

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANALISIS DE LA ORGANIZACION GENOMICA DEL ONICOFORO
Epiperipatus biolleyi (ONYCHOPHORA)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al
grado de *Magister Scientae*

María de los Angeles Mora López

Ciudad Universitaria " Rodrigo Facio " Costa Rica

1991

DEDICATORIA

A mi madre, por haber sembrado en mi el afán de superación. A mi esposo, por compartir mis metas e impulsarme a alcanzarlas. A mi hijo, por su gran deseo de vivir....

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Dr. Pedro León Azofeifa, por haberme brindado su guía y colaboración en la realización de esta investigación y en general en mi vida profesional. A los Bach. Alvaro Herrera , Bernal Morera por sus valiosos aportes. Al Dr. Matthew Scott por permitirme ampliar mis horizontes profesionales. A mis compañeros del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, por su colaboración y apoyo. A Reinaldo Pereira, M.Sc Carolina Godoy y Lic. Elena Castillo por su amistad y aliento. A Doña Teresa y Esteban por su invaluable cooperación en la recolecta de organismos y por hacerme sentir como parte de su familia .

Deseo agradecer a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y al Consejo de Investigaciones Científicas Y Tecnológicas (CONICIT), por su apoyo financiero al proyecto de investigación del cual forma parte esta tesis.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología, de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientie*.

Aprobada por:



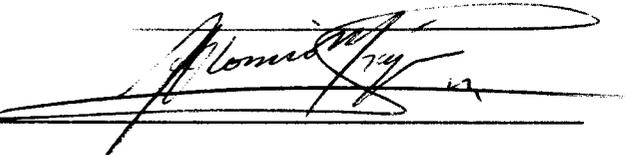
Dr. Pedro León Azofeifa

Director de Tesis



Dra. Pilar Ramírez Fonseca

Miembro del Tribunal



M.Sc. Julián Monge Nájera

Miembro del Tribunal



Dra. Julieta Carranza Velázquez

Directora del Programa

Estudios de Posgrado
en Biología



Dr. Luis Camacho Naranjo

Decano del Sistema de
Estudios de posgrado



María de los A. Mora López

Candidato

INDICE

	PAGINA
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	8
MATERIALES Y METODOS	22
1. Recolecta y selección de especímenes	22
2. Extracción del material genético (ADN)	23
3. Determinación del % G-C y perfiles de flotación en gradientes isopícnicas	25
4. Determinación del valor C	26
5. Aislamiento de secuencias repetidas	26
6. Clonaje de secuencias repetidas	28
7. Secuenciación de ácidos nucleicos	29
8. Elaboración y análisis de una genoteca	32
9. Preparación de sondas radioactivas	35
RESULTADOS	37
1. Caracterización del ADN de <i>E. biolleyi</i>	37
1.1 Determinación del valor C	37
1.2 Determinación de perfiles de flotación y % G-C	37

1.3 Detección de secuencias repetidas	39
1.4 Secuenciación de la familia repetida Bgl II	48
2. Elaboración y análisis de una genoteca	53
3. Detección de la secuencia de consenso Homeo	62
DISCUSION	68
BIBLIOGRAFIA	76

RESUMEN:

La composición y organización del genoma del onicóforo *Epiperipatus biolleyi* fueron analizadas utilizando técnicas físico-químicas clásicas y técnicas moleculares del ADN recombinante. Algunos aspectos relevantes determinados incluyen: un valor C promedio de 4.7 pg a partir del cual se estimó un peso molecular de 9.4×10^9 pares de bases, un contenido de bases Guanina-Citocina del 30 % determinado mediante ultracentrifugaciones analíticas el contenido de bases Guanina-Citocina como de 30%, mientras que las centrifugaciones preparativas en gradientes isopícnicas de CsCl revelaron un perfil asimétrico con un hombro pronunciado hacia el fondo de la gradiente y una serie dispersa de satélites más livianos.

La digestión del ADN genómico con las endonucleasas de restricción Bgl II, HaeIII y HindIII, reveló la presencia de familias de secuencias repetidas. Una banda prominente de aproximadamente 2 Kb derivada de la digestión con Bgl II (familia repetida Bgl II) fue clonada en el sitio BamHI del vector pUC13 dicho plásmido recombinante fue denominado pEb4 (plásmido *Epiperipatus biolleyi*, colonia Pt4). Esta familia de secuencias fue posteriormente subclonada en el plásmido pGEM 7Zf en el sitio HindIII/Eco RI, y se denominó pGEB4-10. Con la finalidad de generar una serie unidireccional de delecciones este plásmido fue sometido a la acción de la nucleasa Exo III . Estas delecciones fueron secuenciadas por

el método Dideoxi de Sanger. La secuenciación de esta familia reveló contenido de bases AT del 64 %, lo que concuerda con la tendencia presentada por el genoma de este organismo. Si bien no se detectaron regiones traslapantes que permitieran la reconstrucción de la secuencia, se determinó la presencia de un motivo cercano a los 50 nucleótidos que se repite en al menos 4 de las deleciones. Esta familia repetida puede ser catalogada como moderadamente repetida ya que se encuentra representada en el genoma 23 000 veces.

