mosquitos	11
Ovogénesis en <i>D. melanogaster</i>	13
Hipótesis sobre la función	16
IV.-Materiales y Métodos	23
Clonación del Homólogo de c3 de <i>Drosophila melanogaster</i> .	23
Purificación de RNA.	23
Northern y Southern Blot.	23
Clonación del cDNA de c3 en el vector pGEX1 y purificación de la proteína de fusión GST-C3.	24
Inmunización de Ratones.	25
Western blot	25
Fraccionamiento celular.	26
Secuencia de DNA mediante el método de terminación por ddNTPs.	27
Inmunocitoquímica.	27
Localización citogenética del gene c3 de <i>Drosophila melanogaster</i> .	29
Construcción de moscas transgénicas, inducción del antisentido por choque térmico y análisis fenotípico.	30
V.-Resultados	
Clonación y secuencia de c3 de <i>Drosophila melanogaster</i> .	33
Expresión del gene c3 durante el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .	34
Distribución subcelular de la proteína codificada por c3.	35
Distribución del producto de c3 en embriones enteros y ovarios.	36
Análisis fenotípico utilizando construcciones de expresión sentido y antisentido.	37
VI.-Discusión	44
VII.-Conclusiones	56
VIII.-Bibliografía	58
IX.-Apéndice	68

I.- Prólogo:

A veces tratar de describir un proyecto de investigación dentro de todo su contexto no es un proceso lineal y simple o el justificarlo rigurosamente en el formato objetivo y despersonalizado que normalmente usa la ciencia (introducción, materiales y métodos resultados y discusión) simplemente no refleja el modo en que realmente se desenvuelve el proceso de la investigación. Si bien, este contexto puede ser irrelevante y hasta contraproducente en un artículo científico, dentro de una tesis puede ser muy importante. Por esta razón decidí estructurar esta tesis en dos partes: por un lado una justificación informal y coloquial en la que intento centrar y darle continuidad histórica a mi proyecto, que es la continuación de mi trabajo de maestría. Y, por otro lado, el cuerpo formal de la tesis que está escrito de la manera ortodoxa y rigurosa arriba mencionada, que describe los objetivos y resultados de mi tesis. Finalmente anexo los artículos que se generaron como consecuencia de mi trabajo.¹

¹ Nota. Para evitar redundancia la mayoría de las figuras están referidas al segundo artículo del apéndice. Las figuras incorporadas en el cuerpo de la tesis están citadas solamente por su número, las figuras referidas en el artículo "Antisense Supresión..." están citadas como Reynaud *et al.*, 1997. y su número correspondiente.

II.- justificación:

Normalmente al leer una tesis o un artículo científico uno espera encontrar un texto bien estructurado que pone al lector en antecedentes , plantea una hipótesis y finalmente la confirma. Este formato del lenguaje científico tiende a hacernos creer que el proceso del descubrimiento es así, un flujo lineal y casi preestablecido, esta misma impresión se refuerza cuando uno estudia el desarrollo de cualquier campo de la ciencia, o de la historia de la ciencia misma. Si bien, esta organización normalmente hace que la información sea accesible, objetiva, y fácil de asimilar, este sistema no refleja lo que sucede en la realidad.

Probablemente sea Kuhn (1970) quien logra describir de una manera mucho más cercana a la realidad cuál es el verdadero proceso del descubrimiento científico a todos los niveles. Es él quien mejor describe cómo el proceso del descubrimiento científico es más bien un proceso retroalimentado, iterativo que depende en buena parte de la rutina. Así mismo, es Kuhn quien se da cuenta de la importancia de tener un paradigma para comenzar la investigación, así sea este completamente erróneo y de cómo ese paradigma se va transformando a lo largo de la investigación según se va adquiriendo información nueva hasta que sus últimos derivados o descendientes pueden ser casi irreconocibles o, incluso opuestos al paradigma original. Estos

cambios de paradigma o revoluciones científicas ocurren a todos los niveles, sin embargo, es mucho más frecuente en nichos que engloban un área muy especializada del conocimiento (como por ejemplo un proyecto de posgrado) y muy rara vez en paradigmas grandes o generales que abarcan e influyen en prácticamente todas las áreas del conocimiento científico (como la transición de la mecánica clásica a la relativista en la física moderna). Estas transiciones conceptuales son las que hacen en algunos casos muy difícil explicar o contextualizar el curso de una investigación. Como ejemplo de esto no debo ir más lejos que mencionar el desarrollo de mi trabajo de tesis de doctorado, cuyas transformaciones a lo largo del tiempo sólo hacen sentido en el contexto de los cambios de paradigma expuestos más arriba.

Vayamos por partes:

Primero que nada debo aclarar que mi proyecto de doctorado fue la continuación directa de mi proyecto de maestría y por lo tanto tengo que recapitular al paradigma y objetivo original del proyecto.

Este era:

Aislar y caracterizar genes específicos de ovogénesis del mosquito *Anopheles gambiae*.

Aquí surgen varias preguntas importantes y probablemente obvias:

- 1) ¿ Por qué el mosquito?**
- 2) ¿ Por qué la ovogénesis?**
- 3) ¿ Qué estrategia experimental usamos ?**
- 4) ¿ Si empecé con el mosquito cómo es que terminé con *Drosophila*?**

La primera y segunda preguntas son fáciles: se usó al mosquito *An. gambiae* porque es el principal vector de la malaria, que es la enfermedad parasitaria que mata a más gente en el mundo y por lo tanto es importante conocer cualquier aspecto de su biología (Zheng *et al* 1991.). En cuanto a la segunda pregunta, se estudió ovogénesis porque es un proceso muy interesante, complejo, en el que interaccionan muchos tipos distintos de tejidos, que es crítico para el ciclo de vida del mosquito y por lo tanto para el del parásito. Otra característica muy importante es que en los mosquitos hematófagos la ovogénesis es un proceso inducible (ver más adelante) (Besansky 1992).

En cuanto a la estrategia fue conceptualmente muy simple; se hizo una biblioteca de cDNA de ovario de mosquito alimentado con sangre y a ésta se le hizo un tamizado diferencial contra el resto del mosquito. De ahí se aislaron las clonas que parecían específicas.

De estas clonas de cDNA se caracterizaron las dos que parecían más enriquecidas (a nivel de northern blot) en el ovario

con respecto al resto de la hembra y al macho (Zurita *et al.*, 1997). Estas clonas se denominaron arbitrariamente c3 y c8.

Cuando secuenciamos a c8 encontramos que codificaba para una isoforma de la histona H2b, este transcrito tenía la peculiaridad de que estaba poliadenilado cuando normalmente los transcritos de histonas que forman el "core" (núcleo) del nucleosoma no se poliadenilan y resultó ser la primera secuencia de una histona reportada en mosquito (Zurita *et al.*, 1997.).

La secuencia de la clona c3 demostró que codifica para una proteína para la cual ya se habían encontrado genes homólogos en muchos organismos distintos. Esta proteína estaba altamente conservada a nivel de identidad de aminoácidos desde levadura hasta humanos y en cada sistema se le propuso una función distinta (ver más abajo), así que decidimos hacer experimentos para definir cuál de las diferentes funciones propuestas era la correcta, o en su defecto proponer una nueva.

Este es el momento de contestar la última pregunta: Si bien era relativamente fácil aislar transcritos muy enriquecidos en el ovario del mosquito también es muy difícil caracterizarlos en este organismo debido a varias razones: la genética no está bien desarrollada, no existe un sistema de transformación genética aceptable, las colonias de mosquitos son muy difíciles de mantener, y además, no es prudente introducir mosquitos africanos a México. Por todas estas razones decidimos cambiar a *Drosophila* que es un modelo más

accesible experimentalmente para determinar la función de esta proteína.

Las funciones atribuidas a c3 en los diferentes sistemas eran bastante diversas: en plantas se había aislado como un transcrito específico de la fase "S" del ciclo celular (Ito *et al.*, 1991, 1992 y 1994). En levadura se propuso que el gene homólogo a c3 estaba involucrado en el transporte de proteínas a la mitocondria (*MFT1*) (Garret *et al.*, 1991). En rata fue caracterizado como un factor efector de la transformación mediada por *v-fos* (*fte-1a*) y por último en humanos se clonó haciendo un tamizado de una biblioteca de cDNA con anticuerpos contra la proteína ribosomal S3a de rata. Con el transcurso del tiempo, sólo una de las propuestas fue descartada: Ito *et al.*, demostraron genéticamente que *MFT1* no era un factor de importación a la mitocondria (Ito *et al.*, 1993). Mientras tanto genes homólogos a c3 fueron clonados de manera más estocástica en otros organismos (Gordonet *al.*, 1992. y Auclair *et al.*, 1994); estos grupos no contaban con información acerca de la función de estas proteínas así que aceptaban la función de su preferencia propuesta por el "genbank". Por otro lado, las 3 propuestas que quedaban (proteína específica de la fase "S", efector de *v-fos* y proteína ribosomal) no son del todo incompatibles y sin embargo, tampoco parecen ser de manera evidente la misma función, por lo que a partir de aquí el objetivo básico de mi trabajo era determinar cuál de todas estas funciones es la correcta. Durante el desarrollo de mi proyecto de maestría generamos anticuerpos

específicos contra el producto de *c3* y los caracterizamos a nivel de "western blot", monté la técnica de inmunohistoquímica en embriones enteros de *D. melanogaster* con anticuerpos secundarios acoplados a enzimas, así mismo demostré que al menos en *Drosophila* el transcrito es muy abundante a lo largo del ciclo de vida y por las tinciones parecía claramente un gene de expresión ubicua. Como se podrán dar cuenta en este momento nos vimos obligados a hacer un cambio de paradigma: "si este gene es constitutivo, no puede por lo tanto ser específico de ovario", lo que significa que cuando mucho podrá estar enriquecido en este tejido. Esto evidentemente me causó cierta conmoción ya que la hipótesis original de mi trabajo estaba hasta cierto punto invalidada. Por otro lado el gene no perdía todo su interés ya que una pregunta relevante del trabajo ¿cual es la función? seguía siendo válida y ahora el rango de funciones parecía estar un poco mas delimitado ya que si era una proteína constitutiva tampoco podía ser una proteína específica de la fase "S". Simultáneamente a todo esto clonamos el gene homólogo de *c3* en *D. melanogaster* y se confirmó algo que ya esperábamos: la proteína está muy conservada entre cualquier par de organismos que se escoja.

Otra manera de replantear mi proyecto es en el contexto actual de los proyectos de secuencia de distintos organismos donde se están generando grandes cantidades de secuencias, por ejemplo, en el genoma de *Haemophilus influenzae* donde el 40% de las secuencias de los marcos abiertos de lectura no parecen tener identidad significativa con ninguna otra secuencia

en las distintas bases de datos ni alguna función definida genética o bioquímica (Fleischman *et al.* 1995). Es en este sentido que es muy válido preguntar ¿Cómo se le asigna una función a una proteína que no tiene definida una función genética y/o bioquímica? Si bien estrictamente hablando este no es el caso de *c3*, ya que sí existían proposiciones en cuanto a su función, se convertía en un ejercicio intelectual interesante aplicar diversas técnicas para definir su función de manera que sirviera como antecedente para definir funciones bioquímicas a otras secuencias. Aunado a esto contábamos con anticuerpos específicos lo que constituía una herramienta muy versátil como rastreador tanto a nivel del organismo entero (inmunotinciones de embriones enteros) como a nivel celular y de "western blot".

Con todo esto como antecedentes comenzó mi trabajo de doctorado cuyo objetivo básico es la definición de la función de *c3* en *D. melanogaster* utilizando cuatro estrategias u objetivos distintos y complementarios:

- 1) Visualización de la distribución de la proteína codificada por *c3* durante el desarrollo del embrión y la ovogénesis, lo que nos permitirá definir los dominios de expresión y por lo tanto poder inferir la función de la proteína durante el desarrollo y la ovogénesis.
- 2) Caracterización de la localización subcelular de *C3* mediante fraccionamientos celulares y subsecuentemente "western blot" de dichas fracciones.

- 3) Mapeo genético mediante hibridación *in situ* de cromosomas politénicos para relacionar los fenotipos reportados en la zona genómica con una posible función de c3.**
- 4) Generación de moscas mutantes mediante transgénesis de transcritos "sentido" y "antisentido", esta estrategia se usará alternativamente para generar un fenotipo que nos indique la posible función de c3.**

Debido a que esto es una justificación no pienso entrar en este momento en los resultados experimentales, sin embargo me permito adelantar que en conjunto los datos obtenidos a partir de las estrategias arriba mencionadas apuntan fuertemente a que c3 en realidad codifica para la proteína ribosomal S3a, así mismo los resultados experimentales obtenidos también demuestran que c3 codifica para una proteína crítica para el funcionamiento del ovario en *D. melanogaster* en concordancia con el paradigma original de este trabajo.

III.- Antecedentes:

Como se mencionó en la introducción el objetivo original de este trabajo consistía en aislar genes enriquecidos durante la ovogénesis en dípteros. Se verá mas adelante que el sistema idóneo en el cual buscar este tipo de genes es el ovario de un mosquito hematófago, ya que el inicio y la teminación de la ovogénesis están estrictamente reguladas. El hecho de que hayamos escogido al mosquito *Anopheles gambiae* se debe a que es el principal transmisor de la malaria. Esta enfermedad es responsable de más de 1,000,000 de muertes anuales (Zhenget al., 1991).

Ovogénesis en dípteros.- La ovogénesis ha sido muy estudiada en *Drosophila* y a nivel morfológico es prácticamente idéntica entre todos los dípteros, incluidos los mosquitos (Besansky et al., 1992). Se podría decir que en los dípteros la ovogénesis es el estadio 1 del desarrollo ya que es en esta etapa cuando se definen las coordenadas antero-posteriores y dorso-ventrales del embrión. De manera igualmente relevante, en un huevo maduro de *Drosophila* o de mosquito existen todos los componentes necesarios para generar una larva de primer *instar* completa. Muchos de estos componentes como los mRNAs y las proteínas son de origen somático materno y en algunos casos pueden ser suficientes para mantener el desarrollo hasta el estadio adulto de embriones homócigos nulos para estos

productos génicos, este fenómeno es conocido como herencia materna.

Ovogénesis en mosquitos.- La ovogénesis es un proceso muy costoso desde el punto de vista energético. Si comparamos el entorno biológico de una *D. melanogaster* con el de un mosquito hematófago una de las diferencias más evidentes es la accesibilidad alimenticia. En el caso de la mosca, que normalmente habita lugares donde la fuente de alimento es constante, la ovogénesis es continua durante el desarrollo. La ovogénesis comienza durante la pupación y la masa de la larva determina el número de ovariolos del ovario (Bodestein 1950). En cambio, en el mosquito la accesibilidad al alimento es muy variable ya que pueden pasar muchos días entre una alimentación sanguínea y otra (Fleming 1986). De manera que el proceso de ovogénesis en mosquitos hematófagos se regula de manera muy estricta, siendo el factor inductor primario la ingesta de sangre. Debido a la especificidad de sexo, tejido y estadio así como a su inducibilidad, la ovogénesis en dípteros hematófagos ha sido un modelo tradicional de regulación genética en insectos, así mismo, se ha propuesto que la ovogénesis puede ser un blanco para el control de poblaciones de mosquitos (Besansky 1992).

Un mosquito hembra puede comer su propio peso en sangre en una sola comida. Se ha propuesto que la distensión del intestino, así como la disponibilidad de aminoácidos generan una señal sensada por el sistema nervioso central. El

cerebro en respuesta a esto produce una señal hormonal no identificada, la cual causa un aumento de al menos 4 veces en la síntesis de ribosomas en el cuerpo graso y en los ovarios (Hotchkiss and Fallon 1987). De manera simultánea al aumento en la cantidad de ribosomas, hay un aumento en la síntesis de vitelogenina. No se sabe si la regulación de este fenómeno es a nivel hormonal, transcripcional o es debida al aumento de la capacidad traduccional. El aumento en la síntesis de vitelogenina correlaciona con, y parece depender de, un aumento en la síntesis de poliaminas (Kogan 1990). Existe otra proteína que se sintetiza muy abundantemente durante el ciclo gonotrófico, tiene la misma cinética de aparición que la vitelogenina y se internaliza en el huevo. A nivel de secuencia esta proteína pertenece a la familia de las carboxipeptidasas y se cree que está involucrada en la hidrólisis de proteínas asociada a la embriogenesis. La síntesis de la vitelogenina y de la carboxipeptidasa son estimuladas por 20-hidroxiecdisona. El pico de síntesis de ambas proteínas es a las 24 h después de la alimentación sanguínea, y deja de ser detectable 48 h después (Raikhel *et al.*, 1990). La internalización de la vitelogenina y de la carboxipeptidasa parece ser mediada por receptores específicos, ya que se ha mostrado que tiene las características cinéticas de endocitosis mediada por receptores. Tales características son: dependencia a la temperatura, saturabilidad, selectividad, y especificidad de tejido (Koller *et al.*, 1990). Se ha aislado un factor oostático que consiste en un decapeptido cuyos 6 últimos aminoácidos son prolina. Este decapeptido es capaz de detener

la ovogénesis y la digestión de sangre en muchas especies de mosquitos y en otros insectos hematófagos. Estudios de unión demostraron que existen receptores específicos para este péptido en el ovario de mosquito. Debido a que la cantidad de este factor aumenta a partir de 48 h post-ingesta sanguínea, parece ser que está involucrado en regular la terminación de la digestión y la ovogénesis (Lea y Brown 1990). Cuando la vitelogénesis termina, los gránulos secretorios del cuerpo graso son degradados por lisosomas, quedando así el mosquito en el mismo estado metabólico pre-alimentación sanguínea (Raikhel *et al.*, 1990). Si bien la mayor parte de los estudios de la regulación de la ovogénesis en mosquitos se ha hecho en *Aedes aegypti* hay estudios en *An. gambiae* que demuestran que la regulación en este organismo es muy similar (Besansky 1992).

Ovogénesis en *D. melanogaster*.-Los ovarios en *Drosophila* y en mosquito (Fig. 1 B) están formados por ovariolos (Fig 1 C) que son a su vez líneas de montaje para la producción de huevos, en la que los estadios más tempranos se encuentran en la parte más anterior del ovario y los estadios más tardíos se encuentran en la parte posterior. Este tipo de organización es llamado merofístico (Bodestein 1950). Las células germinales están almacenadas en la punta anterior del ovario en una estructura llamada germario (Fig. 1 C). La ovogénesis comienza cuando una célula germinal del germario inicia un ciclo de cuatro divisiones mitóticas incompletas generando así un quiste de 16 células interconectadas por puentes citoplásmicos (Fig. 1

A). Este quiste es recubierto por células del epitelio folicular llamadas simplemente células foliculares. De las 16 células del quiste sólo 2, las más viejas y que tienen 4 puentes citoplásmicos (Fig. 1 A) son las que tienen la capacidad de convertirse en huevo. No se sabe cómo se lleva a cabo esta decisión, sin embargo existen varias mutantes que afectan este proceso de diferenciación ya sea convirtiendo a todas las células del quiste en células nodrizas como es el caso del gene *Egalitarian* (Mohler y Weischaus 1986) o haciendo procesos tumorigénicos como en mutaciones de *Bag of marbles*. (McKearin y Spradling., 1990) Las quince células restantes se convierten en células nodrizas que se encargan de sintetizar la mayor parte de los componentes del huevo. Estas células modifican su ciclo celular de manera que replican su genoma pero no entran en mitosis convirtiéndose en células muy poliploides (hasta 1024X) con núcleos gigantes que en los estadios tempranos forman cromosomas politénicos que tienen una capacidad transcripcional amplificada. Posteriormente, la estructura politénica desaparece, convirtiéndose en cromosomas de tipo "lamp brush" (cepillo) que mantienen una alta capacidad transcripcional. Al final de la ovogénesis las células nodrizas fragmentan su núcleo y bombean de manera activa todos sus componentes hacia el huevo. Durante todo este proceso las células foliculares proliferan recubriendo al huevo en formación, estas células son críticas durante la ovogénesis ya que en estadios tempranos generan muchos de los componentes del huevo, incluidas las 3 proteínas principales de la yema (YP1, YP2, YP3) (Brennan *et al.*,

1892). Posteriormente, estas células generan factores morfogenéticos que determinan el patrón dorso-ventral, en estadios todavía más tardíos sintetizan al corion y demás estructuras externas del huevo. Existen muchas mutantes que afectan ya sea la proliferación, migración o maduración de las células foliculares que causan esterilidad femenina (Spradling 1993).