Con el fin de determinar la presencia de genes específicos portadores de la secuencia de consenso Homeo, como los que determinan segmentación y diferenciación en *Drosophila*, se elaboró una genoteca de este organismo. El material genómico fue digerido en forma parcial digestión parcial con la endonucleasa Sau 3A y los fragmentos

generados fueron clonados en el fago Lambda de reemplazo EMBL3 . Fueron recuperaron 150 000 fagos recombinantes que constituyen la primera genoteca de un onicóforo , la cual se estima que contiene alrededor de 3×10^8 pb y representa un 40% del genoma. El análisis de la genoteca por hibridación molecular por medio de la utilización de la secuencia de consenso Homeo del gen *Antenapedia* de *Drosophila* como sonda, determinó la presencia de 20 fagos recombinantes que presentan al menos un 50% de homología. Esta sonda fue capaz de detectar las secuencias Homeo de los genes *Antenapedia*, *Ultrabitorax*, *SCR* y *Ftz* en condiciones de hibridación estrictas (SSC 2X, 65 C) y las de los genes *gbs*, *eve* y *engrailed* en condiciones menos estrictas (SSC5X, 45 C). Los genes *bcd*, *prd* y *cad* presentaron resultados negativos en todos los casos.

LISTA DE CUADROS

	PAGINA
CUADRO 1. Detección por hibridación molecular de secuencias Homeo clonadas a partir de Drosophila , pertenecientes a diferentes familias, con una sonda Homeo del gen Antenapedia .	67
CUADRO 2. Contenido de ADN por núcleo haploide de algunos invertebrados.	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PAGINA
1	Perfiles de flotación del ADN genómico de <i>Epiperipatus biolleyi</i> en gradientes isopícnicas de Cloruro de Cesio. 38
2	Ultracentrifugación analítica del ADN de <i>Epiperipatus biolleyi</i> en gradientes de Cloruro de Cesio. 40
3	Separación electroforética (agarosa 0.8%) del ADN genómico de <i>Epiperipatus biolleyi</i> digerido con varias endonucleasas de restricción. 41
4	Determinación del peso molecular de las bandas correspondientes a familias de secuencias repetidas localizadas en el genoma de <i>E. biolleyi</i> por digestión con endonucleasas de restricción. 42
5	Representación esquemática del plásmido pUC13, utilizado como vector de clonaje. 43
6	Separación electroforética (agarosa 0.8%) de las clonas recombinantes producto del clonaje de la secuencia Bgl II en el sitio BamH I del plásmido pUC 13. 44
7	Separación electroforética (agarosa 0.8%) de los plásmidos recombinantes que contienen la secuencia Bgl II (pEB4 y pEb1) en que se demuestra la liberación de este inserto por digestión doble con las enzimas Hind III/Eco RI. 46
8	Representación esquemática del plásmido pEb4 mostrando la inserción de la secuencia Bgl II en el sitio Bam HI de la región múltiple de clonaje . 47
9	Representación esquemática del plásmido pGEM 7Zf utilizado como vector en el subclonaje de la secuencia Bgl II en el sitio Hind III/Eco RI. 49

10	Preparación de los plásmidos pEB4 y pGEM 7Zf para el subclonaje de la secuencia Bgl II, por digestión doble con las enzimas Hind III/Eco RI.	50
11	Separación electroforética de los plásmidos (serie pGEb4) recuperados del subclonaje de la secuencia Bgl II en el plásmido pGEM 7Zf.	51
12	Representación esquemática del plásmido recombinante pGEb4-10 producto del subclonaje de la secuencia Bgl II.	52
13	Selección de la combinación de endonucleasas de restricción a ser utilizadas en la generación de la serie de deleciones unidireccionales del plásmido pGEb 4-10.	54
14	Diagrama de la elaboración de una serie unidireccional de deleciones del plásmido pGEb4-10 utilizando el sistema "Erase a base".	55
15	Separación electroforética de los plásmidos recombinantes que contienen deleciones unidireccionales del plásmido pGEb4-10, denominadas como serie pDEb.	56
16	Secuencia nucleotídica de los plásmidos delecionados derivados del plásmido pGEb 4-10 que contiene la secuencia repetida Bgl II de <i>Epiperipatus biolleyi</i> .	57
17	Composición de bases y sitios de restricción de la secuencia repetida Bgl II obtenidos del análisis por computadora de las secuencias de la serie de deleciones unidireccionales obtenidas del plásmido pGEb 4-10.	58
18	Obtención del ADN inserto para la elaboración de la genoteca de <i>Epiperipatus biolleyi</i> .	59
19	Representación esquemática del fago vector EMBL 3 utilizado en la elaboración de la genoteca de <i>E. biolleyi</i> .	60
20	Determinación del tiempo óptimo de digestión parcial del ADN genómico de <i>E. biolleyi</i> con la enzima Sau 3A, para la obtención de una población enriquecida en fragmentos de 20 Kb.	61

21	Selección de los fagos recombinantes homólogos a la secuencia Homeo de <i>Drosophila</i> por hibridación molecular a réplicas en papel de nitrocelulosa .	63
22	Evaluación de la capacidad de la sonda Homeo de detectar por hibridación en condiciones estrictas secuencias Homeo de <i>Drosophila</i> clonadas pertenecientes a clases diferentes.	65
23	Evaluación de la capacidad de la sonda Homeo de detectar por hibridación en condiciones poco estrictas secuencias Homeo de <i>Drosophila</i> clonadas pertenecientes a clases diferentes.	66

INTRODUCCION:

Los onicóforos constituyen un grupo de invertebrados vermiformes que se caracterizan por presentar un número variable de apéndices locomotores o lobopodios (Barnes, 1969). El grupo ha sido dividido en dos grandes familias distribuidas en áreas geográficas específicas alopátricas. La familia *Peripatidae* se encuentra en áreas circumtropicales de América, Asia y Africa, mientras que la familia *Peripatopsidae* se limita a zonas australes del planeta (Ghiselin, 1985).

Desde la primera descripción de un miembro de este grupo en 1826 por L. Guilding (Ghiselin, 1985), han surgido interrogantes en relación a su posición filogenética. Estas se han sustentado en la presencia de características fisiológicas y anatómicas compartidas tanto con anélidos como con artrópodos (Barnes, 1969), que han llevado a numerosos autores a considerarlos un eslabón o forma transicional entre estos grupos (Ghiselin, 1985).

Basado en datos de anatomía comparada y en apoyo a la hipótesis difilética del origen de los artrópodos, Manton (1985) clasifica a los onicóforos como parte del nuevo Filo Uniramia en el cual se incluyen miriápodos y hexápodos, y eleva Arthropoda a la categoría de Superfilo.

La evidencia embriológica (Anderson, 1973) por su parte, apoya esta visión y permite establecer que los artrópodos uniramios han divergido independientemente a

partir de un supuesto ancestro segmentado, probablemente un anélido primitivo marino y que los onicóforos no constituyen formas ancestrales de ningún otro miembro del grupo. Sin embargo, pareciera que los onicóforos han conservado casi invariables características morfológicas compartidas con dicho ancestro segmentado, lo que ha motivado esta consideración. El hallazgo en estratos Cámbricos de formas fósiles del género *Aysheaia* (Gould, 1989) que parecen pertenecer a organismos muy semejantes a los onicóforos actuales, sugiere que estos se han mantenido casi sin variación anatómica y que deben ser considerados más como fósiles vivientes que como formas transicionales.

En contraposición a esta visión polifiletista Brusca & Brusca (1990), basados en estudios de sinapomorfías proponen la existencia de una línea directa de evolución entre anélidos y artrópodos. En esta alternativa los onicóforos se derivan directamente de un presunto ancestro portador de numerosos apéndices ventrolaterales, del que a su vez se originó el posible ancestro pre-artrópodo que culminó en la aparición de los tardígrados y los artrópodos verdaderos. Es así como estos autores sitúan a los onicóforos como a un filo aparte debido a sus características particulares y grado de "artropodización".

Se ha sugerido que durante la evolución de los artrópodos, a partir de este ancestro multisegmentado portador de numerosos apéndices locomotores, debieron producirse dos grandes cambios genéticos (Lewis, 1978). En

primer término, la aparición de genes que promovieran la supresión de apéndices locomotores y que confirieran una identidad particular a cada segmento. En segundo término en ciertas líneas evolutivas se requirió de genes promotores de halterios. Wilson, Maxon y Sarich en 1974, propusieron que el cambio evolutivo se da primordialmente a nivel de los sistemas regulatorios más que en genes estructurales. En este sentido genes involucrados en el control del desarrollo embriológico pudieron haber variado a tal grado que generaran un cambio evolutivo del cual se deriva la diversidad observada entre los artrópodos unirramos (Raff & Kaufman, 1989).

Una nueva visión de la evolución de los artrópodos ha emergido recientemente con los estudios de Emerson y Schram (1990), que pretende establecer un vínculo evolutivo directo entre los artrópodos unirramos y los quelicerados, esta contrasta con la postura polifilética sustentada por los datos obtenidos en los estudios de morfología comparada y embriología. Según estos autores, la clave en este proceso es dada por la evolución misma de los apéndices birramos de los crustáceos.

Basados en la evolución de lo que ellos consideran una unidad del desarrollo, es decir, el complejo formado por un determinado segmento y su (s) apéndice (s), y gracias al hallazgo de un artrópodo fósil relacionado a los crustáceos ramípedos (*Tesnusocaris goldichi*), estos autores proponen que los apéndices birramos se derivaron de los unirramos por

fusión de segmentos adyacentes, en un proceso que originó inicialmente una condición semejante a la encontrada en *Tesnusocaris*, en el que esta fusión a nivel de la porción basal de los apéndices es incompleta, hasta culminar en el apéndice birramo encontrado en los crustáceos modernos. Una condición segmental similar a *Tesnusocaris* se presenta en miriápodos modernos como paurópodos y diplópodos considerados como los miembros más primitivos del grupo. En síntesis, se propone una secuencia evolutiva monofilética que coloca a un organismo ancestral uniramo diplosegmentado en la base, de la cual se derivan los grupos unirramos monosegmentados (insectos y centípedos) y los crustáceos birramos. Asimismo, se especula que este ancestro diplosegmental surgió de un organismo unirramo cercano al ancestro onicóforo.