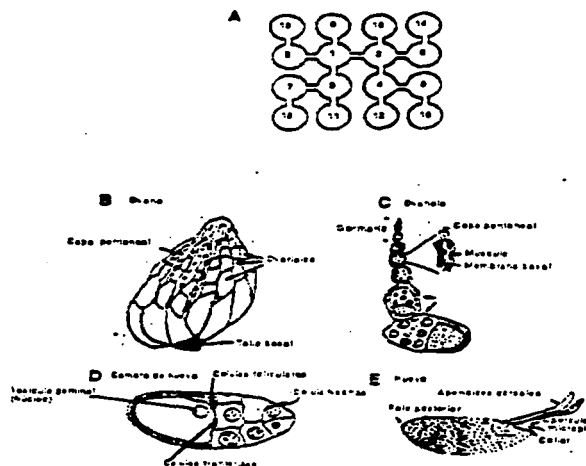


Fig. 1.- A) Relación y notación estándar de las células generadas por una célula perimetral en una cámara de huevo, solo las células numeradas 1 y 2 tiene capacidad de convertirse en huevo (no se sabe como deciden cual va a ser), las otras 18 se convierten en células foliculares. B) Anatomía del ovario. C) Esquema de un ovario. Note las distintas etapas en la construcción de un huevo (los estadios más tempranos se encuentran en la parte superior, que corresponde a la zona más anterior de ovario.) D) Cámara de huevo tardía (estadio 16). La célula que va a dar origen al huevo ya es mucho más grande que las foliculares y las células foliculares ya están cubiertas. El huevo maduro. E) Huevo maduro. Hizo para la fecundación, las estructuras exteriores están hechas de corion y se crean secretadas por las células foliculares que son de origen materno. (Tomado de "The Development of *Drosophila melanogaster*" Michael Sata And Alfonso Martinez Arias. Cold spring Harbor Laboratory Press. 1993)

Hipótesis sobre la función.- Como ya se mencionó en la justificación, para cuando nosotros clonamos a c3 en mosquito y después en *Drosophila*, ya existían varios genes homólogos a éste. La identidad de estos genes a nivel de aminoácidos es muy alta a todo lo largo de la escala filogenética sugiriendo una función común. Por ejemplo entre *Drosophila* y *Saccharomyces cerevisiae* c3 tiene una identidad del 55%, con sus homólogos de mamíferos y plantas es de alrededor del 65%, entre *Drosophila* y mosquito es del 71% (ver resultados). El extremo amino terminal de estas proteínas es la zona más conservada entre todas ellas (Fig. 1 artículo Reynaud *et al.*, 1997 1997). C3 en *Drosophila* es una proteína de 270 aminoácidos, muy básica, que no tiene señales de importación a ningún organelo ni ningún dominio transmembranal. No se encontró homología significativa con ningún dominio bien definido o clasificado utilizando diferentes programas de reconocimiento de estructuras (como motifs de Winsconsin GCG).

Las funciones que se han propuesto para c3 son distintas para cada sistema en que se ha aislado. El primer homólogo de c3 que se reportó fue identificado en *Saccharomyces* por Garret *et al.* (1991), utilizando un enfoque genético. En este trabajo identificaron un fragmento genómico que complementaba a la mutante *mft1* (mitochondrial fusion targeting) que es deficiente en el transporte de una proteína de fusión Atp2-lacZ a la mitocondria. Es por esto que proponían que c3 (*mft1*) era un factor involucrado en la importación de proteínas a este organelo (Garret *et al* 1991). Ese mismo año el grupo de

Komamine (Ito *et al.*, 1991) aisló un gene homólogo a c3 haciendo un "tamizado diferencial" de una biblioteca de cDNA de células sincronizadas en fase "S" de *Catharanthus roseus*. En este trabajo se mostró que el transcrito del homólogo de c3 (*cyc07*) se enriquece en cultivos sincronizados de células de *C. roseus* cuando estos entran en fase "S", asimismo, muestran que el mRNA de c3 (*cyc07*) está muy enriquecido en el meristemo radicular de esta planta (Ito *et al.*, 1991). Posteriormente y debido a que el trabajo de Garret *et al.*, (1991) está en franca contradicción con la hipótesis del grupo de Komamine, se mapeó con más resolución en levadura al gene *mft1*, demostrando que la función de transporte no corresponde al marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés) del homólogo de c3 (*mft1*, *cyc07*) sino al ORF que se encuentra más hacia el 3' de este gene y en la orientación inversa (Ito *et al.*, 1993). En este mismo trabajo el grupo de Komamine demuestra que hay dos copias del homólogo de c3 que nombran en levadura *PLC1* y *PLC2*, también demuestran que la doble disrupción de estos genes es letal (Ito *et al.*, 1993). Ito y colaboradores excluyen que c3 esté involucrado en el transporte de proteínas a la mitocondria al mapear a esta función esta en el ORF mas 3' (Ito *et al.*, 1993). Posteriormente el grupo de Komamine caracteriza a la región 5' regulatoria del gene de *C. roseus* y demuestran que ésta es capaz de dirigir la expresión de un gene reportero (β -glucuronidasa) al tejido meristemático de *Arabidopsis thaliana* (Ito *et al.*, 1994). Otros grupos interesados en biología molecular de plantas también clonaron genes

homólogos a c3 en otras plantas utilizando como sonda heteróloga al gene de *C. roseus* y asumiendo sin cuestionar la función de esta proteína en la progresión de la fase "S" del ciclo celular (Kidou *et al.*, 1994). En 1992 dos grupos independientes clonan otros dos homólogos de c3 utilizando estrategias y organismos distintos: Kho y Zarbl clonan el homólogo de c3 de rata llamándolo *fte1* (*v-fos transformation effector*) buscando células (rat-1) revertantes para el fenotipo transformado causado por *v-fos*. En este trabajo una clona irrelevante de una biblioteca de cDNA de humano se inserta en el ORF endógeno de c3 (*fte-1*) causando la reversión del fenotipo transformado. El gene se identificó cuando se secuenciaron los extremos genómicos que flanqueaban a la inserción del cDNA de humano. En este artículo también se demuestra que sólo es necesaria la reintroducción de ese ORF en estas células para que el fenotipo transformado revierta otra vez (Kho y Zarbl 1992). Simultáneamente Metspalu *et al.*, clonan otro homólogo de c3 buscando en una biblioteca de expresión de cDNA a la proteína ribosomal S3a de humano, utilizando como sonda a un anticuerpo policlonal específico para la proteína S3a de hígado de rata (Metspalu *et al.*, 1992). Este es el primer gene de la proteína ribosomal S3a que se reporta, y sólo hay dos datos que sostienen la hipótesis de que este transcrito codifica para la proteína ribosomal: 1) el contenido de aminoácidos de la proteína ribosomal S3a de rata es muy similar al predicho por el transcrito del homólogo de c3 (Collatz *et al.*, 1977) y 2) los anticuerpos policlonales contra la proteína S3a de rata cruzan

con la proteína expresada por la clona que aislaron (Metspalu *et al* 1992). Otros grupos han clonado homólogos de c3 por métodos más estocásticos (ver más adelante). El homólogo a c3 de ratón fue clonado entre otros muchos genes al hacer un "tamizado diferencial" de fibroblastos tratados y sin tratar con TNF (Tumor Necrosis Factor). Este grupo demostró que en estas células al ser tratadas con TNF el transcrito para el homólogo murino de c3 se induce ligeramente (Gordon *et al.*, 1992). Por otro lado, Auclair y colaboradores clonaron otro homólogo de c3 en *Aplisia californica* buscando transcritos abundantes y constitutivos en neuronas de este organismo. (Auclair *et al.*, 1994). En ninguno de estos dos trabajos se discute sobre la posible función de c3. El homólogo de c3 en *Caenorhabditis elegans* se clonó como parte del proyecto de secuencia del genoma de éste organismo, en la anotación del "Genbank", solamente se menciona que es un homólogo de la proteína ribosomal S3a (Wilkinson y Wohldman., 1994).

Cuando uno toma en cuenta toda esta información es evidente que no existe un consenso sobre la función de c3. Bibliográficamente las dos hipótesis más citadas en la literatura son la de que c3 es una proteína ribosomal, o, que es una proteína involucrada en la progresión de la fase "S" del ciclo celular. Esto, más que por datos experimentales, parece ser un fenómeno causado por la literatura: la gente que quiere clonar una proteína ribosomal utiliza al gene de Metspalu como sonda heteróloga para su sistema, mientras que los que quieren clonar un gene específico de la fase "S" utilizan al gene de Ito, siendo

ambos el mismo gene. Los genes clonados de ésta manera sustentan a la hipótesis de elección de una manera circular (se clonó un gene ribosomal porque se usó un gene ribosomal y viceversa). La hipótesis de que c3 es un efector de *v-fos* podría ser compatible con cualquiera de las dos anteriores ya que si bien está demostrado que esta proteína es necesaria para que *v-fos* cause el fenotipo transformado, no existe ningún mecanismo propuesto. Por otro lado, cabe proponer la idea de que tanto la entrada a la fase "S", como la transformación de una célula, se pueden ver como eventos proliferativos. Así mismo, el equilibrio de la maquinaria ribosomal puede ser crucial para la proliferación y el crecimiento celular. En este contexto cabe plantear la pregunta ¿Las diversas funciones que se le atribuyen a c3, son en realidad diferentes? Existe la posibilidad de que cada una de estas "funciones" sea mas bien una faceta de una función única. Esta faceta puede ser reflejo no de la función sino mas bien de la estrategia de selección y del sistema modelo que se utiliza. Este podría ser el caso si c3 es en realidad una proteína involucrada en un proceso metabólico basal o de "housekeeping". Si esto es cierto entonces cualquier mutación en c3 sería muy pleiotrópica y por lo tanto sería detectable desde muchos enfoques de selección distintos.

Por otro lado, también es posible que sólo una de las propuestas sea la correcta y las otras sean consecuencias indirectas o artificios experimentales. Todo esto refleja la complejidad del problema de asignarle función a proteínas (o secuencias) que carecen de contexto bioquímico o biológico.

Este es un problema de gran relevancia ya que los proyectos masivos de secuencia de genomas enteros están produciendo grandes cantidades de secuencias que codifican para proteínas que no tienen identidad con ninguna proteína conocida (Fleischman *et al.*, 1995) y no existe ninguna estrategia directa para asignarles una función. En este contexto se plantea el objetivo general de éste proyecto:

"Determinar la función bioquímica y genética del producto del gene *c3* de *D. melanogaster*."

Mediante:

- 1) Visualización de la distribución de la proteína codificada por *c3* durante el desarrollo del embrión y la ovogénesis, lo que nos permitirá definir los dominios de expresión y por lo tanto de función de la proteína durante el desarrollo y la ovogénesis.**
- 2) Caracterización de la localización subcelular de *C3* mediante fraccionamientos celulares y subsecuentemente "western blot" de dichas fracciones.**
- 3) Mapeo genético mediante hibridación *in situ* de cromosomas politénicos para relacionar los fenotipos reportados en la zona genómica con una posible función de *c3*.**
- 4) Generación de moscas mutantes mediante transgénesis de transcritos "sentido" y "antisentido", esta estrategia se usará alternativamente para generar un fenotipo que nos indique la posible función de *c3*.**

IV.-Materiales y Métodos:

Cepas de insectos. En este trabajo se utilizó la cepa de *D. melanogaster* "Oregon R", y la de *An. gambiae* "Suaococo".

Enzimas de restricción. Todas las enzimas de restricción usadas en este trabajo fueron comerciales y se utilizaron de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Clonación del Homólogo de c3 de *Drosophila melanogaster*. El cDNA completo de *Drosophila* se clonó de una biblioteca comercial de cDNA de embriones de 0 a 24 horas en lambda Zap (Stratagene), utilizando como sonda heteróloga el cDNA de c3 de mosquito (Zurita *et al.*, 1996). Las condiciones de hibridación fueron 37% formamida, 0.5x SSC, 1x solución de Denhardt, 1mg/ml DNA sonificado de esperma de salmón a 37°C. Los filtros se lavaron 4 veces a 65°C en 0.2 X SSC más 1% de Lauril Sufato de Sodio (SDS) (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de RNA. El RNA total se extrajo en todos los casos según el protocolo de Chomczynski *et al.*, (1987).

Northern y Southern Blot. El DNA se fragmentó utilizando enzimas de restricción y se separó de acuerdo a su peso molecular en geles de agarosa en buffer de boratos (Sambrook *et al.*, 1989). El RNA se separó según su peso molecular en geles desnaturizantes de agarosa con formaldehído. Los ácidos nucleicos se transfirieron

por capilaridad a una membrana de Nylon (Hybond N⁺, Amersham). Las sondas se marcaron con el "Kit" comercial "Prime it II" (Stratagene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las sondas se hibridaron con los ácidos nucleicos de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.*, 1989.

Clonación del cDNA de c3 en el vector pGEX1 y purificación de la proteína de fusión GST-C3. Con la intención de expresar a la proteína codificada por c3 en un sistema bacteriano, la región codificadora del cDNA de c3 fue clonada en fase con la glutatión -S-transferasa en el sitio BamHI del vector pGEX1 (Smith 1991) construyéndose así el pGEX1-c3. Esta construcción codificaba para una proteína de fusión a la que sólo le faltaban los primeros 20 aminoácidos de c3.

La proteína de fusión resultante fue purificada de acuerdo al protocolo de Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1994). Brevemente, se crecieron células DH5 α que contienen el plásmido pGEX1-c3 en 2 ml de medio con ampicilina (100 μ g/ml) por 5 hrs. a 37°C con agitación.(con un inóculo de 1:1000). La producción del péptido de fusión se indujo con IPTG 0.1mM final, una vez inducido se incubaron las bacterias 2 hrs más a 37°C con agitación. Las bacterias así tratadas se concentraron en tubos eppendorf por centrifugación y se resuspendieron en 300 μ l de PBS a 0°C. Las células se lisaron por ciclos de congelación-descongelación o por sonicación y se les agregó 50 μ l de resina (agarosa-S-glutatión al 50% lavada 3 veces en PBS). Esto se mezcló suavemente por 2 min. a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de PBS a 0°C y se

centrifugó por 5 seg. Se tiró el sobrenadante y se repitió el lavado 3 veces. La proteína de fusión se eluyó incubando a la resina 2 min. a temperatura ambiente con 50µl de glutatión reducido 10 mM. Se centrifugó y se guardó el sobrenadante. La proteína obtenida se cuantificó con el método de Bradford (Bradford, 1976) y se analizó en geles desnaturizantes de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Inmunización de Ratones. Se siguió el protocolo reportado por Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988). Brevemente, los ratones (hembras Balb-c de 3 meses de edad) fueron sangrados para aislar suero preinmune y después inmunizados 1 vez utilizando 5 µg/50 µl de proteína de fusión c3-glutatión-S-transferasa emulsionada con 50µl de adyuvante completo de Freund. A este tratamiento siguieron dos inmunizaciones con 5 µg/50 µl de proteína de fusión c3-glutatión-S-transferasa emulsionada con adyuvante de Freund incompleto. El tiempo transcurrido entre cada inmunización fue de dos semanas. Después de la última inmunización los ratones fueron sangrados y el título de los anticuerpos generados se midió en un ensayo de "western blot" (Burnette, 1981).

Western blot Se realizó de acuerdo a Burnette (1981). Las proteínas fueron corridas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (Laemmli, 1970) y electrotransferidas a corriente constante (0.5 amperes) por 30 min. a 4°C en buffer de transferencia (3.03g Tris-base y 14.5g de glicina en un litro de H₂O). Las proteínas ya transferidas al papel de nitrocelulosa fueron detectadas utilizando los anticuerpos obtenidos con el protocolo de inmunización descrito

arriba. El complejo IgG antígeno fue revelado utilizando el "Kit" de detección Protoblot de "Amersham" para detectar IgG de ratón (Anti IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina).

Fraccionamiento celular. El fraccionamiento celular se llevó a cabo de acuerdo a Birnie (1972) homogenando embriones de 0 a 24h. de edad en un homogenizador Dounce de 2 ml en buffer de homogenización (250mM sacarosa, 50mM Tris pH7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl₂, 2mM PMSF, 5mM EDTA). El homogenado fue centrifugado en tubos eppendorf a 600g. El pellet resultante contiene núcleos y células sin romper. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se centrifugó a 15,000g por 5min. la pastilla obtenida en este paso contiene mitocondrias y lisosomas. El sobrenadante se pasó a tubos para ultracentrifuga (Beckman Ultraclear 13x51mm) y se centrifugó a 100,000g. El sobrenadante contiene a la fracción citosólica y la pastilla es la fracción microsomal (retículo endoplásmico, ribosomas y membranas en general). Las partículas ribosomales se purificaron de acuerdo a Santon y Pellegrini (1980). El tejido (embriones de 0 a 12hrs.) fue homogenado suavemente en buffer de homogenización para ribosomas (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 3.3mM MgCl₂, 50mM NH₄Cl, 1mM ditiotretitol, 1% Triton X-100, 250mM sacarosa) en un homogenizador Dounce (aproximadamente 20 golpes). Los extractos se aclararon por centrifugación a baja velocidad (600g x 5min.). El sobrenadante se depositó sobre un colchón de sacarosa al 30% en buffer de homogenización para ribosomas sin Triton X-100 y se centrifugó por 12 horas a 234,000g. El pellet resultante es la fracción 80 S, este fue

resuspendido en buffer de gradiente para subunidades ribosomales (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 100mM KCl, 1mM ditioneitol). La suspensión se aclaró a 15,000g x15 min. y se depositó sobre un gradiente de sacarosa de 10% a 30% en buffer de gradiente para subunidades ribosomales. Se colectaron fracciones de 100µl y se normalizó la concentración de proteína de todas las fracciones de acuerdo a Bradford (1976). Todas las fracciones fueron analizadas mediante "western blot" (Burnette, 1981).

Secuencia de DNA mediante el método de terminación por ddNTPs. Se utilizó el "Kit" de secuencia con secuencia versión 2.0 (DNA polimerasa de fago T7) de United States Biochemical, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Sanger *et al.*, 1977).