Estudios moleculares del desarrollo pueden ser vitales para evaluar esta propuesta ya que se considera que la evolución de los diferentes tipos de complejos segmento-apéndice puede estar controlada por cambios en la expresión temporal de genes que median las relaciones intersegmentales. Genes que podrían pertenecer a esta categoría, son los conocidos como genes periódicos (pair-rule) que se expresan en segmentos pares o impares (*fushi-tarazu*, *even-skipped* y *paired*) o los que determinan la polaridad segmental (*engrailed* y *wingless*) en los embriones de *Drosophila* (Inghan, 1988), los cuales son siendo ampliamente estudiados a nivel molecular. El

descubrimiento también en *Drosophila* (McGinnis, 1984; Scott & Weiner, 1984) de secuencias asociadas a genes reguladores del desarrollo, conocidas actualmente como secuencias de consenso *Homeo*, ha permitido no solo tener un conocimiento preciso de los eventos moleculares que gobiernan la embriogénesis y organogénesis en *Drosophila*, sino también la detección y clonaje de genes homólogos en otros organismos (Holland & Hogan, 1986).

Se se considera que durante 500 millones de años los onicóforos han variado muy poco anatómicamente con respecto a su pariente fósil directo *Aysheaia* (Gould, 1989), su genoma podría haber congelado características de organización y regulación génicas ancestrales también es en este sentido que el aislamiento y análisis de genes involucrados en el control del desarrollo en onicóforos, un grupo de organismos que pareciera ser uno de los pocos puntos de convergencia entre los defensores de las corrientes mono y polifilética podría revelar las etapas primarias del proceso evolutivo de los artrópodos y contribuir a despejar esta controversia.

Molecularmente, los onicóforos han permanecido inexplorados por casi dos siglos lo cual puede deberse primordialmente a su restringida distribución geográfica y dificultad de recolecta. En Costa Rica estudios previos de campo han permitido definir regiones específicas de recolecta (Morera, en prensa). Basados en criterios de abundancia se ha seleccionado la especie *Epiperipatus*

biolleyi (Bouvier, 1902) como modelo de estudio para el establecimiento de la organización genómica de los onicóforos.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la organización genómica del onicóforo *Epiperipatus biolleyi* (Peripatidae, Onychophora) y determinar la presencia de secuencias homólogas a las secuencias de consenso Homeo de *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1 Caracterizar el ADN de *Epiperipatus biolleyi* y determinar los siguientes parámetros moleculares: porcentaje de bases guanina-citocina (% G-C) y valor C.
- 2 Determinar la presencia de familias de secuencias repetidas. Clonar estas secuencias y analizar su secuencia nucleotídica.
- 3 Elaborar una genoteca de *Epiperipatus biolleyi* y analizarla por medio de sondas de ADN correspondientes a secuencias Homeo de *Drosophila melanogaster*.

REVISION DE LITERATURA:

ORGANIZACION Y EVOLUCION DE GENOMAS EUCARIONICOS

I. CONTENIDO DE ADN Y SU SIGNIFICANCIA EVOLUTIVA:

Los sistemas eucariónicos que comparten en la actualidad nuestro planeta son el producto de la interacción entre las fuerzas evolutivas y un genoma que ha demostrado ser depositario de una gran plasticidad. Con los avances en las técnicas moleculares, la casi completa disección del genoma eucarión ha sido abordada y han sido revelados aspectos relevantes de su estructura y regulación.

En el proceso de caracterización de un genoma eucarión particular dos aspectos estructurales deben ser considerados: el contenido de ADN por genoma haploide conocido como valor C y la complejidad de secuencias de dicho material. El análisis de las variaciones que estos parámetros han experimentado en los diferentes linajes puede ser revelador de cual ha sido su contribución particular al proceso evolutivo y la tendencia que éste ha seguido a través de los siglos.

Durante la primera mitad del siglo 20, los citólogos consideraban como una de las principales características de la célula, que el contenido de ADN de las diferentes células de un organismo era altamente variable. No fue sino después de los trabajos pioneros de Boivin (1949) y Mirsky & Ris (1951) que se demostró como el

contenido de ADN es característico para cada organismo y que es un valor constante para todas las células, con excepción de las células germinales que por su condición haploide poseen la mitad del contenido de las células somáticas. Mirsky (1951) realizó un análisis del contenido de ADN de 60 diferentes especies que incluían vertebrados e invertebrados. En términos generales estos estudios sugirieron las siguientes relaciones entre el contenido de ADN y el proceso evolutivo:

1. Podría haber una tendencia al aumento de ADN si se comparan invertebrados inferiores (esponjas y celenterados) con superiores (insectos).

2. Organismos relacionados, por ejemplo miembros de una misma familia, evidencian poseer cantidades similares de ADN.

3. La evolución de los vertebrados terrestres ha ido acompañada de una disminución en el contenido de ADN.

Estudios posteriores que incluían un espectro más amplio de organismos (Sparrow, 1972) ahondaron en lo que había sido la preocupación de muchos investigadores: la relación entre contenido de ADN y la complejidad orgánica. Intuitivamente se esperaba obtener una correlación positiva que demostrara un significativo aumento en el valor C conforme aumentaba la complejidad.

Si bien una ligera tendencia en ese sentido puede

entreverse al comparar un número limitado de grupos; el estudio más exhaustivo llevó al surgimiento de algunas contradicciones que han sido referidas en la literatura como la "Paradoja del Valor C". Raff y Kaufman consideran que ésta se nutre de tres incongruencias básicas.