Inmunocitoquímica. Adaptado del protocolo de inmunocitoquímica de Sara Bray del laboratorio de Fotis C. Kafatos (Ashburner 1989). Se colectaron embriones menores de 16 hrs puesto que embriones más viejos son impermeables debido a la deposición de cutícula. Los embriones se descorionaron 5 min. en hipoclorito al 5% y se lavaron extensamente con agua. Una vez descorionados los embriones se fijaron 20 min. en Engreiled Fix Buffer (140 mM KCl, 40 mM NaCl, 4 mM EGTA, 1 mM espermidina, 0.2% β-Mercaptoetanol, 30 mM PIPES pH 6.9, formaldehído 4%) y un volumen igual de n-heptano en agitación suave. Para desvitelinizar a los embriones se removió la fase acuosa y se agregó un exceso de metanol, éste se substituyó por más metanol fresco. El metanol se

desechó y los embriones se lavaron con etanol incubándose a -20°C por lo menos por 12 hrs. Se removió el etanol y los embriones se hidrataron con BSS 1X ((5X) 1.6 g NaCl, 1.5 g KCl, 0.9 g MgSO₄, 0.345 g CaCl₂•2HO, 0.85 g tricina, 1.8 g glucosa, 8.5 g sacarosa; se aforó a 100 ml y esterilizó por filtración) durante 5 min. Los embriones se lavaron 2 veces con BBT (BBT = TBS + 0.5% BSA + 0.05% Triton X-100.) por 10 min. cada uno a temperatura ambiente y en agitación. El BBT se renovó y se incubó 10 hrs a temperatura ambiente en agitación, esto hace que los embriones se permeabilicen. Una vez permeabilizados se agregó el anticuerpo adecuado en la dilución correcta en BBT. Los embriones se incubaron 12 hrs. en presencia del anticuerpo a 4°C en agitación. Todos los pasos siguientes se hicieron a partir de este paso a temperatura ambiente y en agitación. Los embriones se lavaron 3 veces en BBT por 15 min. cada una después se lavaron 3 veces en TBST (TBST = TBS + 0.05% Tween.) por 10 min. cada una. Después de los lavados se agregó el anticuerpo secundario a la dilución correcta en TBST y se incubó por 3 hrs. Los embriones se lavaron 5 veces en TBST por 5 min., 3 veces en TBS por 10 min. En el caso de que los anticuerpos secundarios estén acoplados a algún fluoróforo los embriones están listos para ser montados y observados ya sea por epifluorescencia standard o microscopía confocal. En el caso de que los anticuerpos estén acoplados a fosfatasa alcalina los embriones se lavan 3 veces más en buffer de fosfatasa alcalina (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Base pH 9.5, MgCl 5 mM). Después de este último lavado, se substituyó con buffer de

fosfatasa con sustrato (Nitrobluetetrazolium 0.15 mg/ ml y BCIP 0.33 mg/ml). El revelado se monitoreó en el microscopio de disección y la reacción se paró con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl); los embriones se lavaron por lo menos 3 veces con TBS antes de montar y almacenar. Es posible hacer transparentes a los embriones con salicilato de metilo mediante una deshidratación con una serie de soluciones de etanol (50, 70, 80, 90 y 100%). Una vez deshidratados se substituye al etanol al 100% con salicilato de metilo y se montan en el mismo salicilato donde hay que verlos inmediatamente.

Localización citogenética del gene c3 de *Drosophila melanogaster*. Los cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas de tercer instar se prepararon esencialmente como lo describe Ashburner (1989). La sonda biotinilada del cDNA de c3 fue sintetizada con el "Bio-Nick translation kit" (GIBCO-BRL) y la detección fue llevada a cabo utilizando el sistema de hibridación y detección *in situ* de GIBCO-BRL.

Construcción de moscas transgénicas, inducción del antisentido por choque térmico y análisis fenotípico. Las construcciones "sentido" y "antisentido" se hicieron insertando el cDNA completo de c3 en el vector de transformación pCaSperhs (Ashburner 1989). Para la construcción en "sentido" el cDNA se insertó en el sitio *EcoRI* del "polylinker" de este plásmido. En el caso de la construcción "antisentido" el cDNA se clonó

**direccionalmente en los sitios *NotI*-*HpaI* del "polylinker"
después de reparar el sitio *KpnI* del cDNA (Fig 2).**

Las moscas transgénicas fueron generadas utilizando el método de transformación de la línea germinal mediada por la transposasa del elemento P (Spradling y Rubin, 1992). Brevemente, embriones "yw" de 1.5 horas de edad fueron descorionados utilizando hipoclorito de sodio al 3% por 5 min. Los embriones fueron orientados sobre cinta adhesiva de dos caras (Scotch) deshidratados con dehidrita por un tiempo variable y cubiertos con aceite "Halocarbon" Hc-4.2. A los embriones así tratados se les inyectó entre el 1 y 2% de su volumen de la mezcla de transformación (300µg/ml de vector de transformación, 50µg/ml helper, en 5mM KCl; 0.1mM PO₄, pH 7.8). Las moscas que sobrevivieron al tratamiento (F0) fueron cruzadas con moscas "yw" vírgenes y se seleccionó a la progenie (F1) que tenía ojos "silvestres". Para generar moscas homócigas para el transgene se cruzaron hermanos vírgenes entre sí durante 5 generaciones y se comprobó que fueran homócigos mediante una retrocruza con moscas "yw".

Para inducir la expresión del transgene mediante un choque térmico, 5 hembras apareadas fueron introducidas en viales vacíos de plástico que contenían un pedazo de papel filtro en el fondo (para absorber la humedad). Los viales fueron sumergidos en un baño de agua a 40°C durante 30 min. se dejó a la moscas reponerse 1h a 17°C y se les volvió a dar choque térmico en las mismas condiciones antes descritas.

El número de huevos depositado por las moscas se determinó el día del choque térmico (día cero) y los huevos depositados fueron contados cada 24h. La información de 5

líneas independientes fue promediada, la desviación standard fue calculada y graficada para cada día. Tres días después del choque térmico los ovarios de esas mismas moscas fueron disecados en "Engreiled fix buffer", fijados (en el mismo buffer suplementado con 4% de formaldehído) y teñidos con DAPI (500ng/ml en Engreiled fix buffer). Después de teñidos, los ovarios fueron montados en gelvatol (Heimer y Taylor, 1974; Osborn y Weber, 1982) y fueron observados utilizando microscopía convencional de epifluorescencia.

V.-Resultados:

Clonación y secuencia de c3 de *Drosophila melanogaster*.

Como ya se mencionó en los antecedentes, nosotros clonamos utilizando una estrategia de tamizado diferencial, varios transcritos que se acumulan en el ovario del mosquito *Anopheles gambiae* después de que éste se alimentó con sangre. La clona c3 en particular nos llamó la atención porque codificaba para una proteína muy conservada a lo largo de la escala evolutiva, a la cual se le habían asignado diversas funciones dependiendo del sistema en el que se le había aislado. Con el fin de estudiar a c3 en un organismo modelo experimentalmente más accesible clonamos el cDNA de *Drosophila melanogaster* utilizando al cDNA de mosquito como sonda heteróloga, para tamizar una biblioteca comercial de cDNA de embriones de 0 a 24 horas de edad. Varias clonas positivas fueron aisladas y se secuenció una que contenía al transcrito completo de c3. Esta clona se analizó con más detenimiento, utilizando el paquete de análisis de secuencia Wisconsin (versión 8, Genetics Computer group). En la Figura 1 (Reynaud *et al.*, 1997), podemos observar la identidad a lo largo de toda la secuencia predicha de aminoácidos entre diferentes genes homólogos de diferentes *phyla*. La identidad entre mosquito y *Drosophila* es del 71%. Cabe también mencionar que la identidad con otros organismos es también alta. La composición de aminoácidos de la proteína codificada por c3 de *Drosophila* es muy similar a la reportada anteriormente para la proteína S3a ribosomal de rata (Collatz *et*

al., 1977), sin embargo, el porcentaje de algunos aminoácidos difiere. Si asumimos que c3 codifica para la proteína ribosomal S3a esta diferencia podría ser explicada por la divergencia evolutiva entre éstos dos organismos. En apoyo a esto, c3 tiene una similitud del 67% a nivel de aminoácidos con la secuencia reportada de la proteína ribosomal S3a de humano, rata y ratón.

Expresión del gene c3 durante el desarrollo de *D.*

***melanogaster*.** Se han propuesto varias funciones para la proteína codificada por c3 dependiendo del organismo en el que se ha aislado. Sin embargo, solamente se han hecho análisis de la distribución del transcrito de c3 durante el desarrollo en plantas. En estos trabajos los autores demuestran que c3 se expresa principalmente en los tejidos proliferativos de los meristemos (Ito *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1994). Para determinar el patrón de expresión de c3 durante el desarrollo de *D. melanogaster* se analizó tanto la expresión del transcrito como la cantidad de proteína. En la Figura 2 B (Reynaud *et al.*, 1997) se muestra un "northern blot" en el que se puede ver que el transcrito de c3 es muy abundante durante todo el ciclo de vida de la mosca. Esta distribución es muy similar a la del transcrito para la proteína ribosomal rp49 (Fig. 2 B Reynaud *et al.*, 1997). En esta misma figura se puede observar que las cantidades de los transcritos de ambos genes son particularmente altas durante el desarrollo embrionario y en hembras con ovarios activos. Para correlacionar la aparición del transcrito con la presencia de la proteína durante el desarrollo de la mosca

clonamos el cDNA de c3 en el vector de expresión pGEX1 (Smith 1993), con esta construcción obtuvimos una proteína de fusión glutatión-S-transferasa - c3 que se utilizó para generar anticuerpos en ratones. Los anticuerpos policlonales que se obtuvieron fueron muy específicos (Fig. 3 A Reynaud *et al.*, 1997) y fueron usados en ensayos de "western blot". La Figura 3 B (Reynaud *et al.*, 1997) muestra que la proteína c3 se encuentra presente en varios estadios embrionarios lo cual es consistente con la ubicuidad del transcrito.

Distribución subcelular de la proteína codificada por c3.

Si bien no existe un consenso en cuanto a la función de los homólogos de c3, Metspalu *et al.* (1992) reportaron un gene que proponen que codifica para la proteína ribosomal S3a de humano. Este gene tiene un nivel de identidad muy alto con nuestra clona, lo que sugiere una posible función para c3. Con la intención de corroborar esta propuesta aislamos fracciones subcelulares y partículas ribosomales puras. En estas fracciones, los ensayos de tipo "western blot" demostraron que el producto de c3 era detectable en las fracciones mitocondrial, microsomal y nuclear (Fig. 3 C Reynaud *et al.*, 1997), mientras que no era detectable en la fracción citosólica o en núcleos lavados con Triton-X-100 (Fig. 3). Cuando ensayamos partículas ribosomales enteras (80S) y separamos las subunidades ribosomales 40S y 60S mediante un gradiente de sacarosa, encontramos que c3 copurifica con las partículas 80S y 40S, no es detectable en las partículas 60S. La figura 3C (Reynaud *et al.*, 1997) muestra un

western blot de las distintas fracciones. Cabe hacer notar que la proteína se ve muy enriquecida en la fracciones 80S y 40S apoyando la idea de que c3 sea una proteína ribosomal o bien se asocia con la partícula ribosomal 40S. En este experimento también fueron visibles bandas de menor peso molecular, que podrían ser productos de degradación, y una banda de mayor peso molecular, esta última pudiera ser producto de interacciones muy estables entre c3 y otros componentes celulares como RNAs y proteínas.

Distribución del producto de c3 en embriones enteros y ovarios. Para visualizar la distribución de la proteína codificada por c3 durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario se hizo una inmunocitoquímica de embriones y ovarios enteros utilizando el anticuerpo policlonal anti c3 y se analizaron mediante microscopía confocal. La Figura 4 (A-E) (Reynaud *et al.*, 1997) muestra imágenes confocales de embriones enteros en distintos estadios del desarrollo. En el estadio de blastodermo celular (Fig. 4A y 4B) se puede ver que el anticuerpo tiñe tanto a las células polares como a las células somáticas, los núcleos no se tiñen y la proteína citoplásmica se concentra en una banda ancha en la zona apical y basal de las células. En estadios más tardíos 12-16 (Fig. 4C y 4D), donde se conocen dominios bien definidos de células mitóticas, la proteína está distribuida homogéneamente en todas las células del embrión. Esto es importante debido a que el homólogo de c3 de plantas ha sido definido como una proteína específica de la fase "S" del ciclo

celular (Ito *et al.*, 1991,1992,1994). El hecho de que el producto de *c3* sea ubicuo a lo largo del ciclo celular en *Drosophila* hace difícil sostener esta hipótesis. *C3* es también ubicuo en estadios tardíos de la embriogénesis (Fig. 4E Reynaud *et al.*, 1997). Durante la ovogénesis *c3* también es citoplásmico y está particularmente enriquecido en el epitelio folicular que es de origen somático (Fig. 4F-K)(Reynaud *et al.*, 1997). En el citoplasma de las células nodrizas *c3* se encuentra a concentraciones relativamente bajas (Fig. 4G-J Reynaud *et al.*, 1997) siendo detectable hasta el estadio 5. En el citoplasma del ovocito es prácticamente indetectable durante casi todo el desarrollo excepto en los estadios más tardíos del desarrollo (datos no mostrados). La proteína se encuentra más concentrada en la región basal de las células foliculares (Fig 4G y 4H Reynaud *et al.*, 1997) y en los estadios 12-14 parece concentrarse ligeramente en la región perinuclear. (Fig. 4K Reynaud *et al.*, 1997).

Análisis fenotípico utilizando construcciones de expresión sentido y antisentido. Para explorar la posibilidad de hacer estudios genéticos de la función de *c3*, determinamos la posición citogenética de *c3* mediante hibridación *in situ* en cromosomas politénicos de glándulas salivales (Fig. 2 Reynaud *et al.*, 1997). *c3* mapea en la sección 101-f en la base del cromosoma puntual o 4, una región del genoma de *Drosophila* en la cual no es posible hacer análisis genético clásico debido a que este cromosoma recombina a una frecuencia muy baja y la

densidad de marcadores genéticos es también muy baja. Para complicar aún más la situación, no existen cromosomas "balancers" para el cuarto cromosoma para estabilizar a las mutaciones, por lo que es prácticamente imposible analizarlo con los métodos genéticos convencionales.² Debido a la dificultad de hacer análisis genético clásico con este gene construimos moscas transgénicas que expresan transcritos "sentido" o "antisentido" bajo el control del promotor del gene de "Heat shock" 70 (ver materiales y métodos). Analizamos 10 líneas independientes "antisentido" y 8 líneas independientes "sentido" buscando defectos en embriones, larvas y adultos después de inducir el transcrito mediante choque térmico. En general no se observaron defectos cuando el choque térmico se dió durante la embriogénesis. Sin embargo las líneas antisentido produjeron adultos ligeramente más pequeños y tuvieron un retraso general en el desarrollo de 10 a 30 horas dependiendo de la línea "antisentido". Este fenómeno está probablemente causado por la transcripción de fuga del promotor de choque térmico a 25°C y es interesante ya que tanto el desarrollo

² Un arma muy utilizada en genética de *Drosophila* es el uso de cromosomas "Balancer" es un cromosoma que tiene por lo menos tres inversiones grandes lo que hace que no pueda recombinar con su homólogo. Además, normalmente es homocigoto letal y tiene marcadores dominantes, de manera que cuando se cruza una línea mutante con el balancer correspondiente, toda la progenie que lleve los marcadores del balancer es heterocigota para la mutación de interés y ésta no puede ser reparada o perdida ya que el cromosoma mutante no puede recombinar con el balancer. Esto permite guardar indefinidamente a la mutante sin selección. Así mismo, toda la progenie derivada de la línea balancer-mutante que no tenga los marcadores del balancer es homocigota para el gene de interés (Greenspan 1997).

retardado como la disminución en el tamaño son características del fenotipo "minute".³

El fenotipo más obvio fue la disminución en la producción de huevos y fue observado consistentemente en todas las líneas transgénicas "antisentido". Incluso a 25°C éstas líneas mostraban una disminución en el número de huevos puestos. Cuando indujimos la sobreexpresión del RNA "antisentido" con un choque térmico (ver materiales y métodos) la producción de huevos de estas líneas fue drásticamente reducida, de manera que a los tres días después del choque térmico dejaban de poner huevos (Fig. 5 Reynaud *et al.*, 1997). En contraste a este dato el número de huevos puestos por las líneas de moscas "sentido" y "silvestres" solamente disminuyó momentáneamente después del choque térmico recuperándose a niveles normales antes de 3 días.

La observación de que la producción de huevos es fuertemente afectada en las líneas "antisentido" nos sugirió que la supresión del producto de *c3* podría generar anomalías durante la ovogénesis. Ovarios de moscas transgénicas antisentido y de moscas "silvestres" fueron analizados después de 3 días de recibir un choque térmico. En todas las líneas antisentido las cámaras de huevo fueron completamente anormales. Las anomalías fueron muy evidentes en cámaras de huevo vitelogénicas y fueron frecuentemente acompañadas por la

³ El fenotipo "minute" se relaciona con unos 50 loci dispersos a lo largo de todo el genoma de *D. melanogaster* y se caracteriza por un retraso general en el desarrollo, pelos más delgados de lo normal y un tamaño menor de los adultos. Se cree que en general, estos loci corresponden a los genes de las proteínas ribosomales.

disrupción del epitelio folicular (Fig. 6 C-D Reynaud *et al.*, 1997). Algunas cámaras presentaron núcleos picnóticos, otras al parecer están fusionadas (Fig.6 B Reynaud *et al.*, 1997) y en otras los núcleos de las células nodrizas se encontraban mal localizados (Fig 6 D Reynaud *et al.*, 1997). Aparentemente a causa de todos estos defectos se generaba una reabsorción o una lisis de cámaras de huevo enteras ya que no se pudo encontrar cámaras tardías vitelogénicas o coriogénicas. En contraste, ninguna de estas anomalías fueron encontradas en las cámaras de ovarios "silvestres" (Fig 6 A Reynaud *et al.*, 1997). Con el fin de demostrar que el transcrito antisentido estaba realmente afectando la síntesis del producto de c3 hicimos un experimento de inducción del transcrito antisentido y verificamos el cambio en la cantidad de proteína mediante un ensayo de tipo "western blot". En la figura 5 se puede observar que el producto de c3 desaparece en extractos protéicos 6hrs después del choque térmico.

Por otro lado cabe mencionar que existe una mutación "minute" en esta región (*M(4)101*; Linsley y Zimm 1992). Las mutantes "minute" están asociadas comúnmente con defectos ribosomales. Nosotros cruzamos a nuestras líneas "sense" con la deficiencia (delección) *Df(4)M101-62f* que cubre a la región genómica que va de la división 101E-102-B10-17 y tiene el fenotipo "minute" con la intención de rescatar este fenotipo. Sin embargo, nuestras líneas no fueron capaces de rescatar a estas mutantes, tal vez debido a que la deficiencia es muy grande y corresponde a varios genes por lo que es difícil correlacionar la

función con c3 en este fondo genético. Simultáneamente cruzamos a la mutante minute puntual M(4)101^{57g} con las líneas transgénicas "sentido" y "anti-sentido" con la esperanza de rescatar o acentuar respectivamente el fenotipo "minute", en ninguno de los dos casos observamos una interacción, lo que sugiere que esta mutante corresponde a otro gene. Para corroborar este resultado comparamos la cantidad de c3 en las dos mutantes (la deficiencia y la puntual) y en los controles correspondientes y observamos que no existe una diferencia significativa (Fig. 4).

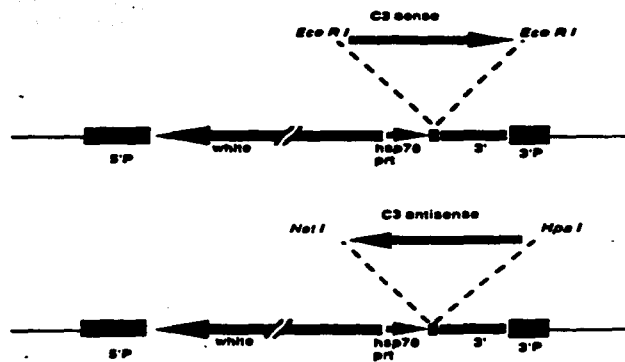


Fig. 2.- Construcciones en el vector pCasper Hsp 70 para la generación de moscas transgénicas que expresan respectivamente al transcrito de c3 en sentido o en antisense.

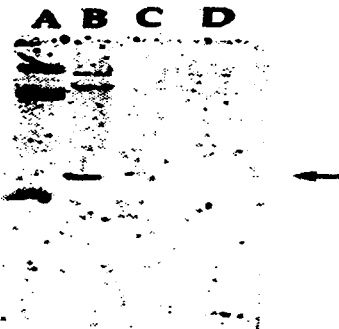


Fig. 3.- "Western blot" en el que se observa el desplazamiento de c3 de la fracción nuclear por Triton X-100.

A) Marcadores de peso molecular. B) Extracto total de embriones *yw*. C) Fracción nuclear no tratada con Triton X-100. D) Fracción nuclear tratada con Triton X-100.

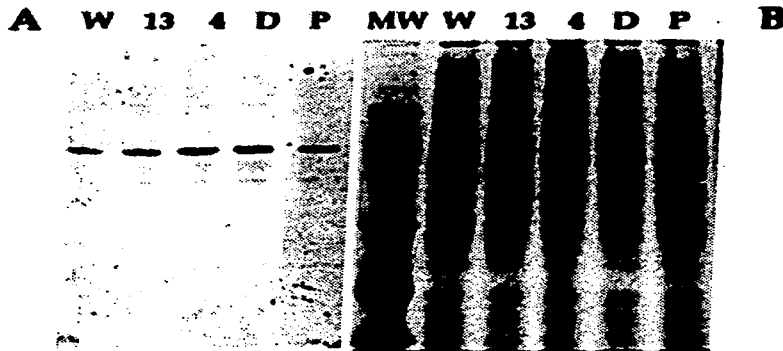


Fig. 4.- "Western blot" semi cuantitativo para comparar la cantidad de c3 en diferentes líneas de *D. melanogaster*.

A) "Western blot" contra las diferentes líneas. B) Gel de referencia en el que se cargó la misma cantidad de proteína que en el "Western". La diferencia de intensidad en los carriles de las mutantes se debe a un error en la normalización de la cantidad de proteína y no es significativa (comparar la intensidad entre los carriles). M=Marcadores de peso molecular., W=línea silvestre., 13=línea # 13 antisense., 4=línea #4 antisense., D=Deficiencia *Df(4)M101-12f.*, P=Mutante puntual *M(4)101^{57g}*.

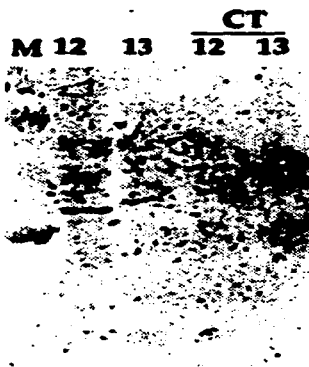


Fig. 5.- Inducción del transcrito antisentido y desaparición del producto de c3. "Western blot" de extractos totales de hembras adultas tras 6 horas de recuperación después del choque térmico. M= Marcadores de peso molecular, 12= línea antisentido 12, 13 = línea antisentido 13. CT= Choque Térmico.

VI.-Discusión:

Como ya se mencionó el objetivo de este trabajo es explorar la función del gene *c3* que aislamos originalmente del mosquito *Anopheles gambiae*, durante la búsqueda de transcritos que se acumulan en los ovarios después de que el mosquito es alimentado con sangre. Se han reportado homólogos del gene *c3* en organismos que representan a casi todos los eucariotes (levadura, plantas, nemátodos, artrópodos y mamíferos) y las secuencias de éstos son muy conservadas (del 51% al 67% de identidad a nivel de aminoácidos), lo que sugiere que este gene tiene una función importante y conservada a todo lo largo de la evolución de la línea eucariote. Hemos clonado el homólogo de *c3* en *Drosophila* y como era de esperarse la similitud entre la secuencia de mosquito y la mosca es muy alta, mostrando una identidad del 71% a nivel de aminoácidos (Fig 1).

La función de los diferentes homólogos de *c3* no se ha definido claramente. Las funciones propuestas para *c3* varían dependiendo del organismo en el que se aisló el homólogo. El gene *c3* fue mapeado por hibridación *in situ* en cromosomas politénicos en la sección 101-F que corresponde al cuarto cromosoma de *Drosophila* (Fig. 2 A Reynaud *et al.*, 1997). El análisis de la función de *c3* mediante genética clásica en *Drosophila* no fue posible debido a que el 4to. cromosoma de *D. melanogaster*, también llamado puntual, es el único cromosoma que no permite utilizar las herramientas genéticas clásicas de *D.*

melanogaster. Existe una deficiencia cromosomal en esta zona que se sabe que abarca varios genes. Esta deficiencia es letal cuando es homóciga y cuando es heteróciga tiene un fenotipo muy pleiotrópico. Nosotros intentamos rescatar esta deficiencia cruzando a esta línea con moscas transgénicas que expresaran al cDNA de c3 en sentido y sin embargo, no logramos rescatar el fenotipo. Esto no es sorprendente debido a la pleiotropicidad de la deficiencia. Por esta razón decidimos utilizar un modelo transgénico en el que expresáramos al cDNA de c3 en "antisentido" de manera que pudiéramos estudiar el efecto de la disminución de ésta proteína durante el desarrollo de *Drosophila*. Además, generamos un anticuerpo específico contra el producto de c3 para utilizarlo en experimentos bioquímicos e inmunocitoquímicos.

Basándose en experimentos en levadura y plantas Ito *et al.* (1991, 1992, 1994) propusieron que el homólogo de c3 se expresa solamente (o al menos preferencialmente) en tejido proliferativo y que está involucrado en la entrada y mantenimiento de la fase "S" del ciclo celular. Si esta hipótesis fuera correcta para *Drosophila*, c3 se expresaría en dominios bien definidos espacio-temporalmente dentro del embrión de *Drosophila*, estos dominios serían fáciles de correlacionar con zonas del embrión que están proliferando activamente ya que se encuentran muy bien caracterizadas (Foe *et al.*, 1993). Sin embargo, la ubicuidad y abundancia del producto de c3 en todos los estadios de los embriones de *Drosophila* no apoyan ésta hipótesis, al menos en este organismo (Fig. 4 Reynaud *et al.*, 1997). Es poco probable

que un gene tan conservado estructuralmente hubiera sufrido cambios funcionales radicales a lo largo de la evolución. En contraste con esto, nuestros datos son consistentes con la propuesta de que el homólogo de c3 de humano codifica para la proteína ribosomal S3a (Metspalu *et al.*, 1992). De acuerdo con nuestros experimentos inmunoquímicos de fracciones subcelulares, c3 está enriquecido en la fracción microsomal, copurifica con las partículas ribosomales 80S y 40S mientras que no es detectable en la 60S (Fig. 3 C Reynaud *et al.*, 1997). El transcrito de c3 en *Drosophila* es muy abundante a lo largo de todo el desarrollo embrionario y la transcripción de c3 es casi paralela a la del transcrito de la proteína ribosomal rp49 (Fig. 2 B Reynaud *et al.*, 1997).

Nuestros datos de inmunocitoquímica (Fig. 4 Reynaud *et al.*, 1997) muestran que c3 es citoplásmica y no nuclear en todos los estadios examinados. La exclusión del producto de c3 del núcleo podría parecer paradójica si proponemos que c3 codifica para una proteína ribosomal ya que es sabido que las pre-partículas ribosomales se ensamblan en el nucleolo (Wang *et al.*, 1993). Sin embargo, existen reportes en la literatura en los que se ha estudiado el orden de adición de las diferentes proteínas de la subunidad pequeña del ribosoma donde se demuestra que sólo las proteínas S3 y S21 se agregan a la partícula 40S dentro del nucleolo (Tudorov *et al.*, 1983). Por otro lado, se ha demostrado que la proteína ribosomal S3a se localiza en la protuberancia de la subunidad ribosomal 40S y aparentemente interactúa con los factores de iniciación eIF2, eIF3, el tRNA y el

mRNA así como con otras proteínas ribosomales (Bommer *et al.*, 1988; Lutsch *et al.*, 1993) Esta multitud de interacciones con factores involucrados en la traducción podrían explicar por qué c3 se encuentra secuestrado en el citoplasma, así mismo esto también sugiere que c3 se agrega o se acompleja con la partícula ribosomal en el citoplasma y no en el nucleolo.

El hecho de que las líneas transgénicas antisentido tengan un retraso en el desarrollo de 10 a 30 horas dependiendo de la línea transgénica independiente y que los adultos de estas líneas crecidos a 25°C tengan un tamaño menor que las moscas "silvestres" se puede explicar ya que se sabe que el promotor de la HSP 70 tiene transcripción basal o de fuga. El atraso en el desarrollo y la disminución del tamaño son características que recuerdan fuertemente al fenotipo "minute", estas mutantes representan un grupo de unos 50 genes repartidos a todo lo largo del genoma de *Drosophila* y en general se cree que son defectuosas en la maquinaria de síntesis de proteínas. Se ha demostrado que mutaciones en el gene de la proteína ribosomal rp49 causan un fenotipo "minute" (Konswan *et al.*, 1985). También se ha demostrado que la expresión de un transcrito antisentido del gene rp49 causa un fenotipo "minute" moderado (Patel y Jacobs-Lorena, 1992). También, llama la atención que no hayamos logrado observar un recrudescimiento del fenotipo "minute" cuando exponíamos a nuestras líneas transgénicas a choque térmico durante el desarrollo. Para esto existen dos explicaciones. 1) Las condiciones de inducción no fueron las correctas para observar un fenotipo en embriones, larvas, pupas

y adultos (sólo en ovarios observamos efecto). 2) La capacidad de suprimir a la proteína c3 del transcrito antisentido tiene un límite saturable y no importa si aumentamos la concentración de éste, de manera que sólo se ve el efecto en el tejido más sensible, es decir, los ovarios. Este fenómeno también fue observado por Quian *et al.*, (1988) cuando expresaron un transcrito antisentido anti rpA1 (ver más abajo).

Nuestros experimentos de supresión de c3 utilizando un transgene antisentido demostraron que esta proteína es necesaria para completar el proceso de la ovogénesis. La disrupción de la ovogénesis se debe aparentemente a que c3 cumple una función esencial en las células del epitelio somático folicular que cubre a las cámaras de huevo durante la ovogénesis donde el producto de c3 es particularmente abundante (Fig. 6 Reynaud *et al.*, 1997). La sensibilidad de la ovogénesis a una alteración de las células foliculares se debe a que éstas son críticas durante el desarrollo del ovario. Estas células sintetizan de manera muy activa componentes de la yema del huevo, generan señales morfogenéticas, protegen la homeóstasis de la cámara de huevo y finalmente sintetizan los componentes del corion (Spradling, 1993). Por otro lado se sabe que el ovario de *Drosophila* es el tejido con más ribosomas que se ha estudiado. Un huevo de *Drosophila* contiene alrededor de 5×10^{10} ribosomas y la mayoría de ellos son sintetizados *de novo* en algunas horas entre el estadio 8 y 10 de la ovogénesis. Como punto de comparación cabe mencionar que toma semanas producir 9×10^7 ribosomas en un huevo de ratón o meses en

sintetizar 7×10^8 ribosomas en un huevo de erizo de mar. Por esta misma razón el ovario de *Drosophila* es uno de los tejidos traduccionalmente más activos que existen (Qian *et al.*, 1988). De acuerdo a nuestros experimentos de supresión utilizando transcritos "antisentido", es fácil suponer que cualquier desbalance en el equilibrio de los componentes ribosomales del ovario debe tener un efecto más dramático en su homeóstasis que en el resto de los tejidos del organismo, apoyando así la hipótesis de que c3 codifica para la proteína ribosomal S3a.

La disrupción específica de la ovogénesis por la disminución de c3 no contradice la naturaleza ubicua de esta proteína, mas bien enfatiza la sensibilidad genética de éste proceso. Esta sensibilidad se debe a la naturaleza multifactorial de la diferenciación de las células germinales hacia gametos. Como ejemplos de estas interacciones cabe mencionar la relación entre las células somáticas y germinales, así como la síntesis de gradientes de morfógenos. Es de esperarse que casi cualquier mutación que afecte ligeramente la biología celular de la *Drosophila* tenga un efecto amplificado en la ovogénesis. Con la excepción de la abundancia de ribosomas en el ovario no existe *a priori* ninguna razón para suponer que una mutación en una proteína ribosomal genere un fenotipo específico en la ovogénesis, como ejemplo se sabe que mutaciones en el gene que codifica para la proteína ribosomal S6 generan tumores melanóticos en el tejido hematopoyético de la larva de *Drosophila*, asimismo, se sabe que la expresión desregulada de esta proteína está asociada a procesos tumorogénicos en

humanos (Watson *et al.*, 1992). Por otro lado, existen varios ejemplos en los que la disminución de una proteína ribosomal afecta a la ovogénesis: la expresión transcrito anti rpA1 (proteína ribosomal A1) bajo el control del promotor de "Hsp 70" de un afecta únicamente a la ovogénesis, generando huevos enanos que carecen de viabilidad, sin afectar el desarrollo larvario o pupario de la mosca. Es importante hacer notar la especificidad de la disrupción de la ovogénesis por el transcrito anti rpA1. La inducción intensiva del transcrito antisentido anti rpA1 cada 6 horas a todo lo largo del desarrollo embrionario, larvario y pupario no tuvo ningún efecto. Mientras que, en el caso de la ovogénesis un solo pulso de inducción del transcrito anti rpA1 de una hora en hembras jóvenes causa un retraso significativo en la oviposición, así como una disminución de un 70% en la producción de huevos de los cuales el 80% no es viable, en este mismo ejemplo la expresión del transcrito "sentido" tampoco causó un fenotipo (Quian *et al.*, 1988). Por otro lado la mutante "*string of pearls*" (*sop*) corresponde a mutaciones en el gene de la proteína ribosomal S2. En esta mutante las moscas sufren de un pequeño retraso en el desarrollo (fenotipo "minute"), además, es un gene recesivo que causa esterilidad en hembras. La esterilidad se debe a que afecta específicamente el desarrollo de los ovarios, causando que los ovariolos queden detenidos en el estadio 5 de la ovogénesis (Cramton and Lasky 1994). La expresión de un transcrito antisentido anti-rp49 además de causar un fenotipo "minute" también hace que disminuya de manera reversible la

producción de huevos en moscas portadoras de este transgene (Patel y Jacobs-Lorena, 1992). Por otro lado Dej y Spradling (1997) reportaron que el gene *ziti* codifica para la proteína ribosomal rpL15. Normalmente los núcleos de las células nodrizas son politénicos hasta el estadio 4 y después siguen volviéndose más poliploides aunque la estructura politénica desaparece. Mutaciones en *ziti* hacen que los cromosomas politénicos no desaparezcan, esto evita que las células nodrizas vacien completamente su contenido en el huevo, causando así, esterilidad femenina.

Ejemplos de otras mutaciones en genes ribosomales que también afectan a la ovogénesis son: proteínas de adhesión celular como la fasciclina III, proteínas del citoesqueleto como la profilina (*chickadee*), la tubulina y el gene *bag of marbles* que codifica para una proteína de función desconocida que no tiene homólogos conocidos y a la que se le ha propuesto como función la de factor de diferenciación del cistoblasto. Existen muchos otros genes de origen muy diverso que afectan de una manera u otra la ovogénesis subrayando la vulnerabilidad de este proceso a mutaciones (Spradling, 1993).

Epistasia y la dinámica de los sistemas complejos; una visión alternativa del ribosoma. *A priori* podríamos pensar que mutaciones que afecten la función del ribosoma producirían un fenotipo más o menos consistente, es decir, cualquier mutación en cualquier proteína ribosomal produciría el mismo fenotipo generalizado (disminución en la capacidad de síntesis de proteínas). Esto es superficialmente cierto ya que está

demostrado que mutaciones en diversas proteínas ribosomales causan un fenotipo "minute". Sin embargo, a un nivel más profundo o detallado esto no se cumple, como es evidente en el desarrollo del ovario donde distintas mutaciones en proteínas ribosomales afectan de manera específica distintos procesos (ver Tabla 1). En este sentido cabe preguntar ¿Por qué mutaciones en distintas proteínas ribosomales afectan procesos distintos, específicos y discretos durante la ovogénesis, en lugar de causar retrasos o degeneraciones inespecíficos? Hasta donde sabemos no hay una respuesta a esta pregunta y por lo tanto consideramos que es muy interesante generar un modelo, aún cuando este sea netamente especulativo, que pueda servir de base para explicar éste fenómeno. El modelo que nosotros queremos presentar está basado en simulaciones numéricas sobre la capacidad de adaptación de sistemas cibernéticos altamente correlacionados, como son autómatas celulares y redes booleanas (Kauffman, 1993).

La epistasis y el ribosoma: en el contexto de este problema tenemos que definir epistasis como el nivel de correlación entre los componentes de un sistema complejo, en estos sistemas los distintos componentes pueden tener o no distintos niveles de correlación entre ellos. Un sistema complejo altamente correlacionado (es decir altamente epistático) podría ser para fines de esta discusión un ecosistema, un organismo multicelular, una célula, un ribosoma, una proteína o incluso una red booleana. En estos sistemas cuando un componente es removido o "mutado" el efecto de esta "remoción"

normalmente tiene un efecto pleiotrópico y, sin embargo, este efecto es restringido debido a que otros componentes del sistema se adaptan hasta cierto punto, de tal manera que el sistema ya nunca llega al mismo nivel de adecuación (o "fitness") que el silvestre pero tampoco pierde toda su actividad. La magnitud de la pleiotropía de la mutación está determinada por el número de interacciones epistáticas que tiene un componente con los otros componentes del sistema, de tal manera que al aumentar el número de interacciones (o el nivel de correlación), más pleiotrópico será el efecto de la mutación.

En nuestro caso el ribosoma es un magnífico ejemplo de un sistema muy epistático (muy correlacionado y con muchos componentes). El ribosoma es epistático a dos niveles, el más profundo es la relación de los componentes individuales del ribosoma con todas las otras partes de sí mismo. El otro nivel es celular, donde el ribosoma está directamente conectado con todos los componentes proteicos de la célula al ser el catalizador de su síntesis.

Dentro de lo dicho anteriormente c_3 es una proteína interesante ya que nosotros tenemos a una parte de un componente crítico para el funcionamiento general de la célula (el ribosoma) pero su depleción solamente afecta procesos muy específicos (ovogénesis) y como ya se mencionó en la discusión no es el único caso en el que distintas mutaciones afectan solamente de manera específica la conducta del sistema (ver tabla 1.).

¿Como podemos explicar este fenómeno en el contexto de los sistemas complejos? Cuando nosotros tenemos una mutación en una proteína ribosomal, dependiendo de su nivel particular de epistasis, la mutación causa en mayor o menor grado, que el ribosoma sea menos eficiente para traducir mRNAs en general, y sin embargo todavía es funcional. De manera que el animal se mantiene vivo (aunque sea "minute"). Mutaciones en distintas proteínas afectan de manera diferencial la eficiencia de traducción de diferentes familias de mRNAs, que sin embargo, siguen siendo traducidos. Estas familias a su vez están involucradas en procesos críticos que necesitan umbrales mínimos de sus productos proteicos. La consecuencia de esta cascada de eventos es que nosotros vemos un fenotipo específico que enmascara el efecto pleiotrópico de la mutación, el cual es diluido por la "adaptación" de los otros componentes ribosomales. Para los ejemplos mencionados en la tabla 1, nuestro modelo predice que las proteínas deben de tener un nivel de epistasis relativamente bajo aunque significativo (para S3a se sabe que interacciona con al menos cuatro componentes involucrados en la traducción: eIF2, eIF3, tRNAs y mRNAs) (Bommer *et al.*, 1988; Lutsch *et al.*, 1993) ya que de ser mayor simplemente serían letales. Así mismo el modelo también explica por qué la ovogénesis es muy sensible a cualquier mutación ya que este proceso es en sí mismo muy complicado e implica una gran cantidad de interacciones, es decir es muy correlacionado y por lo tanto afectado por casi cualquier mutación.