En primer término y basados en los resultados de Sparrow, se determinó que organismos con diferentes grados de complejidad pueden compartir valores muy cercanos de contenido de ADN, como es el caso de *Drosophila* (Valor C 0.18 pg) considerado como un organismo complejo que sin embargo, comparte estos valores con mohos y esponjas. En esta misma perspectiva se ha determinado que organismos considerados primitivos (peces pulmonados) muestran valores C mayores que organismos relacionados más avanzados, esta tendencia es particularmente clara en el caso de los insectos (Raff & Kaufman, 1983). En este caso, sin embargo, es conveniente recordar que el avance evolutivo en un linaje determinado puede significar especialización más que aumento en la complejidad orgánica, como ocurre en parasitismo y especialización hacia formas más sencillas en su estructura (ej. serpientes).

Un segundo componente está representado por la existencia de organismos muy relacionados e inclusive con un ajuste evolutivo similar, que amenudo presentan genomas de tamaños diferentes, como se demuestra en el caso de diferentes especies de *Drosophila* (Laird, 1973).

En tercer término se hace notar que organismos con genomas notablemente pequeños contienen más ADN que el que se expresa en realidad. Las dos últimas incongruencias convergen en el hecho de que el ADN es un agente activo en el proceso evolutivo y sus variaciones pueden contribuir significativamente al surgimiento de nuevos organismos. El aumento del contenido de ADN por mecanismos de duplicación y divergencia puede no sólo contribuir con el surgimiento de nuevas secuencias génicas, sino que tener un efecto significativo sobre los procesos de división celular y desarrollo (Cavalier-Smith, 1978) .

II. LA COMPLEJIDAD DEL GENOMA EUCARIONICO:

Como se desprende de los análisis del contenido de ADN de los organismos eucariónicos , el aumento del material génico ha sido una estrategia común seguida en muchos linajes que ha llevado a generar una gran diversidad (en cuanto a la organización) de las secuencias génicas.

De acuerdo a su representación en el genoma, las secuencias génicas en eucariones se clasifican en : 1) secuencias únicas, de las cuales es posible encontrar sólo una copia por genoma haploide y que contribuyen a la heterogeneidad de los ARN mensajeros ; 2) secuencias moderadamente repetidas con una representación de 10^3 - 10^5 copias por genoma haploide y 3) secuencias altamente repetidas con más de 10^6 copias (Jelinek, 1982).

La unidad de repetición y organización de las dos últimas categorías de secuencias es característica y ha sido determinada por medio de digestiones con enzimas de restricción (Singer, 1982).

Las secuencias altamente repetidas muestran una complejidad que varía de 2 a 2350 pares de bases (pb) (Gabor, 1982), sus copias se organizan y forman un arreglo en tandem que se concentra en zonas heterocromáticas de los cromosomas (Singer, 1982). Debido a su alto patrón de repetición y a su composición particular de bases, algunas secuencias altamente repetidas pueden ser separadas de la banda principal de ADN al ser centrifugadas en gradientes isopícnicos de Cloruro de Cesio (Singer, 1982), y forman la entidad conocida clásicamente como ADN satelítico. Aquellas que están presentes en menor cantidad o cuya composición en bases no permite su separación en Cesio, han sido clasificadas como satélites crípticos (Singer, 1982). Ambos tipos de satélites presentan un comportamiento replicativo similar, caracterizado por replicación tardía en fase S del ciclo celular y baja replicación en cromosomas politénicos (Singer, 1982). Aunque usualmente no se presenta transcripción apreciable, ésta ha sido demostrada en cromosomas plumulados durante la oogénesis en *T. cristatus* (Varley *et al.*, 1980; Baldwin & Macgregor, 1985); en *Notophthalmus viridescens* (Díaz *et al.*, 1981) y en *Xenopus laevis* (Jamrich *et al.*, 1983). Se desconoce sin embargo, si esta transcripción es producto de un evento de lectura a

través por falla en el proceso de terminación de la transcripción de genes adyacentes (Singer, 1982).

Aunque se reconoce la presencia de ADN satélite en un amplio rango de organismos su función permanece aún sin ser dilucidada. Han sido postuladas hipótesis que los relacionan con la organización del genoma (Raff & Kaufman, 1989); en procesos de compactación de la cromatina por la participación de proteínas de unión a dichas secuencias (Strauss & Varshavsky, 1984); y en procesos de línea germinal (Singer, 1982).

Más que por su frecuencia de repetición, las secuencias moderadamente repetidas se caracterizan por encontrarse dispersas entre secuencias únicas y usualmente exhiben el mismo porcentaje G:C que el resto del genoma, por lo cual no forman parte de los ADN sateliticos (Bouchard, 1982). En la actualidad se reconocen dos patrones generales de dispersión: el patrón de dispersión presente en *Xenopus* denominado como patrón de corta intercalación (Bouchard, 1982), en el que secuencias únicas de más de 1000 pb se intercalan con secuencias repetidas de 100 a 500 pb; y el patrón encontrado en el genoma de *Drosophila*, en el que secuencias únicas de 10 kb se intercalan con secuencias repetidas de 6-7 kb (Deininger y Daniels, 1986). Pocos ejemplos de este patrón han sido detectados (Crain *et al.*, 1981), y es más difundido el patrón de corta intercalación tipo *Xenopus*.

En mamíferos, estudios a nivel molecular han revelado la presencia de secuencias moderadamente repetidas de corta y larga intercalación que han sido denominadas por Singer (1982) , como secuencias repetidas cortas y dispersas (SINES) y secuencias repetidas largas y dispersas (LINES).