Todas estas ideas son sólo un intento de modelo que evidentemente está incompleto, muy probablemente sea erróneo y superficial, sin embargo son ideas que permiten emitir hipótesis nuevas por lo que vale la pena tenerlas en cuenta.

Tabla 1.- Diversos fenotipos de mutaciones de distintas proteínas ribosomales.

Proteína ribosomal:	Fenotipo:	Referencia:
S3a (c3)	La expresión del antisentido causa pérdida de las células foliculares, deslocalización de los núcleos de las células nodrizas, degeneración del ovariolo y un fenotipo "minute moderado.	Reynaud <i>et al.</i> , 1997
S2	"String of pearls" detención del desarrollo del ovario específicamente en el estadio 5 de la ovogénesis, "minute" moderado.	Cramton and Lasky 1994.
rpA1	Expresión del antisentido produce huevos enanos no fértiles. No minute	Quian <i>et al.</i> , 1988.
rp49	Expresión del antisentido disminuye la producción de huevos y un fenotipo "minute moderado. Primera proteína ribosomal demostrada como causante de un fenotipo "minute".	Patel y Jacobs-Lorena 1992.
L15	No disgregación de los cromosomas politénicos después del estadio 4 de la ovogénesis y esterilidad materna. No "minute"	Dej <i>et al.</i> , 1997
S6	Tumores melanóticos en el tejido hematopoyético. No "minute"	Watson <i>et al.</i> , 1992.

VII.-Conclusiones:

En conjunto nuestros datos apoyan la hipótesis de que c3 codifica para la proteína S3a de la subunidad ribosomal pequeña. El hecho de que la concentración de transcrito y de proteína sean constantes a lo largo de todo el ciclo de vida de la *Drosophila* es compatible con el patrón esperado para una proteína ribosomal constitutiva como rp49 que usualmente se le utiliza como transcrito constitutivo control en *Drosophila*. Así mismo, el enriquecimiento del producto de c3 en ribosomas intactos (80S) y en la partícula ribosomal pequeña (40S) pero no en la grande (60S) confirman la hipótesis de que esta proteína corresponde a S3a. Como ya se mencionó antes, el fenotipo "minute" se asocia generalmente con una disminución de la función de proteínas ribosomales, éste fenotipo se observó en moscas portadoras del transgene "antisentido" anti-c3; en moscas que sobre-expresan c3 (líneas sentido) no se observó ningún fenotipo. Es bien sabido que en general el exceso de proteínas ribosomales no incorporadas a partículas ribosomales no causa fenotipo ya que son degradadas muy rápidamente. Además, el hecho de que la inducción del transcrito sólo afecte al ovario que es el tejido con más ribosomas que se conoce y que es muy sensible a cualquier desbalance metabólico, también sugiere que c3 sea una proteína ribosomal. Cabe resaltar que resultados análogos fueron obtenidos por otro grupo expresando un antisentido para la proteína ribosomal rpA1 (Quian *et al.*, 1988).

Analizando los datos retrospectivamente, era muy probable que aisláramos a una proteína ribosomal dado el tipo de selección que utilizamos, ya que un "tamizado diferencial" es un método para aislar transcritos específicos pero abundantes en un tejido, en este caso ovarios de mosquito, que es un tejido particularmente activo en la síntesis *de novo* de ribosomas (Besansky, 1992).

Es paradójico y reconfortante que si bien *c3* es una proteína ribosomal constitutiva el efecto más evidente de su supresión se observa en el tejido de donde originalmente se aisló como un transcrito enriquecido, el ovario, aún estudiando este efecto en un organismo distinto. Por otro lado, se debe resaltar la utilidad de la expresión de transcritos antisentido en el análisis de la función de un producto génico, sin perder de vista que la supresión del transcrito por el antisentido nunca es completa. Es también interesante hacer notar lo difícil que es predecir el efecto de una deficiencia o supresión en la dosis génica de cualquier gene, aún incluso, en genes constitutivos y abundantes como una proteína ribosomal. Y por último, es prudente proponer al ovario de *Drosophila* como un tejido pre-sensibilizado para estudiar el efecto fenotípico de muchas mutaciones.

VIII.-Bibliografía:

- Ashburner, M. 1989.** *Drosophila* Laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.1029-1030.
- Atherton, D., and J. Gall. 1972.** Salivary gland squashes for *in situ* nucleic acid hybridization studies, *Drosophila inf. service.* 49:131-133.
- Auclair, D., B.F. Lang, P. Forest, and L. Desgroseillers. 1994.** Analysis of genes encoding highly conserved lysine-rich proteins in *Aplysia californica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 220:997-1003.
- Ausubel F. y otros. 1994.** Current protocols in molecular biology John Wiley and Sons, Inc. pp.16.7.1-16.7.5
- Besansky, N., J. Finnerty, and f.H. Collins. 1992** Molecular perspectives on the genetics of mosquitoes.
- Bradford, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brennan, M.D. A.J. Weiner, T.J. Goralski, and A.P. Mahowald. 1982.** The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 89:225-236.

- Birnie, G. D. 1972. Subcellular components: preparation and fractionation, 2th. ed. University Park Press, Baltimore.**
- Bodestein D. 1950. The post embrionic development of *Drosophila*. *Biology of Drosophila Facsimile edition* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994. p. 304-306.**
- Bommer, J. Stahl, A. Henske, G. Lutsch, and H. Bielka, 1988. Identification of proteins of the 40S ribosomal subunit involved in interaction with initiation factor eIF-2 in the quaternary initiation complex by means of monospecific antibodies. *FEBS Lett* 233: 114-8**
- Burnette, W.N. 1981. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.**
- Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 244:1288-1292.**
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.**
- Collatz e., N. Ulbrich, K. Tsurugi, H. N. Lightfoot, W.**

Mackinlay, A. Lin, and I. Wool. 1977. Isolation of Eukaryotic ribosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 252: 9071-9080.

Cramton S. E., and Laski F. A. 1994. String of pearls encodes *Drosophila* ribosomal protein S2, has *Minute*-like characteristics, and is required during oogenesis. *Genetics.* 137:1039-1048.

Dej K. and Spradling A., 1997. 38th Annual *Drosophila* Research conference, program and abstracts volume pp:8.

Fleischman, R D., and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269:496-512.

Flemming G. 1986. Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas. Organización Mundial de la Salud. Washington D.C.

Foe V., Odell G. M., and Edgar B. A. 1993. Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo. The Development of *Drosophila melanogaster*. Bates, M., Martínez-Arias, A. Editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, pp.301-324.

Garret, J.M., K. K., Singh, R.A., Vonder Haar, and S.D. Emr.

- 1991. Mitochondrial protein import: isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* MFT1 gene. *Mol. Gen. Genet.* 225:483-491.**
- Gordon, H. M., G. Kucera, R. Salvo, and J. M. Boss. 1992. Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair and metabolism in murine fibroblasts. *J. Immun.* 148:4021-4027.**
- Greenspan R.J. 1997. Fly Pushing. The theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York pp. 12-17.**
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.53-138.**
- Hagedorn, H. H., J. E. Shapiro, and Hanaoka, K. 1979. Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature* 282: 92-94.**
- Handke-Kociok, M., and W. Liebrich. 1986,. A simple method for staining chromosomes in whole embryos of *Drosophila*. *Drosophila Inf. Service* 3:142.**
- Heimer, G.V., and C.E.D. Taylor. 1974. Improved mountant for immunofluorescence preparations. *J. Clin. Pathol.* 27: 254-256.**

- Hotchkiss, P.G., and Fellon, A.M. (1987). Ribosome metabolism during the vitellogenic cycle of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Biochim. Biophys. Acta.* 924:352-359.**
- Ito, M., H. Kodama, and A. Komamine. 1991. Identification of a novel S-phase specific gene during the cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells. *The Plant J.* 1(2):141-148.**
- Ito M., A. Yasui., and A. Komamine . (1992) A gene family homologous to the S-Phase specific gene in higher plants is essential for cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 301:29-33.**
- Ito M., A. Yasui. and A. Komamine. (1993) Precise mapping and molecular characterization of the *MFT1* gene involved in import of a fusion protein into mitochondria in *Saccharomyces servisiae*. *FEBS* 320:125-129.**
- Ito M., S. Tsutomu, H. Fukuda, and A. Komamine. 1994. Meristem-specific gene expression directed by the promoter of the S-phase-specific gene *cyc07*, in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 24:863-878.**
- Kauffman S.A. 1993. The origins of order. Oxford University Press. pp173-281.**

- Kho, C.J., and H. Zarbl. 1992. *Fte-1* a *v-fos* transformation effector gene, encodes the mammalian homologue of a yeast gene involved in protein import into mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:2200-2204.**
- Kidou S., M. Umeda, T. Tsuge, A. Kato, and H. Uchimiya. 1994. Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the S-phase-specific *cyc07* gene. *Plant Mol. Biol.* 24:545-547.**
- Kogan, P.H. (1990). Differential effects of limiting polyamine synthesis on expression of RNAs during vitellogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. *Molecular insect science*. (H.H. Hagerdorn, Hildebrand, M.G. Kidwell, and J.H Law, editores), p326. Plenum Press, New York.**
- Koller, C.N., Dhadialla, T.S.A., and Raikel, A.S. (1990). An *in vitro* study of vitellogenin endocytosis by oocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Molecular insect science*. (H.H. Hagerdorn, Hildebrand, M.G. Kidwell, and J.H Law, editores), p327. Plenum Press, New York.**
- Kongsuwan, K., Yu, Q., Vincent, A., Frisardi, M.C., Roshbash, M., Lengyel, J.A., and Merriam, J. (1985) A *Drosophila* Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature* 317: 555-558**
- Kuhn, T.S. (1970) The structure of scientific revolutions. *University of Chicago Press.***

- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.**
- Lea, A.O., and Brown, M.R. (1990). Neuropeptides in mosquitoes. *Molecular insect science*. (H.H. Hagerdorn, Hildebrand, M.G. Kidwell, and J.H Law, editores), p181-188. Plenum Press, New York.**
- Lee, J.K., R.S. Coyne, R.R. Dubreuil, D. Branaton, and L. S. B. Goldstein. 1993. Cell shape defects in α -spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 123:1797-1809.**
- Liang P., and A. B. Parde. 1992. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.**
- Liao, D. and P. P. Dennis. 1994. Molecular phylogenies based on ribosomal protein L11, L1, L10, and L12 sequences. *J Mol Evol* 38: 405-419.**
- Lin, J.X., and J. Vilcek. 1987. Tumor necrosis factor and interleukin-1 cause a rapid and transient stimulation of *c-fos* and *c-myc* mRNA levels in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262:11908.**

- Lindsley D. L., and G. G. Zimm . 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic press. pp.441.
- Lutsch G., J. Stahl, H. J. Kargel, F. Noll, and H. Bielka,1990. Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver. *Eur J Cell Biol* 51: 140-50.
- McKearin D., and A.C. Spradling. 1990. Bag of marbles a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. *Genes Dev.* 4:2242-2251
- Metspalu, A. A. Rebane, S. Hoth, M. Pooga, J. Stahl, and J. Kruppa. 1992. Human ribosomal protein S3a: cloning of the cDNA and primary structure of the protein. *Gene.* 119:313-316.
- Mohler, J. and E.F. Weischaus. 1986, Dominant maternal-effect mutations of *Drosophila melanogaster* causing the production of double abdomen embryos. *Genetics* 112:803-822.
- Osborn, M., and K. Weber. 1982. Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies:Tubulin containing structure. *Methods Cell Biol.* 24:97-132.
- Patel R., and M. Jacobs-Lorena. 1992. Generation of *Minute*

phenotype by a transformed antisense ribosomal protein gene. *Dev. Gen.* 13:256-263.

Quian S., S. Hongo, and M. Jacobs-Lorena. 1988. Antisense ribosomal protein gene expression specifically disrupts oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:9601-0605.

Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S., Cho, W.L., Hays, A.R., and Koller, C.N. (1990). Biosynthesis and endocytosis of yolk proteins in the mosquito. *Molecular insect science*. (H.H. Hagerdorn, Hildebrand, M.G. Kidwell, and J.H. Law, editores), p147-154. Plenum Press, New York.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., G. G. Brownlee, and B.G. Barrell. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463.

Santon B., and M. Pellegrini. 1980. Expression of ribosomal proteins during *Drosophila* early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:10;5649-5653.

Seed, B. 1982. Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and

diazonium substituted supports. In Genetic engineering: Principles and methods. J.K. Setlow and A. Hollaender, vol. 4, p.91. Plenum Publishing, New York.

Smith, D.B. 1993. Purification of glutathione-S-transferase fusionproteins. *Methods Mol.Cell Biol.* 4:220-229.

Spradling, A.C., 1993. Developmental genetics of oogenesis. The Development of *Drosophila melanogaster*. Bates, M., Martínez-Arias, A. Editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, pp. 1-70.

Spradling, A.C., and G. M. Rubin. 1982. Transposition of cloned P-elements into *Drosophila* germline chromosomes. *Science* (Wash. DC). 218:341-347.

Todorov, I. T., F. Noll and A.A. Hadjiolov. 1983. The sequential addition of ribosomal proteins during the formation of the small ribosomal subunit in Friend erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* 131:271-275.

Wang D., H. Umekawa, and M.O. Olson. 1993. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell. Mol. Biol. Res.* 39(1):33-42

Watson K. L., K. D. Konrad, D. F. Woods, and P. J. Bryant. 1992.

***Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11302-11306.**

Wilkinson-Sproat, J. and Wohldman, P. 1994. The *C. elegans* genome project: Contiguous nucleotide sequence of over two megabases from chromosome III *Nature* 368, 32-38.

Wisconsin GCG sequence analysis software: Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, September 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711

Zheng, L., Saunders, R.D.C, Fortini, D., Della Torre A., Coluzzi, M., Gover, D.M., and Kafatos, C. F. (1991) Low resolution genome map of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88; 11187-11191.

Zurita M., E. Reynaud, , and F.C. Kafatos. (1997) Cloning and characterization of cDNAs preferentially expressed in the ovary of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 6(1); 55-62.

Apéndice:

A) Cloning and characterization of cDNAs preferentially expressed in the ovary of the mosquito, *Anopheles gambiae*.

M. Zurita, E. Reynaud and F.C. Kafatos. 1997 Insect molecular biology 6(1), 55-62

B) Antisense suppression of the putative ribosomal protein S3a gene disrupts ovarian development in *Drosophila melanogaster*.

E. Reynaud, V. Barajas, V. N. Bolshakov, F.C. Kafatos, M. Zurita. 1997. Molecular and general genetics. In press.

Cloning and characterization of cDNAs preferentially expressed in the ovary of the mosquito, *Anopheles gambiae*

M. Zurita,^{1,2} E. Reynaud¹ and F. C. Kafetsos^{2,3}

¹Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

²Department of Cellular and Developmental Biology, Harvard University, Massachusetts, USA, and

³European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany.

Abstract

We used differential screening to isolate from an ovarian cDNA library two expressed sequences that are enriched substantially in ovaries of blood-fed female *Anopheles gambiae*, as compared to female carcass and male mosquitoes. One of these clones encodes an isoform of histone H2B, whose transcript is polyadenylated at the 3' end. The other cDNA clone encodes a protein that is highly conserved in evolution and has been implicated in growth control although its function is still obscure. Both genes can be used to study gene activation during *An. gambiae* oogenesis.

Keywords: *An. gambiae*, ovary, histones, cDNA clones.

Introduction

Malaria continues to be a major public health problem in tropical areas of the world. The mosquito *Anopheles gambiae*, the primary vector of human malaria in Africa, is responsible for approximately a million deaths per year (Garham, 1988; Warrell *et al.*, 1990). Other species of the same genus (e.g. *An. albimanus*) are also important malaria vectors in other tropical regions of the world (Rodriguez *et al.*, 1995). Despite its significance in disease transmission, the *Anopheles* mosquito has only recently been studied using molecular biological techniques. Research in *Anopheles*

molecular genetics has included continuing efforts to achieve a convenient DNA transformation procedure, generation of physical and genetic maps, and the cloning and characterization of carefully selected genes (Crampton *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991, 1993; Muller *et al.*, 1995). In this work we report the cloning of two genes preferentially expressed during *An. gambiae* oogenesis.

Oogenesis is one of the most interesting biological processes in terms of development and physiology. Many mosquitoes, including *An. gambiae*, require a vertebrate blood meal to initiate the oogenesis process. Initiation is a complex physiological response in which the nervous system is stimulated to produce hormones that apparently act directly on the ovary (Hagedorn *et al.*, 1979; Wheelock & Hagedorn, 1985; Cho *et al.*, 1995). In parallel, digestion of the blood in the midgut activates the production of large amounts of vitellogenin in the fat body, which eventually triggers the vitellogenic growth of the oocyte (Bohm *et al.*, 1978; Borovsky *et al.*, 1985). These physiological processes may present opportunities for novel methods of vector control. In this work we report the cloning and characterization of two cDNA clones corresponding to transcripts that are substantially enriched in the ovary of blood-fed *An. gambiae*.

Results and Discussion

Identification of cDNA clones preferentially expressed in the ovary of *An. gambiae*

Approximately 100,000 independent recombinant clones from a cDNA library made with polyA⁺ RNA from adult females 48 h after a blood meal were used in a typical differential screening experiment (St John & Davis, 1979). cDNA made from polyA⁺ RNA from ovaries was used as positive probe and several clones were identified (data not shown). Two of these clones (numbered 3 and 8) were analysed in Northern blot experiments to confirm that the transcripts are enriched in total RNA from ovary compared to total RNA from females minus ovaries or total RNA from

Received 29 February 1996; accepted 29 May 1996. Correspondence: Dr Mario Zurita, Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 6221, Cuernavaca, Morelos, México.

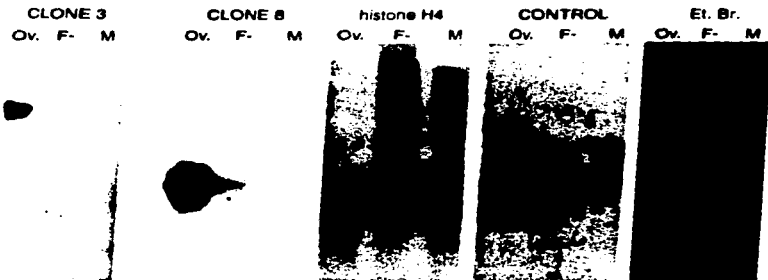


Figure 1. Northern blot experiments using as probes the indicated cDNA clones, isolated from an *An. gambiae* ovarian cDNA library. Probes were hybridized against agarose blots bearing total ovarian RNA (lanes indicated as Ov.); total RNA from females minus ovaries (lanes indicated as F.); and total RNA from males (lanes indicated as M). The ovarian RNA used in this experiment is the same used in cDNA library construction (48 h post blood meal). This histone H4 panel is the hybridization of the blot with a specific synthetic H4 oligonucleotide (5'-AAGCGTCATCGTAAAGTT-3'). The control panel was hybridized with a probe (clone 1) that is not differentially expressed according to multiple experiments. To normalize the signals in the three RNA preparations, the Et.Br. panel shows the RNA agarose gel used in these hybridizations stained with ethidium bromide.

males (Fig. 1). After normalization with a control cDNA as well as with the ribosomal RNA, the RNAs that correspond to clones 3 and 8 appear to be about 20 and 40 times, respectively, more abundant in the ovary than in the other preparations. Considering the substantial differential expression of RNAs that correspond to clones 3 and 8, we investigated the nature of the products encoded by these two genes.

Sequence analysis and genomic organization of clone 3

Clone 3 is 1054 bp in length and contains an open reading frame of 268 amino acids, beginning with a methionine at nucleotide 31 (Fig. 3). A stop codon upstream of the first ATG in the same frame suggests that the cDNA clone contains all the protein-coding sequence. Some interesting characteristics are evident in the ORF of clone 3. It contains a high number of basic amino acid residues (18%), especially in clusters within the amino-terminal region. A putative nuclear localization signal is present between amino acid positions 221 and 224.

A search of GenBank showed that similar genes have been cloned from other organisms (yeast, plants and vertebrates), and that clone 3 encodes a protein highly conserved in evolution. The highest identity, 70%, is with its mouse homologue (Fig. 4).

Several functions have been postulated for the product of the C3 gene. Ito *et al.* (1991) and Fekuda *et al.* (1994) proposed that the protein has a role in the control of the S phase of the cell cycle in plants. Two

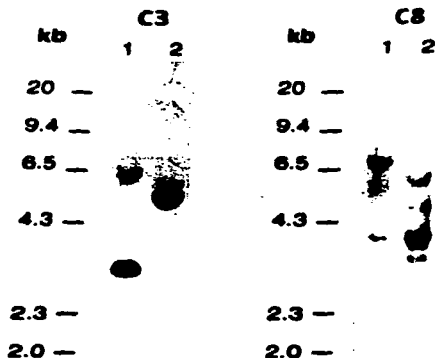


Fig. 2. Southern blot experiments of total *An. gambiae* genomic DNA (about 10 µg per lane) hybridized with clones C3 or C8 as probes. Lane 1, DNA digested with *EcoRI*; lane 2, DNA digested with *HindIII*.

```

1/
TTT TTT TTT TTT TTA TCG ZGA AGT GTA ACC ATG CCG GTC GGC AAA AAT AAG GGT GTC TCG
31/31
met ala val gly lys asn lys gly val ser
61/61
AAA GGA GGT AAG AAA GGT TCC AAA AAG AAG GTC GTG GAT CCG TTC ACC CCG AAG GAT TCG
91/91
lys gly gly lys lys gly ser lys lys lys val val asp pro phe thr ser lys asp trp
121/121
TGC GAT GGG AAG GGC CCG AAC ATG TTC AAG AAC CCG CAG TCC GGC AAA ACC TTG GTT AAC
151/151
lys asp val lys pro asn met phe lys asn arg gin ser gly lys thr leu val asn
181/181
CCT ACC CAG GGC ACC AAA ATC GCC TCG GAC COT CTG AAG GGC CCG GTG TTT GAG GTG TCG
211/211
arg thr phe gly thr lys ile ala ser asp gly leu lys gly arg val phe glu val ser
241/241
TTG GTC GGC CTG CAG AAC GAG CCC GAT CCG GAG AGA TTT TFC CCG AAG TTC AAG CTG GTG
271/271
leu ala asp leu gin asn glu pro asp ala glu arg ser phe arg lys phe lys leu val
301/301
GCG GAG AAT GTG AAC GGC COT GAT GTC CTT ACC AAC TTC CAC GAT ATG GCG TTG ACC ACC
331/331
ala glu asp val asn gly arg asp val leu thr asn phe his gly met ala leu thr thr
361/361
GAC AAG CTG CGA TCC ATG GTC AAT AAA TCG GAA ACC CTG ATC GAG TGC TCG GTC GAC GTC
391/391
asp lys leu arg ser met val asn lys trp gin thr leu ile glu cys ser val asp val
421/421
AAG ACC GGC GAT GTC ATG CTG CCG GTG TTC TCC ATC GGC TTC ACC ATC AAG GAC TCG
451/451
lys thr thr asp gly phe met leu arg val phe cys ile gly phe thr lys asp ser
481/481
ATG TCG CAG GGC AAG ACC TCC TAC GCC CAG CAG TCG CAG ATC AAG AAC ATT CCG CCG AAG
511/511
asp ser ala arg lys thr cys tyr ala gin his ser gin ile lys asp ile arg ala lys
541/541
ATG ACG GGC ATC ATC AAG COT GAA ATC ACC ACC ACC GAT CTG AAG GGT TTT GTG GAG AAG
571/571
asp thr ala ile ile lys arg glu ile thr ser thr asp leu lys gly val val glu lys
601/601
CTG CTG GGC ACC TCG ACC GCC AAG GAT ATC GAG AAG CCG TCC CAG CTG TAC CCG CTG
631/631
leu leu pro asp ser ile ala lys asp ile glu lys ala cys gin val val tyr pro leu
661/661
CAC GGT GTC TAC ATC CCG AAG GTG AAG GTG CTG AAG AAG CCG CGA TTC GAT CTG TCC AGT
691/691
his asp val tyr ile arg lys val lys val leu lys pro arg phe asp leu ser ser
721/721
CTG AAG GAA TTC CAG GGA GAT GGC GGC ACC ACC GCT OCT GAA GTG TCC ACC GGT GGC GCT
751/751
leu met glu leu his gly asp gly gly lys ala ala glu val ser thr gly ala ala
781/781
TCC GGT GTC GTC GTC COT CCG GAA GGC TAC GAA CCA CCA GTA CAG GCA TCC GGT TAA
811/811
ser gly val val val val arg pro glu gly tyr glu pro pro val gin ala ser val cys
841/841
ATA TCT GCG CAG ATG CTC CAG CCG TGT TGA GGG GGT GGT COT GAA AAA TGT CAG CCC ACC
901/901
AAC CAT GTG CTG GAT GAT CCG GTC TCG TTT GAC TAC ATC TAA TTT CCA ACA ACT ATA GGA
931/931
961
GTG TGT TTT AAG CAG CGA GGA ACC GAG AGA GAG AAA GAG AAA GAA GAA ACC TTC GAC ACC
991
1021
TTC TGT ACC GGG AAA AAA AAA AAA AAA AAA
1051

```

Figure 2. Nucleotide sequence of clone 3 cDNA and its predicted amino acid sequence. Clone 3 cDNA is 1054 bp long and contains an open reading frame of 269 amino acids that extends from nucleotides 31 to 837. Numbers before and after a solidus identify nucleotide and amino acid positions, respectively. A TGA codon near the start of the sequence (underlined) suggests that the methionine at nucleotide 31 is the initiator amino acid. Near the 3' end a putative atypical polyadenylation signal is underlined and is followed twenty-three nucleotides later by a poly A tail. GenBank accession number X39188.

closely related genes are present in the *Saccharomyces cerevisiae* genome, and simultaneous disruption of both has an effect on yeast cell proliferation (Ito *et al.*, 1992). The similar genes from humans and mice have been reported as effectors of the *fos* oncogene in tissue culture cells (Kho & Zarbi, 1992). Cultured cells in which the C3 homologue has been disrupted are not transformed when the *fos* oncogene is activated. However, Metspalu *et al.* (1992) identified the same human gene as one similar to that which encodes ribosomal protein S3a. These hypotheses could be tentatively reconciled by speculating that a ribosomal protein or a protein that binds to the ribosome is important for cell growth, and that its transcription is activated (directly or indirectly) by the product of the oncogene *fos* in mammalian cells. A more detailed analysis of the different possible roles of this gene in

different cellular processes is necessary; model systems such as yeast and *Drosophila*, in which mutants can be used in parallel with biochemical assays, should help define its function.