La más prominente de las secuencias SINES en mamíferos es la familia conocida como Alu que representa del 3-6 % del genoma humano (Jelinek & Schmid, 1982). Estudios de secuenciación de nucleótidos han demostrado (Jelinek & Schmid, 1982) que la secuencia Alu de humanos es un dímero imperfecto formado por dos repeticiones directas , cada monómero de aproximadamente 130 pb . Una comparación de secuencias con la familia SINES B1 de roedores, demostró una extensiva homología con uno de los monómeros de la secuencia Alu humana (Jelinek & Schmid, 1982). Estos resultados llevaron a la conclusión de que estas dos familias son descendientes de una secuencia ancestral común, lo cual fue corroborado al comprobar que ambas mostraban considerable homología al gen del ARN 7SL que ha sido altamente conservado durante la evolución y que provee además indicios del posible origen de estas familias por un mecanismo de retrotranscripción (Deininger & Daniels, 1982).

La familia LINES mejor estudiada es, la conocida como L1 que está ampliamente distribuida entre los mamíferos (humanos, primates y roedores) y está constituida por una serie de secuencias que comparten su extremo 3' pero son truncadas variablemente en el 5' . Esta familia parece

haber derivado de una secuencia codificante de identidad desconocida pero transcrita por la enzima ARN polimerasa II (Deininger & Daniels, 1986). Evidencias recientes (Di Nocera & Sakaki, 1990) postulan la existencia de una superfamilia LINES en otros eucariotas (*Drosophila*, *Neurospora*; *Tripanosomas* y *Zea mays*) que se caracteriza por presentar marcos de lectura abiertos (ORF) con obvia homología a la enzima transcriptasa reversa, lo que sugiere su identidad como elementos retrotransponibles. En *Drosophila* se han identificado varias familias de elementos retrotransponibles relacionadas a las secuencias LINES, algunos de ellos capaces de trasponerse eficientemente luego de inducción experimental. Aunque aún no se ha demostrado sin ambigüedad la transposición de secuencias LINES en mamíferos, si han sido aisladas transcritos completos de secuencias LINES a partir de células de teratocarcinoma que forman parte de partículas ribonucleoproteicas, reminiscentes de retrotrasposones.

III. REGULACION GENICA EN EUCARIONES: EL MODELO DE LA GENETICA MOLECULAR DEL DESARROLLO EMBRIOLOGICO EN DROSOPHILA:

La fracción del genoma eucarión que corresponde a las secuencias únicas, es la responsable por las capacidades codificantes y reguladoras de un sistema genético particular. Una de las características más

significativas de la evolución orgánica, es que la morfogénesis parece estar gobernada por un número relativamente pequeño de genes reguladores, y que el cambio evolutivo ocurre por modificaciones en el programa genético del desarrollo embriológico (Raff & Kaufman, 1983).

Por eso serán analizados como modelo de regulación génica los principales aspectos de la genética molecular del desarrollo de *Drosophila melanogaster*. En las últimas décadas la sofisticación de las técnicas moleculares ha permitido un avance significativo en el conocimiento de los mecanismos de control génico que gobiernan los principales procesos vitales en los organismos eucarióticos. En particular, se ha logrado una clara definición de los principales eventos del programa del desarrollo embriológico en *Drosophila melanogaster*, un organismo que desde su introducción como modelo genético en 1910 por T.H. Morgan, ha generado una cantidad monumental de información genética. En un organismo relativamente simple como *Drosophila melanogaster* con un genoma de apenas 165 millones pb y un estimado de 5000 genes, se calcula que se requiere cerca de un 30 % de dicha capacidad codificante para el control apropiado del desarrollo embriológico (Raff & Kaufman, 1983).

El análisis morfológico y genético de una serie de mutantes naturales e inducidos de este organismo, ha permitido la detección de toda una gama de genes involucrados en el control del desarrollo embriológico y

la definición de las principales etapas del mismo.

En términos generales se presentan 3 etapas moleculares básicas :

1) Una primera etapa en la que se establece la organización espacial del huevo aún no fertilizado. En esta etapa información posicional codificada por genes de origen materno, define los ejes dorso-ventrales y antero-posteriores. Al menos 10 genes han sido involucrados en el establecimiento de la dorsoventralidad, entre ellos los genes dorsal (dl)(Roth, 1989) y Toll (tl) (Levine, 1988) son sido investigados extensivamente estudiados a nivel molecular. Mutaciones recesivas de cualquiera de los 10 genes dorsalizantes producen embriones que carecen de estructuras ventrales (Inghan, 1988).

El patrón anteroposterior es determinado también en primera instancia por genes de origen materno, de los cuales el gen bicoid (bcd) (Driever & Nusslein-Volhard, 1988) y el grupo de genes conocidos como oskar (osk) juegan un papel preponderante. Se ha demostrado experimentalmente que los productos de transcripción de bcd se acumulan en el huevo en el polo anterior, mientras que los productos del grupo oskar son depositados en el polo posterior . Mutantes de estos genes se caracterizan por carecer de cabeza y tórax en el caso de bcd y de abdomen en el caso de oskar (Inghan, 1988).

2) La etapa siguiente determina la regionalización del embrión a lo largo del eje anteroposterior como preludeo al

establecimiento del patrón metamérico. Tres clases de genes cigóticos han sido involucrados en este proceso: a) la clase conocida como "GAP", caracterizados por ser genes capaces de interpretar la información posicional depositado por los genes de efecto materno. Sus fenotipos mutantes determinan el nombre de la clase ya que los embriones carecen de extensas regiones continuas en el patrón anteroposterior (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Miembros relevantes de esta clase son: **Hunchback (hb)**, **Kruppel (Kr)** y **knirps (kni)**. b) los miembros de la segunda clase se conocen como genes periódicos (pair-rule) que se expresan temporalmente y forman de 7 a 8 bandas durante la celularización del blastodermo en patrones específicos para cada uno de ellos (Scott & Carroll, 1987). Los genes **fushi-tarazu (ftz)**, **even-skipped (eve)** y **paired (prd)** son representativos de esta clase; sus mutantes producen embriones carentes de regiones periódicas (pares o impares) que reflejan el patrón de expresión del gen. c) en la tercera clase se incluyen los genes que determinan la polaridad de cada parasegmento, dentro de los que se incluyen **engrailed (en)** y **wingless (wg)**. Si se interpreta el patrón de bandas de expresión de los genes periódicos, estos genes establecen los límites anterior y posterior de cada parasegmento por la expresión de los productos de **engrailed** y **wingless**, respectivamente. Quedan así definidos los dominios de expresión de los genes homeóticos que participarán en la siguiente etapa del desarrollo.

3) Diferenciación de las estructuras segmentales. En este proceso participan genes conocidos como homeóticos que pertenecen a dos complejos génicos: el Complejo Ultrabitorax (Peifer *et al.*, 1987) que determina la diferenciación de las estructuras del segundo y tercer segmento torácico y los segmentos abdominales; y el Complejo Antenapedia (Scott *et al.*, 1983) que determina la diferenciación de los segmentos de la cabeza y primer segmento torácico. Los primeros indicios de la existencia de los genes de dichos complejos, se dieron con el aislamiento por Bridges y Morgan (1915) y Lewis (1978) de las llamadas mutaciones homeóticas, que se caracterizan por la presencia de estructuras normales en sitios aberrantes. El estudio de estas mutaciones llevó a Lewis a la conclusión de que estas variaciones se presentaban como producto de mutaciones en genes que estaban involucrados en el control del desarrollo. En la actualidad, la mayoría de estos genes han sido clonados y estudiados extensivamente (Scott, 1985; Bender *et al.*, 1983). En particular, el descubrimiento de la existencia de una pequeña región de homología entre algunos de estos genes, ha permitido extender los estudios de la genética molecular del desarrollo a otros grupos de organismos. Esta región de homología conocida como secuencia de consenso Homeo fue descubierta por Scott y Weiner (1984) y MC·Ginnis *et al.*, (1984) y corresponde a un dominio de apenas 61 aminoácidos en el extremo carboxilo de los productos de dichos genes.

Por comparación de secuencia con proteínas reguladoras procariónicas (Pabo & Sauer, 1984; Laughon & Scott, 1984) y por resonancia magnética nuclear (Qian *et al.*, 1989) se ha determinado que este dominio proteico adquiere una estructura terciaria conocida como hélice a-lámina b-hélice a (hélice-giro-hélice). Esta conformación es característicamente encontrada en los llamados factores transcripcionales y es precisamente el dominio de unión al ADN de estas proteínas reguladoras (Struhl, 1989). La integración de esta información con los estudios posteriores de unión a secuencias génicas específicas (Desplan, 1988; Ohkuma, 1990) llevó a la conclusión de que los genes homeóticos así como algunos de los genes que participan en etapas previas del desarrollo, ejercen su función reguladora al controlar la transcripción de otros genes ya sean efectores o reguladores, miembros de la jerarquía de control del desarrollo (Levine & Hoey, 1988 ; Biggin & Tjian, 1989). Se han logrado localizar genes portadores de la secuencia de consenso Homeo en una gran gama de organismos por estudios de hibridización molecular (Holland & Hogan, 1986; Scott, 1989) estos incluyen proterostomados y deuterostomados, lo que hace suponer que esta secuencia ha existido hace al menos 800 millones de años, tiempo estimado de divergencia entre ambos grupos.

Es relevante mencionar la detección de genes portadores de esta secuencia en murinos (Kessel & Gruss, 1990) y humanos (Levine, 1984) , que además presentan

patrones de organización molecular y expresión génica análogos a los detallados en *Drosophila* (Akam, 1989). Esto permite al menos intuir su participación como factores transcripcionales en el desarrollo . La aparente validez de un modelo para *Drosophila* y un vertebrado podría sugerir que estos genes cumplen una función básica en la morfogénesis (De Robertis, 1990).

MATERIAL Y METODOS:

1. Recolecta y selección de especímenes:

Organismos de la especie *Epiperipatus biolleyi* fueron utilizados como especímenes de estudio. Esta selección se basó primordialmente en criterios de abundancia y factibilidad de recolecta. En Costa Rica ha sido determinada su presencia desde altitudes de 100 metros (Orotina, Puntarenas) hasta los 2.000 metros (La Estrella, Talamanca), en zonas de bosque húmedo y muy húmedo (Morera, en preparación). Estudios preliminares de abundancia (Morera, en preparación) sitúan a Cascajal de Coronado (1800 metros, San José) como la localidad idónea para la recolecta por su accesibilidad y abundancia relativa, lo que asegura el éxito de recolecta durante la mayor parte del año. Su hábitat, en esta zona, lo constituye predominantemente el musgo asociado a rocas y paredones. Los miembros de esta especie presentan un color rojo carmín y un claro dimorfismo sexual en el cual las hembras son de mayor tamaño (20 mm a 70 mm para las hembras y de 18 a 47 mm para los machos) y presentan un número mayor de lobopodios (de 30 a 31 pares en las hembras y de 27 a 28 pares en los machos) (Morera, en preparación).