The genomic organization of clone 3 was determined by Southern blot experiments such as those shown in Fig. 2, in which total mosquito DNA was digested with two different restriction enzymes and blot hybridized against clone 3. The single 5 kb *HindIII* fragment that hybridizes with the probe suggests that this gene is present only in one copy in the *An. gambiae* genome; similarly, most of the mRNA sequence is contained within a 3 kb *EcoRI* fragment. A Southern blot containing in each lane a pool of DNA representing an individual division of the *An. gambiae* nurse cell polytene chromosomes (Zheng *et al.*, 1991) was hybridized with clone 3. The results showed that


```

1/      TTT CCG AGA ATT TCA TCT GTT CTC CTG CAA      31/
AAA      ACA CGT CCG CTC AGC TCG AAG TCC CAA AGC
61/      AAT ATG CCC CCG AAG ACC AGC GGC AAG GCA      91/10
met pro pro lys thr ser gly lys ala      GCT AAG AAG TCC GGC AAG GCG CAG AAG AAC
121/30     ATC TCC AAG TCG GAC AAG AAG AAG AAG CCG      151/30
ile ser lys ser asp lys lys lys lys arg      AAG ACC CCG AAG AGA GCT ACG CCC ATC TAC
181/40     ATC TAC AAG GTG CTG AAG CAG GTG CAC CCG      211/50
ile tyr lys val leu lys gin val his pro      GAC ACC GGC ATT TCC TCC AAG GCG ATG AGC
241/60     ATC ATG AAC AGC TTC GTG AAC GAC ATC TTC      271/70
ile met asn ser phe val asn asp ile phe      GAG CCG ATC GCG CCG AAG TCC CCG CTG GCG
301/80     CAC TAC AAC AAG CCG TCC ACC ATC ACG TCC      331/90
his tyr asn lys arg ser thr ile thr ser      CCG GAG ATC CAG ACG GCG GTG CGA CTG TTG
361/100    CTC CCC GGC GAG CTG GCC AAG CAC GCC GTG      391/110
leu pro gly leu leu ala lys his ala val      TCC GAG GGC ACC AAG GCC GTC ACC AAG TAC
421/130    ACC ACT TCC AAG TAA CCG ATG GGG GGA CCG      451/
thr ser ser lys och      TGG ACT GGA GGC TGT GTG CAC GGT CAT GGA
481/      ACG CCG GAC GAC TAC CCA GGA TGA GTG TGT      511/
OAG CCA GAA AGA GAC CAG TTC CGT GTG CAG
541/      TAG CGT CAC GTA CAC CCG TAT TGA GTC TAG      571/
CTG TTA AGC TGT TCT CCT ACG TGT AAG TTA
601/      GCG CCG TCG ACA CAA TTT ATC ATC TAA CAC      631/
CAC CTA CTA CAG AGA TAA TTA TTG AAT GCG
661/      TCT AAA CTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA      691/
AAA AAA AAA

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of clone 8 and its predicted amino acid sequence. Clone 8 is 688 bp long and contains an open reading frame of 123 amino acids extending from nucleotides 64-432. A putative polyadenylation signal is underlined. GenBank accession number X8788.

clone 3 maps in division 15B of the second chromosome of *An. gambiae*. This was confirmed by *in situ* hybridization to nurse cell polytene chromosomes (data not shown).

Sequence analysis and genomic organization of clone 8

Clone 8 is 688 bp in length. A methionine at nucleotide 64 (Fig. 5) starts an open reading frame of 123 aa, which appears to represent the total protein coding sequence (see below). The encoded protein shows clear similarity with histone H2B from other organisms, and is most similar to histones H2B from other insects (Fig. 6). Nevertheless a few highly conserved residues in H2B histones are variant in clone 8 (five asterisks in Fig. 6). Moreover, twenty-eight contiguous adenines at the 3' end of clone 8 indicate that the transcript is polyadenylated. The clone 8 transcript is substantially enriched in poly(A⁺) RNA preparations, confirming that the c8 transcript is polyadenylated (data not show). In contrast, it is well documented that histone transcripts that

encode the major nucleosome core components are not polyadenylated at the 3' end (Cheng *et al.*, 1989). Moreover, using clone 8 as a probe for Northern blots, the H2B-like transcript levels are very low in other tissues as compared with the ovary; in contrast, when we hybridized a similar Northern blot with a synthetic oligonucleotide that recognizes a DNA sequence present in all H4 histones, we identified a transcript of the size corresponding to the H4 mRNA in all adult RNA preparations (Fig. 1). The H4 transcript is relatively more abundant in the ovary RNA preparations; however, it is not as dramatic as for the c8 transcript. These results suggest that the RNA encoded by clone c8 is an isoform more abundant in the ovary than in other adult tissues.

Histone genes are known to be regulated either in a replication-dependent or in a replication-independent fashion (Marzluff & Pandey, 1988). Interestingly, it has been reported that some histone cDNAs, which are not expressed in the S phase of the cell cycle, and are in

		1		60
Duck		MPEPAKSA PAPERKSGSKAVTKTKQKGGDKRRKRSRKESYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Gallus		MPEPAKSA PAPERKSGSKAVTKTKQKGGDKRRKRSRKESYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Rat		MPEPAKSRPAPKPKSGSKAVTKAQRKGGDKRRKRSRKESYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Xenopus		MPPDPAKSA PAAPKPKSGSKAVTKTKQKGGDKRRKRSRKESYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Trout		MPEPAKSA P. . . KEGSKAVTKTAGKGGDKRRKRSRKESYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Psamechinus		MPAKQPSQGAARKAG. SA. . . GRPAGASRTRRRKRSRKESYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Chironomus		MAAPPTSGAARKAG. SAQAISKDDSDRRRRKRSYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Drosophila		M. . . PPTSGAARKAG. SAQAISKDDSDRRRRKRSYSYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
Anopheles		M. . . PPTSGAARKAG. SA. . . IONISKDDSDRRRRTRKRAITPIYIYVKVLQVHPDQTGISKAM		
			
		61		120
Duck		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Gallus		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Rat		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Xenopus		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Trout		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Psamechinus		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Chironomus		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Drosophila		GIDRPFVNDI PERRIAGEASRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
Anopheles		SIDRPFVNDI PERRI. . . RKRRLANYNRSTTTSRISIQTAVRLLPGLAQAQAVSSTKAVT		
			
		121	% Identity	
Duck		KYTESK	77	
Gallus		KYTESK	79	
Rat		KYTESK	74	
Xenopus		KYTESK	78	
Trout		KYTESK	78	
Psamechinus		KYTESK	79	
Chironomus		KYTESK	88	
Drosophila		KYTESK	93	
Anopheles		KYTESK		

Fig. 6. Alignment of amino acid sequences for clone 8 and other histone H2B proteins. Only the eight most related H2B histones are shown in the figure: duck (Ac Num. X14731; Tonjes *et al.*, 1989); *Gallus* (Ac Num. M57301; Nakayama & Setoguchi, 1991); *Xenopus* (Ac Num. X71786; unpublished data); trout (Ac Num. X02918; Winkler *et al.*, 1985); rat (Ac Num. X59851; Muh *et al.*, 1991); *Chironomus* (Ac Num. X58335; Menkel & Schmidt, 1990; Matsuo & Yamazaki, 1989); *Psamechinus* (Ac Num. M14142; Kemler & Busslinger, 1989). The amino acids identical to the C8 sequence are shadowed. The percent identity of each sequence relative to that of *An. gambiae* is shown. Note that C8 deviates from all other sequences shown at five highly conserved positions (asterisks).

some cases tissue specific, contain a poly-A tract at the 3' end (Mannironi *et al.*, 1989). Moreover, in the sea urchin egg the maternal transcript of a specific histone gene, H2A.F/Z, is polyadenylated at the 3' end and is located in the egg cytoplasm, in contrast to the pronuclear localization of most maternal histone messages (McIsaac *et al.*, 1992). Similarly, C8 may encode a polyadenylated H2B isoform stored in the mosquito egg.

In *Drosophila melanogaster*, histone genes are expressed at two different phases during oogenesis. During the first and longer phase of oogenesis there are low levels of histone mRNA, which appear to be sufficient for the synthesis of histone proteins to support the build-up of the polyploid chromosomes in the nurse cells (Ruddell & Jacobs-Lorena, 1985). The second phase begins later at stage 10, after the nurse cells have reached their full size; at this time the

synthesis of histone RNA increases dramatically, suggesting that the accumulating histone transcripts may provide a store of maternal mRNAs to support the rapid cleavages that occur during early embryogenesis (Ruddell & Jacobs-Lorena, 1985). *Anopheles gambiae* oogenesis is morphologically similar to *Drosophila* oogenesis. Therefore clone 8 may correspond to a histone H2B isoform RNA that is produced during *An. gambiae* oogenesis and is stored in the egg for rapid synthesis and utilization of its product during early embryogenesis. Comparative studies on the expression of the different histone genes during the *An. gambiae* oogenesis will be important to determine if the expression and distribution of the histone transcripts is similar to *Drosophila*.

Southern blots of mosquito chromosomal DNA using clone 8 as probe show hybridization with several bands in different restriction digests (Fig. 2). Although

cross-hybridization with other histone isoforms is not ruled out. This result suggests the possibility that the clone 8 type of histone gene is present in several copies in the genome. Future experiments will be required to identify other, non-tissue specific, forms of the *An. gambiae* histone genes, to test whether they are organized in clusters as in other eukaryotes, and to evaluate whether the clone 8 isoform is integrated within operated from such clusters.

In conclusion, we have characterized two cDNA clones whose transcripts are substantially enriched in the *An. gambiae* ovary (48 h after a blood meal) at this time all the different developmental stages of the oogenesis were present in the ovaries used in this work, and particularly enriched in oocytes larger than the nurse chamber. Therefore the transcripts identified may represent genes that are active during oogenesis and may have a function in early mosquito embryogenesis, probably during the synchronized nuclear division that occur during the first minutes of embryonic development. The molecular characterization of these genes, which are highly expressed in the *An. gambiae* ovary, open up possibilities for further analysis of this gene in this malaria vector.

Experimental procedures

Materials

Ovaries of *An. gambiae* (Suakoko strain) were dissected 48 h following a blood meal. At this time after a blood meal the ovaries were visualized in the microscope and it was clear that all the developmental stages of the oogenesis were present. In most of these chambers the oocyte was larger than the nurse chamber. The ovaries, carcasses and whole males were frozen and used for purification of total RNA. Other materials were obtained from the following sources: restriction enzymes from Boehringer Mannheim; cDNA cloning system from Stratagene; radiolabelled nucleotides from New England Nuclear.

DNA and RNA manipulations

Sequencing was performed with a Sequenase 2 kit (US Biochemical) using double-stranded DNA sequence reactions in the BlueScript vector (Stratagene) or single-strand sequence reactions in M13 derivative vectors (Sanger *et al.*, 1977). Standard DNA manipulations were performed according to protocols of Sambrook *et al.* (1989). All the DNA-DNA and DNA-RNA hybridizations were performed at 42°C in 50% formamide, 0.45 M NaCl/45 mM sodium citrate, pH 7.5, 5 × Denhart's solution, 1% SDS and 100 µg of salmon sperm DNA per ml. A Southern blot of divisional DNA pools (Zheng *et al.*, 1991) was a generous gift from Dr Adam Richman.

RNA was separated by electrophoresis through standard formaldehyde/agarose gels and transferred to nylon membranes. Genomic DNA aliquots were digested with several restriction enzymes and for Southern analysis separated on

0.8% agarose gels. After transfer to nylon membranes, filters were hybridized with cDNA clones 3 and 8.

Construction and screening of the *An. gambiae* ovarian cDNA library

PolyA⁺ RNA from *An. gambiae* ovaries (48 h post blood meal) was purified using an oligo-dT column (Ausubel *et al.*, 1994). The polyA⁺ RNA was used to construct a cDNA library using a cDNA synthesis kit (Stratagene) and was cloned in the λ-ZAP vector. The DNA was packaged using the Gigapack II Gold system as suggested by the supplier. About 2 × 10⁶ independent recombinant clones were obtained; half of the library was amplified and the other half was used for direct screening. Poly A⁺ RNA from ovaries and from females minus ovaries was used for synthesis of ³²P-labelled cDNA, which was used as probe in typical differential screening experiments against the cDNA library.

Acknowledgements

We thank members of the Kafatos laboratory for discussions and advice, and Virginia Barajas for her expert technical assistance. This work was supported by a Pew fellowship to Mario Zurita, a MacArthur Foundation grant to Fotis C. Kafatos, a DGAPA/UNAM grant to Mario Zurita and a collaborative WHO/TDR grant to Mario Zurita and Fotis C. Kafatos.

References

- Auclair, D., Lang, B.L., desGroselliers, L. and Forester, P. (1994) Analysis of genes encoding highly conserved lysine-rich proteins in *Aplysia californica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **220**: 987-1003.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.R., Seidman, J.A. and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bohm, M.K., Behan, M. and Hagedorn, H.H. (1978) Termination of vitellogenin synthesis by mosquito fat body, a programmed response to ecdysone. *Physiol Entomol* **3**: 17-25.
- Borovsky, D., Thomas, S.R., Carlson, D.A., Whisenton, L.R. and Fuchs, M.S. (1995) Juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone as primary and secondary stimuli of vitellogenesis in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol Evol* **10**: 75-80.
- Crampton, J.M., Morris, A., Lycett, G.A., Warren, A. and Eggleston, P. (1990) Transgenic mosquitoes: a future vector control strategy? *Parasitol Today* **6**: 31-38.
- Cheng, G.H., Nandi, A., Clerk, S. and Skoultschi, A.I. (1988) Different 3'-end processing products two independently regulated mRNAs from a single H1 histone gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7002-7006.
- Cho, W.L., Kappitskaya, M.Z. and Raikhel, A.S. (1995) Mosquito ecdysteroid receptor: analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **25**: 19-27.
- Fekuduh, K., Ito, M., Sugiyama, M. and Komamine, A. (1994) Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. *Int J Dev Biol* **38**: 287-299.

- Garnham, P.C. (1988) Malaria parasites of man: life cycles and immunology (excluding ultrastructure). *Malaria: Principles and Practice of Malariaology* (Wernsdorfer, W.H. and McGregor, I., eds), Vol. 1, pp. 61-95. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Gordon, N.M., Kucera, G., Salvo, R. and Boss, J.M. (1992) Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair and metabolism in murine fibroblast. *J Immunol* **148**: 4021-4027.
- Hagedorn, M.H., Shapiro, J.P. and Hanaoka, K. (1979) Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature* **283**: 92-94.
- Ho, M., Katama, H. and Komamine, A. (1991) Identification of a novel S-phase-specific gene during the cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant J* **1**: 141-146.
- Ho, M., Yasui, A. and Komamine, A. (1992) A gene family homologous to the S-phase specific gene in higher plants is essential for cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **301**: 29-33.
- Maniatis, T. and Schmidt, E.R. (1990) New foldback transposable element TFB1 found in histone genes of the midge *Chironomus tentans*. *J Mol Biol* **219**: 477-492.
- Muh, H.E., Hwang, I., Lim, K., You, K.H. and Chae, C.B. (1991) Presence of a bi-directional S phase-specific transcription regulatory element in the promoter shared by testis specific TH2A and TH2B histone genes. *Nucleic Acids Res* **19**: 93-99.
- Kemler, I. and Busslinger, M. (1985) Characterization of two non-allelic pairs of late histone H2A and H2B genes of the sea urchin: differential regulation in the embryo and tissue-specific expression in the adult. *Mol Cell Biol* **5**: 3745-3754.
- Kho, C. and Zarbi, H. (1992) Fts-1, a v-fos transformation effector gene, encodes the mammalian homolog of a yeast gene involved in protein import into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2200-2204.
- McIntosh, R., Eva, Y.W.N., Nocente-McGrath, C. and Ernst, S.G. (1988) Histone H2A.F/Z mRNA is stored in the egg cytoplasm and transiently regulated in the sea urchin embryo. *Devel Biol* **123**: 405-418.
- Mannini, C., Bonner, W. and Hatch, C.L. (1989) H2A.X, a histone testis protein with conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and poly A 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* **17**: 9113-9128.
- Marzilli, W. and Pandey, N.B. (1988) Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *Trends Biol Sci* **13**: 49-52.
- Matsuo, Y. and Yamazaki, T. (1989) tRNA derived insertion element in histone gene repeating unit of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **17**: 225-238.
- Metapalu, A., Rebana, A., Hoth, S., Pooga, M., Stahl, J. and Kruppa, J. (1992) Human ribosomal protein S3a: cloning of the cDNA and primary structure of the protein. *Gene* **118**: 313-316.
- Muller, H.M., Catteruccia, F., Vizioli, A., della Torre, A. and Crisanti, A. (1995) Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol* **81**: 371-385.
- Nakayama, T. and Setoguchi, Y. (1991) Nucleotide sequence of a member of the chicken H2B histone-encoding family. *Gene* **98**: 299-300.
- Rodriguez, M., Zamudio, F., Torres, J.A., Gonzalez-Ceron, L., Possani, L.D. and Rodriguez, M.H. (1995) Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Exp Parasit* **88**: 595-604.
- Ruddell, A. and Jacobs-Lorena, M. (1985) Biphasic pattern of histone gene expression during *Drosophila* oogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3316-3319.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- St John, T.P. and Davis, R.W. (1979) Differential screening of cDNA clones. *Cell* **18**: 443-452.
- Tonjes, R., Monk, K. and Doenecke, D. (1989) Conserved organization of an avian histone gene cluster with inverted duplications of H3 and H4 genes. *J Mol Evol* **29**: 209-211.
- Warrell, D.A., Molyneux, M.E. and Sessles, R.F. (1980) Severe and complicated malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **84** (Suppl.): 1-65.
- Winfle, R.J., Connor, W., Mezquita, J. and Dixon, G.H. (1985) Histone H4 and H2B genes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Mol Evol* **22**: 1-19.
- Uchimiya, H., Kidou, S.I., Tauge, T., Kato, A. and Umeda, M. (1994) Isolation and characterization of rice cDNA similar to the S-phase specific cyc 07 gene. *Plant Mol Biol* **24**: 545-547.
- Wheelock, G.D. and Hagedorn, H.M. (1985) Egg maturation and ecdysiotropic activity in extracts of mosquito (*Aedes aegypti*) heads. *Gen Comp Endocrinol* **68**: 199-203.
- Zheng, L., Collins, F.M., Kumar, V. and Kafatos, F.C. (1993) A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Science* **261**: 805-808.
- Zheng, L., Saunders, R.D.C., Fortini, D., della Torre, A., Coluzzi, M., Glover, D.M. and Kafatos, F.C. (1991) Low resolution genome map of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11187-11191.

Antisense suppression of the putative ribosomal protein S3a gene disrupts ovarian development in *Drosophila melanogaster*.

Enrique Reynaud¹, Virginia Barajas¹, Viatcheslav N. Bolshakov³, Fotis C. Kafatos^{2,3} Mario Zurita^{1,2}

¹Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, APDO 510-3, 6221, Cuernavaca, Morelos, México.

²Department of Cellular and Developmental Biology, Harvard University, 16 Divinity Ave., Cambridge, Mass. 02138, USA.

³European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany.

***Corresponding author: Mario Zurita, Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, APDO 510-3, 6221, Cuernavaca, Morelos, México.**

Tel: 52-73-114900, ext. 242; Fax:52-73-172388;

E-mail: marioz@pbr322.ceingebi.unam.mx.

Contains 6 figures and 0 tables

Abstract

The *Drosophila melanogaster* homologue of the *Anopheles gambiae* C3 cDNA has been isolated and characterized by sequence analysis. The encoded protein has been localized by immunochemical and immunocytochemical methods. The *Drosophila* C3 protein is highly similar to homologues of disputed function, which have been previously identified in fungi, plants and animals. The protein is ubiquitous and localized in the cytoplasm. Cell fractionation followed by detection with a specific antibody preparation shows that the protein is associated with the 40s ribosomal subunit. The C3 gene is located in section 101F of chromosome 4. Antisense transgenic analysis shows that this gene is essential for oogenesis. The most prominent phenotype of antisense depletion of C3 is disappearance of the follicular cells of the ovary (where the concentration of C3 protein is normally high) and abnormalities of the associated germ line derivatives, leading to failure of egg production.

Key words *Drosophila* Ribosomal protein Oogenesis Antisense Transgenesis

Introduction

Large-scale cDNA and genomic DNA sequencing, and methods for isolation of sequences that are differentially expressed in specific tissues or developmental stages, are yielding a wealth of descriptive information on novel genes of unknown function. The functional analysis of such genes is a necessary but much more demanding task, which is best addressed in genetically manipulable model organisms. Gene knock-out or antisense technologies are powerful approaches to determining gene function in the context of the whole organism.

We are interested in the isolation and characterization of genes involved in oogenesis of dipteran insects. In this context, we performed differential screening of a cDNA library from the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to obtain cDNAs that are preferentially expressed in the developing ovary (Zurita et al. 1997). One of these cDNAs, C3, is particularly intriguing in that it is highly conserved in evolution and has been cloned independently in diverse organisms, in contexts that suggest widely different functions. Thus, Ito et al. (1991, 1992) have studied C3 homologues in plants and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, concluding that the gene is related to meristematic functions and the control and maintenance of the S phase of the cell cycle. The mammalian C3 homologue has been described as having diverse putative functions: as an effector of the *v-fos* oncogene in rat (Kho and Zarbl 1992); as the human ribosomal protein S3a (Metspalu et al. 1992), and as a sequence induced by tumor necrosis factor in murine fibroblasts (Lin and Vilcek 1987). Invertebrate C3 homologues have been obtained by differential screening of a neuron cDNA library of *Aplysia californica* (Auclair et al. 1994), and in the course of *Caenorhabditis elegans* genome sequencing project (Wilkinson-Sproat and Wohldman 1994).

We have used the mosquito C3 clone as probe to recover the *D. melanogaster* homologue, so that we could obtain better insights into the physiological function of C3-type genes during development in a multicellular organism that permits genetic or transgenic analysis. Co-purification experiments suggest that the C3 product is a component of (or binds to) the 40s ribosomal subunit. The C3 gene is expressed throughout fruitfly development; its product is represented in all embryonic cells, and is particularly abundant in follicular epithelial cells of the ovary. Transgenic analysis indicates that this gene product is essential for oogenesis. Its depletion by the use of an inducible antisense construct results in disruption of the follicular epithelium, abnormalities of the germline cells and eventually resorption of the entire egg chamber.

Materials and Methods

Cloning and characterization of the *Drosophila* C3 homologue

Full length C3 cDNA was cloned from a commercial cDNA library prepared from 0-24 hour *Drosophila* embryos, using as a heterologous probe the mosquito C3 clone (Zurita et al. 1997). Hybridization was performed at 37°C in 37% formamide, 0.5x SSC, 1x Denhardt's solution and 1mg/ml salmon sperm DNA. Sequencing was performed according to Sanger et al. (1977) with a "Sequenase Version 2.0 Sequencing Kit" (US Biochemicals) as in the manufacturer's instructions. Sequence analysis was done using GCG Version 8 software package (Devereux et al. 1984).

Plasmid constructs, generation of transgenic flies, heat shock induction and phenotypic analysis

Sense and anti-sense constructs contained the full length C3 cDNA in the pCaSper-hs vector (Thummel and Pirrotta 1991). For the sense construct the cDNA was inserted at the *EcoRI* site and for the antisense construct it was cloned directionally in the *Not I*-*Hpa I* sites of the polylinker after repairing the *Kpn I* site of the cDNA.

Embryos of *yw* genotype were transformed using the P- element mediated germ line transformation method (Spradling and Rubin, 1982). Homozygous lines carried either the sense or the anti-sense constructs were generated by inbreeding transgenic progeny for five generations, and then tested by backcrossing these lines to *yw* flies. Further in the text these strains will be referred as "sense lines" and "antisense lines", respectively.

To induce the expression of the transgenes during oogenesis, five pre-mated five day old females from each line were transferred to empty plastic vials containing a paper towel at the bottom (to absorb moisture) and heat shocked by submerging the vials in a water bath at 40°C for 30 min., then allowed to recover for 1 hr at 17°C and then heat shocked again under the same conditions. After treatment flies were kept at 17°C and the laid eggs were counted every 24 hrs. Data from 5 independent lines were averaged and the standard deviation was calculated and plotted for each day. Three days after heat shock the ovaries of the same flies were dissected, fixed in Engrailed fixing buffer (140 mM KCl, 40 mM NaCl, 4 mM Na₃EGTA, 1 mM spermidine, 30 mM Pipes pH 6.9, 0.2% 2-mercaptoethanol, 4% formaldehyde) and stained with DAPI (500 ng/ml in Engrailed fixing buffer without formaldehyde) (Handke-Kociok and Liebrich 1986). After staining, ovaries were mounted in Gelvatol (Monsanto Chemicals)

and were observed by conventional epifluorescence microscopy. In all experiments the *yw* strain was used as a control.

Expression of recombinant protein, production of polyclonal antibodies, immunoblotting analysis and immunocytochemistry

A 960 base pair fragment of the C3 coding region flanked by *Bam*HI sites was cloned in the *Bam* HI site of pGEX1 (Smith 1993). This produced a fusion of C3 protein lacking the first 20 amino acids, and Glutathion S-Transferase protein (GST). This fusion protein was purified as described by Smith (1993) and used to elicit polyclonal antibodies in Balb-C mice, as described in Harlow and Lane (1992).

Ovaries or embryos were disrupted in homogenization buffer (150 mM sucrose, 50 mM Tris-base pH 7.5, 5mM MgCl₂, 2mM PMSF, 5mM EDTA). Protein concentration was standardized according to Bradford (1976) and the samples were electrophoresed in 12% SDS-PAGE gel (Laemmli, 1970), blotted onto nitrocellulose and immunostained according to Burnette (1981) using a 1:10000 dilution of anti-C3 polyclonal antibody, followed by alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Gibco-BRL).

Embryos and ovaries were immunostained using anti-C3 polyclonal antibodies in a 1:10000 dilution essentially as described (Lee et al. 1993), except that the fixation step was carried out in Engrailed fixing buffer. Tissue was mounted in Gelvatol and images were collected in a confocal microscope.

Purification of total RNA and Northern blot analysis

Total RNA was purified using a single step method for RNA isolation according to Chomczynski and Sacchi (1978). Northern blot was performed according to Thomas (1980).

Purification of ribosomal particles

Ribosomal particles were purified according to Santon and Pellegrini (1980). Briefly, tissue was homogenized in ribosomal homogenization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3.3 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 250 mM sucrose). Extracts were clarified by slow speed centrifugation (600 x g), the supernatant was overlaid over 30% sucrose in the ribosomal homogenization buffer without Triton X-100 and centrifuged for 12 hrs at 234000 x g. The recovered pellet is the 80 S fraction. This was resuspended in 0.25 ml of subunit gradient buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol), cleared at 15600 x g for 15 min, layered on a 10% - 30% sucrose gradient in subunit gradient buffer and centrifuged at 234000 x g for 1.5 hrs. Protein concentration was normalized according to Bradford (1976).

In situ hybridization of polytene chromosomes

Salivary gland polytene chromosomes from 3rd instar larvae of wild-type strain Oregon-R were prepared and treated essentially as described by Ashburner (1989b). The biotinylated probe of C3 cDNA clone was synthesized with "Bio-Nick Translation Kit" (Gibco-BRL) and hybridization and detection was

performed using "In situ Hybridization and Detection System" (Gibco-BRL) according to the manufacturer's instructions.

Results

Cloning, sequence analysis and chromosomal localization of the *Drosophila* C3 gene

As previously reported (Zurita et al. 1997), we have used differential screening to isolate C3 and several other *An. gambiae* cDNA clones, corresponding to transcripts that accumulate in the mosquito ovary after a blood meal. We used the *An. gambiae* cDNA clone as a heterologous probe to isolate the *D. melanogaster* homologue, by screening a 0-24 hr embryonic cDNA library. Several cDNA clones were identified and one which contains the entire coding sequence was analyzed in more detail. The encoded protein is 240 aminoacids long and has a molecular weight of approximately 29.7 kilodaltons. Figure 1 compares the *D. melanogaster* C3 gene product and the homologous proteins from different phyla . The percent of identity is maximal between mosquito and *Drosophila* (71%) but is also remarkably high in other organisms, including yeast and plants.

By in situ hybridization of C3 cDNA probe to larval salivary gland polytene chromosomes, the gene was mapped in the region 101F at the base of chromosome 4 (Fig. 2A).

Developmental expression of the *Drosophila* C3 gene

Several putative functions have been proposed for the C3 homologues depending on the organism from which they were isolated. However, an analysis of the RNA distribution during development has been reported only for plants, where the gene is reportedly expressed mostly in proliferative tissues (Ito et al. 1991; Ito et al. 1994.).

To determine the expression pattern of the C3 gene during *D. melanogaster* development, both the RNA and protein distributions were analyzed. Figure 2B shows that C3 transcript of about 1.1 kb is present at all stages of the life cycle, paralleling the levels of the rp49 ribosomal protein gene transcript. The C3 (and rp49) transcript levels are especially high during embryonic development and in females with developing ovaries. To monitor the levels and distribution of the corresponding protein, a C3-GST fusion protein was obtained and used to elicit antibodies in mice. The polyclonal antibody obtained was very specific (Fig. 3A) and was used to confirm that the C3 protein is widely distributed. For example, Fig. 3B shows the presence of C3 protein throughout the embryo at various stages of embryogenesis, in agreement with the ubiquitousness of the mRNA.

Subcellular distribution of the C3 protein

Although there are conflicting reports in the literature about the nature of the C3 homologues (see Discussion), Metspalu et al. (1992) have reported a ribosomal protein S3a gene from humans which has a high degree of identity with clone C3. In order to determine whether the C3 gene encodes a ribosomal

protein, we isolated subcellular fractions and pure ribosomal particles. In preliminary fractionation experiments, immunoblotting showed that the protein is detectable in the mitochondrial and microsomal fractions but is depleted from cytoplasmic supernatants and from nuclei washed with Triton-X100 (data not shown). Purified 80s ribosomal particles and ribosomal subunits fractionated in a sucrose gradient (60s and 40s) were tested with the anti-C3 polyclonal antibody. Figure 3C shows that immunoreactive material (presumably C3 and breakdown products) are associated with microsomes, 80s ribosomes and 40s subunits, but not with 60s subunits or microsome-free cytosolic fraction. Thus, the C3 protein can be co-purified with the 40S ribosomal particle, supporting the idea that the C3 gene encodes a ribosomal protein, or a ribosome-associated protein.

C3 protein distribution in whole mount embryos and ovaries

In order to visualize the distribution of the C3 protein during embryonic development and oogenesis, we used confocal microscopy after immunostaining with anti-C3 polyclonal antibodies of whole mount embryos and ovaries. Figure 4 (A to E) shows confocal images of whole mount *Drosophila* embryos. In the blastoderm (Figs. 4A and 4B), both somatic cells and the pole cells (germ line) are stained; the nuclei are unstained and the cytoplasmic protein is concentrated both in a broad apical zone and in the basal region. In embryonic division cycles 12-16 (Figs. 4C and 4D), where discrete mitotic domains are known (Foe et al. 1994), the protein is distributed in all the cells: this is significant, in that the plant C3 homologue has been described as S-phase specific (Ito et al. 1991). C3 is also ubiquitous in late stage embryos (Fig. 4E). During oogenesis, the C3 protein is also cytoplasmic and is most intensely represented in the somatic

follicular epithelium (Fig. 4F-K). In the nurse cell cytoplasm it is present at relatively low levels (Figs. 4F and 4J), beginning with stage 5 of oogenesis. In the oocyte cytoplasm it is almost undetectable except at very late stages (data not shown). The protein is most intensely represented in the basal region of the follicular epithelial cells (Figs. 4G and 4H), and at stages 12-14 of oogenesis it seems partially perinuclear (Fig. 4K).

Phenotypic analysis using sense and antisense C3 constructs

Since the C3 gene currently is not amenable for classical genetic analysis, we constructed transgenic flies expressing sense or antisense C3 cDNAs under the control of the *hsp70* gene promoter (see Material and Methods). We analyzed 10 independent transgenic antisense and 8 sense lines, looking for any defects in adults after heat shock treatment at different stages of development. No defects were observed after repeated heat shocks (once daily, at 37°C for 30 min) during days 0-4 or 4-8 of development in the *yw* and sense lines (data not shown). However, the antisense lines showed prolonged larval and pupal development, with an overall developmental delay of 10-30 hrs depending on the antisense line, and produced small adults (data not shown). The same phenomena were observed for the antisense lines even when grown at 25°C and are presumably caused by the leakiness of the *hsp70* gene promoter. It is interesting since prolonged development and small body size of adults is frequently associated with the *Minute* phenotype, caused by mutations in genes that encode ribosomal proteins (Ashburner et al. 1989a).

The most obvious and consistent phenotype in all antisense lines was failure of egg production. Even at 25°C these lines showed a significant diminution of the number of eggs laid. After heat shock of adult females of antisense lines their

egg production was dramatically reduced so that no eggs were laid after 3 days (Fig. 5). In contrast, the numbers of eggs laid by *yw* and sense line females after the same heat shock treatment were only transiently reduced but by 3 days had returned to normal levels.

The observation that egg production is dramatically reduced in the antisense lines suggested that suppression of the C3 product may lead to abnormalities during oogenesis. Ovaries of *yw*, sense and antisense females were dissected and analyzed 3 days after heat shock. In all the antisense lines the egg chambers were completely abnormal. The abnormalities became clearly evident in vitellogenic egg chambers, and were frequently associated with disruption of the follicular epithelium (Fig. 6C). Some egg chambers showed pycnotic nuclei, others appeared to be fused (Fig. 6B), and in others the nuclei of nurse cells and oocyte were mislocalized (Fig. 6D). Resorption of the entire egg chamber apparently ensued, as no late vitellogenic or choriogenic egg chambers were seen. In contrast, such abnormalities were not observed in *yw* (Fig. 6A) or sense lines ovaries (data not shown).

Discussion

To explore the function of the evolutionarily conserved C3 cDNA sequence, which we have previously cloned in the mosquito *An. gambiae* because of its enrichment in the ovary after a blood meal (Zurita et al. 1997), we have recovered the *D. melanogaster* homologue by cross-hybridization. As expected, the fruitfly and mosquito sequences are extremely similar, showing 71% identity at the amino acid level. The similarity is also strikingly high in organisms as diverse as yeast, plants and vertebrates (51% to 67% identity).

suggesting that this type of protein has an important function that has been retained throughout the evolution of eukaryotes.

The nature of this function has been controversial. Therefore, we used a heat-shocked regulated antisense transgene to determine the functional consequences of C3 depletion during development. In addition, we have developed a anti-C3 specific polyclonal antibody and used it in biochemical and immunocytochemical experiments.

On the basis of their studies on C3-type genes in yeast and plants, Ito et al. (1991, 1994) have suggested that this type of genes is only (or preferentially) expressed in proliferative tissues and is involved in the S-phase of the cell cycle. However, the ubiquitousness of the protein in the *Drosophila* embryo do not support this hypothesis for the fruitfly; it would be surprising if this type of gene, which is so strongly conserved structurally, would have undergone radical functional changes during evolution. In contrast, our results are consistent with the proposal that the C3 homologue from humans is a ribosomal protein, S3a (Metspalu et al. 1992). According to our immunochemical studies the C3 product is enriched in microsomes and co-purifies with the 40s (but not the 60s) ribosomal subunit (Fig.3C), and immunocytochemical results show that C3 protein is cytoplasmic: only exceptionally low levels are detected in association with some nurse cell nucleoli (Fig. 4). The C3 transcript also shows widespread expression during development, paralleling the expression of the ribosomal protein rp49 gene (Fig. 2B).

Our antisense "surrogate genetic" experiments have shown that the C3 gene is required for completion of oogenesis, apparently because of an essential function in the somatic follicular cells, where the C3 protein is especially abundant. In addition, the presense of antisense C3 construct, even at 25°, results in prolonged development and small adult size, features which are frequently associated with the *Minute* phenotype (Ashburner 1989a). Both derailment of

oogenesis and *Minute* phenotypes have been previously associated with disruptions of ribosomal protein gene function, with different ribosomal genes showing different propensity for one or the other phenotype. Thus, antisense disruption of the *rp49* ribosomal protein gene produces a weak *Minute* phenotype and transient arrest of oogenesis (Patel and Jacobs-Lorena 1992). On the other hand, antisense suppression of the *rpA1* ribosomal protein gene severely disrupts oogenesis and produces a small egg, female sterile phenotype (Qian et al. 1988). Of special interest are some alleles of the *string of pearls* (*sop*) gene which block oogenesis at stage 5; this gene encodes the ribosomal protein S2 (Cramton and Laski, 1994). In sum, the phenotypes seen with antisense disruption of the C3 gene are entirely consistent with its identification as a gene encoding a ribosomal protein. Interestingly, the C3 gene is cytologically co-localized with the *Minute* mutation *M(4)101*, but no female sterility has been reported for this mutation (Lindsley and Zimm 1992).

The specific disruption of oogenesis by C3 depletion does not contradict the ubiquitous nature of the protein, but rather emphasizes the well-known genetic sensitivity of oogenesis. Many genes involved in general cellular processes, in addition to ribosomal protein genes, are known to have alleles that affect oogenesis: examples are the fasciclin III gene, the profilin gene *chickadee* and the gene *bag of marbles* encoding a putative cystoblast differentiation factor (reviewed in Spradling, 1993). The abundance of C3 in the follicle cells and their disappearance after C3 depletion may be related to the very active protein synthetic functions of these cells for abundant production of yolk, vitelline membrane and chorion proteins in quick succession. The prolonged development and small adult size associated with the expression of C3 antisense construct presumably reflects the function of C3 in a wide variety of other cell types, where it is evidently present (as we might extrapolate from its ubiquitousness in the embryo).

Our results support the conclusion that the C3 gene encodes a ribosomal or ribosome-associated protein such as S3a and that oogenesis in *D.melanogaster* is particularly affected when some ribosomal protein genes are suppressed, probably as a consequence of the high requirement for ribosomes and protein synthesis during egg formation.

Acknowledgements The authors are grateful to Dr. David Tollervey for discussions and Ms. Maj Britt Hansen for technical help with illustrations. This work was supported by Pew Fellowship and grants from PAPIT/UNAM and CONACyT-2237P-N to M.Z. Nucleotide sequence of *D.melanogaster* C3 cDNA is submitted to the GenBank under accession number Y10115.

References

- Ashburner M (1989a) *Drosophila* A Laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Ashburner M (1989b) *Drosophila* A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Auclair D, Lang BF, Forest P, Desgroseillers L (1994) Analysis of genes encoding highly conserved lysine-rich proteins in *Aplysia californica* and *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 220:997-1003
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72:248-254
- Burnette WN (1981) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic

- detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Cramton SE, Laski FA (1994) *String of pearls* encodes *Drosophila* ribosomal protein S2, has *Minute*-like characteristics, and is required during oogenesis. *Genetics* 137:1039-1048
- Devereux J, Haeblerli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acids Res* 12:387-395
- Foe V, Odell GM, Edgar BA (1993) Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo. In: Bates M, Martinez-Arias A (eds) *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 301-324
- Garret JM, Singh KK, Vonder Haar RA, Emr SD (1991) Mitochondrial protein import: isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *MFT1* gene. *Mol Gen Genet* 225:483-491
- Gordon HM, Kucera G, Salvo R, Boss JM (1992) Tumor necrosis factor induces genes involved in inflammation, cellular and tissue repair and metabolism in murine fibroblasts. *J Immun* 148:4021-4027
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Hagedorn HH, Shapiro JP, Hanaoka K (1979) Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature* 282: 92-94
- Handke-Kociok M, Liebrich W (1986) A simple method for staining chromosomes in whole embryos of *Drosophila*. *Dros Inf Serv* 63:142

- Ito M, Kodama H, Komamine A (1991) Identification of a novel S-phase specific gene during the cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant J* 1(2):141-148
- Ito M, Yasui A, Komamine A (1992) A gene family homologous to the S-phase specific gene in higher plants is essential for cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 301:29-33
- Ito M, Tsutomu S, Fukuda H, Komamine A (1994) Meristem-specific gene expression directed by the promoter of the S-phase-specific gene *cyc07*, in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 24:863-878
- Kho CJ, Zarbl H (1992) *Fte-1*, a *v-fos* transformation effector gene, encodes the mammalian homologue of a yeast gene involved in protein import into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2200-2204
- Kidou S, Umeda M, Tsuge T, Kato A, Uchimiya H (1994) Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the S-phase-specific *cyc07* gene. *Plant Mol Biol* 24:545-547
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee JK, Coyne RS, Dubreuil RR, Branaton D, Goldstein LSB (1993) Cell shape defects in a-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 123:1797-1809
- Lin JX, Vilcek J (1987) Tumor necrosis factor and interleukin-1 cause a rapid and transient stimulation of *c-fos* and *c-myc* mRNA levels in human fibroblasts. *J Biol Chem* 262:11908-11911
- Lindsley DL, Zimm GG (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego
- Metspalu A, Rebane A, Hoth S, Pooga M, Stahl J, Kruppa J (1992) Human ribosomal protein S3a: cloning of the cDNA and primary structure of the protein. *Gene* 119:313-316

- Patel R, Jacobs-Lorena M (1992) Generation of *Minute* phenotype by a transformed antisense ribosomal protein gene. *Dev Genet.* 13:256-263.
- Qian S, Hongo S, Jacobs-Lorena M (1988) Antisense ribosomal protein gene expression specifically disrupts oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9601-9605
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Santon B, Pellegrini M (1980) Expression of ribosomal proteins during *Drosophila* early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5649-5653
- Smith DB (1993) Purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. *Meth Mol Cell Biol* 4:220-229.
- Spradling AC (1993) Developmental genetics of oogenesis. In: Bates M, Martinez-Arias A (eds) *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 1-70
- Spradling AC, Rubin GM (1982) Transposition of cloned P-elements into *Drosophila* germline chromosomes. *Science* 218:341-347
- Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201-5205
- Thummel CS, Pirrotta V (1991) Technical Notes: New CaSpeR P-element vectors. *Dros Inf Newslett* 2:1
- Wilkinson-Sproat J, Wohldman P (1994) The *C.elegans* genome project: contiguous nucleotide sequence of over two megabases from chromosome III. *Nature* 368:32-38
- Zurita M, Reynaud E, Kafatos F.C. (1997) Cloning and characterization of cDNAs preferentially expressed in the ovary of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Ins Mol Biol* 6:55-62

Figure legends

Fig. 1 Alignment of *D.melanogaster* (Drosophila) C3 putative protein with representative homologues of different organisms. Shadowed residues are at least 80% conserved relative to the *Drosophila* sequence, and overall identity, in percent, is at the end of the alignment. The sequences (with the GenBank accession number and references, in parenthesis) correspond to: *Saccharomyces, S.cerevisiae* (X55360, Garret et al. 1991, Ito et al. 1992.); Rice, *O.sativa L.* (D26060, Kidou et al. 1994); Catharanthus, *C.roseus* (D011058, Ito et al. 1991); Homo, *H.sapiens* (L13802, Mestpalu et al. 1992); Rat, *R.norvegicus* (M84716, Kho and Zarbl, 1992); Mouse, *M.musculus* (M88335, Gordon et al. 1992); Aplysia, *A.californica* (X68555, Auclair 1994); Anopheles, *A.gambiae* (X98186, Zurita et al. 1997). Amino acids are represented by the standard single letter code.

Fig. 2 Chromosomal localization and expression pattern of C3 gene. **A** *In situ* hybridization of C3 cDNA probe to polytene chromosomes. Arrow points at the signal in region 101F of chromosome 4. **B** Northern blot analysis of mRNAs from different stages of *Drosophila* development. The same blot was hybridized with C3 cDNA probe, then stripped and re-hybridized with the rp49 cDNA probe as a control of mRNA quantity. Lanes 0-4, 4-8, 8-12, 12-16 represent intervals of hours of embryonic development; L-larvae, P-pupae, F-female, M-male.

Fig. 3 Characterization of anti-C3 polyclonal antibodies, representation of C3 protein during embryonic development and co-purification with the 40s ribosomal subunit. **A** Specificity of the antibody preparation against endogenous proteins extracted from embryos of *yw* strain (lane E, single band of about 30

kd), specificity for the larger C3-GST fusion protein (lane F, single band of about 55 kd) and molecular weight standards in kd (lane MW). **B** Presence of C3 protein in embryos, as monitored by Western blot analysis of protein extracts from 0-4, 4-8, 8-12, 12-16 hrs old embryos. **C** Subcellular localization of C3 protein, as monitored by Western blot analysis, in microsomes (M), 80s ribosomes (80s), 40s ribosomal subunits (40s) but not 60s ribosomal subunits (60s) and microsome-free cytosolic fraction (C). The major detectable band (arrow) co-migrates with the band detected in **B**; the other bands presumably represent at least in part degradation products that are never seen in rapidly processed total extracts.

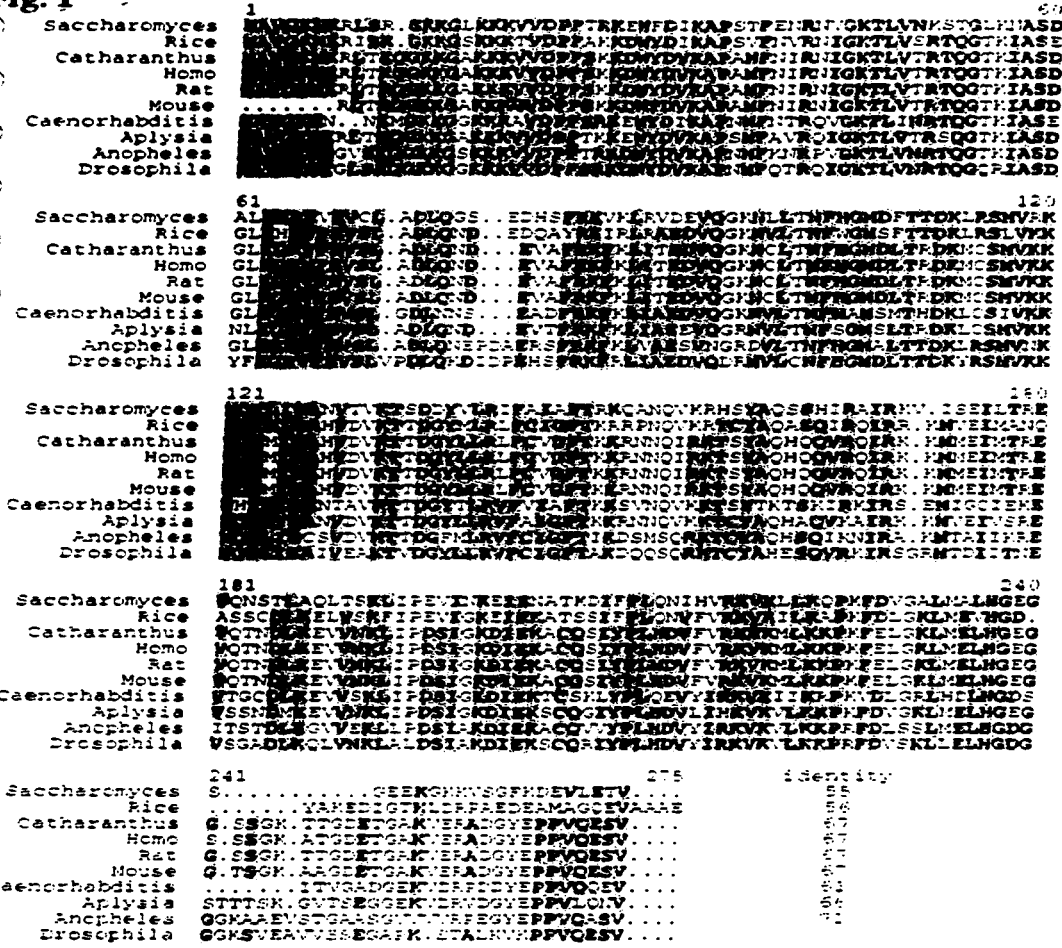
Fig. 4 Immunocytochemistry of whole embryos (**A-E**, oriented anterior to the left, posterior to the right) and egg chambers (**F-K**, oriented anterior to the right, posterior to the left), using anti-C3 polyclonal antibodies. **A** Optical section of cellular blastoderm of stage 5 embryo. **B** Higher magnification of the posterior pole showing staining both in the pole cells (white arrowhead) and in the somatic cells of the blastoderm; in the latter cells the protein is concentrated in the basal region (white arrow), diffuse in an apical region, and scarce in the intermediate nuclear zone. **C** Dorsal and **D** Ventral views of a stage 8 embryo. **E** Lateral view of a stage 14 embryo. Note that the C3 protein is ubiquitous and cytoplasmic during embryonic development. **F** Surface view of stage 9 egg chamber **G** Transverse optical section of the same egg chamber as in **F**. The intense staining in the peripherally arranged follicle cells, the low intensity staining in the nurse cell cytoplasm (white asterisk) and the absence or near absence in the nurse cell nuclei and the oocyte (white arrow). **H** Higher magnification of the same egg chamber as in **G**, showing intense concentration of C3 protein in the basal cytoplasm and lower levels elsewhere in the follicle cells, excluding the nuclei. **I** Surface view of stage 10 egg chamber. **J** Same egg

chamber as in **I** but in optical section; note the intense staining in follicle cells and the lower C3 prevalence in the nurse cell cytoplasm. **K** Same egg chamber as in **I** but at higher magnification; note the slightly perinuclear distribution of C3 protein.

Fig. 5 Numbers of eggs laid by *yw*, sense and antisense lines females before (day 0) and every 24 hrs (days 1-3) after heat shock. Total number of eggs laid by five predated females was counted for each point. For sense and antisense lines each data point represents the average and standard deviation of five independent lines.

Fig. 6. Phenotypic effects of antisense suppression of C3 in ovaries. All panels represent ovarioles dissected 3 days after heat shock and stained with DAPI, to reveal the location of nuclear and other DNA. **A** Ovarioles of *yw* female showing progressively older egg chambers of normal morphology, each surrounded by a follicle cell epithelium (arrows). **B** Ovarioles from an antisense female, showing presence of follicular cells in the early stages (arrow) but their disappearance associated with degeneration of the older egg chambers (asterisks). **C** Ovarioles from another antisense female. Note that the early egg chambers appear normal, but the oldest ones (white asterisks) are grossly abnormal, show fragmentation and mislocalization of nurse cell nuclei, and are denuded of follicle cells. **D** Here an egg chamber from antisense female is in the process of losing its follicular epithelium (white arrow); both this and the older egg chamber (white asterisks) show no polarized arrangement of the nurse cell nuclei and no apparent posterior oocyte.

Fig. 1



A



B

0-1 1-3 3-12 12-18 L P F M

C3



rp49