Los especímenes recolectados pueden ser mantenidos en el laboratorio por períodos de hasta 2 meses en recipientes de estereofón con una cama de musgo y abundantes artrópodos pequeños (termitas, isópodos, etc.).

Debe mantenerse un alto grado de humedad ya que estos organismos son altamente sensibles a la desecación (Campiglia, 1976) .

2. Extracción del material genético (ADN):

Debido al tamaño de estos organismos y a la imposibilidad de realizar disecciones individuales que generen un rendimiento apropiado de ADN, se procedió a realizar la extracción del ADN a partir de un grupo de organismos (5 o más) en el que se incluían tanto machos como hembras. Los especímenes eran colocados en un mortero (mantenido sobre hielo picado) al cual se adicionó nitrógeno líquido (-196 C) y se maceraron hasta obtener un pulverizado fino. Dicho pulverizado fue resuspendido en 1-5 ml de tampón de lisis pH 8.5 (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.02 M, SDS 1%), suplementado con una solución de la enzima Proteinasa K (1mg/ml) hasta obtener una concentración final de 100 mg/ml. Esta mezcla se incubó a 53 C por un periodo de 1-3 horas, al cabo del cual se procedió al aislamiento del ADN mediante el método tradicional que utiliza extracciones fenólicas y precipitación con etanol (Maniatis *et al.*, 1982). Este proceso involucra la adición de un volumen igual de fenol saturado con tris 0.1 M, pH 8, homogenización y centrifugación a 10 Krpm/min durante 10-15 minutos a 4 C, lo que produce la separación de una capa fenólica (inferior) y una acuosa (superior) en la que se

particiona el ADN. La fase acuosa es re-extraída de 2-3 veces más con fenol saturado ; una vez con una mezcla 1:1 de fenol saturado-cloroformo isoamilo 24:1 y finalmente con cloroformo isoamilo 24:1. El ADN se precipitó al adicionar a esta última fase acuosa 2 volúmenes de etanol absoluto (-20 C) y Acetato de Sodio a una concentración final de 0.25 M. El ADN se enrolló en una varilla de vidrio y el exceso de sales se eliminó mediante lavados con etanol 70% , solución en la cual se almacenó a -20 C. Antes de ser utilizado el ADN enrollado debió ser sometido al siguiente tratamiento : lavado 2 veces con etanol 70% ; 2 veces con etanol absoluto y 2 veces con Eter Dietílico libre de peróxidos. El ADN se dejó secar al aire y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE pH 8 (Tris 10 mM , EDTA 1mM). Las preparaciones de ADN así obtenidas fueron analizadas y cuantificadas por espectrofotometría ultravioleta a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro Hitachi (modelo 200-20). Se estimó la concentración de ADN por medio de un coeficiente de extinción de 1 unidad óptica equivalente a 50 ug/ml y la presencia de proteínas contaminantes por la razón 260/280. En aquellos casos en que esta razón fue menor a 1, las preparaciones fueron reextraídas con fenol y precipitadas con etanol a fin de eliminar el exceso proteico.

3. DETERMINACION DEL % DE BASES GUANINA: CITOSINA Y PERFILES DE FLOTACION EN GRADIENTES ISOPICNICAS:

Para la determinación del % G-C la preparación de ADN fue sometida a ultracentrifugación en gradientes analíticas de Cloruro de Cesio (Sigma) a 44 000 rpm por 24 horas, a 25 C según el método descrito originalmente por Meselson y Stahl (1957), se utilizó como control el ADN del fago C2 ($\rho = 1.742 \text{ g/cm}^3$).

Las gradientes preparativas fueron elaboradas de la siguiente manera: una solución de ADN de *E. biolleyi* en tampón T.E. fue llevada a una densidad de 980.4 mg/ml (índice de refracción de 1.4) con la adición de Cloruro de Cesio. La solución final fue distribuída en tubos de centrífuga que fueron colocados en un rotor de ángulo variable (Hitachi, RP65T). Se centrifugó a 35 krpm por 72 horas a 20 C, en una ultracentrífuga preparativa Hitachi 65P. La gradiente fue fraccionada por medio de un analizador ultravioleta UA-5A (LKB)

4. DETERMINACION DEL VALOR C:

La determinación del contenido de ADN por núcleo haploide (Valor C) se realizó a partir de preparaciones de células de hemolinfa tratadas por el método de Mizuno & Macgregor (1974). La hemolinfa fue obtenida por medio de una punción fina (aguja de calibre 26) en la línea media dor-

sal a nivel del segundo par de lobopodios, región que corresponde a la localización del corazón dorsal del organismo (Campiglia, 1976). La hemolinfa fue recolectada con un tubo capilar y depositada en un portaobjetos sobre el cual se procedió a hacer un frotis que se dejó secar al aire por 2 minutos. Las preparaciones fueron expuestas a vapores de formalina por 15 minutos, y posteriormente fueron fijadas en una mezcla 3:1 de etanol absoluto-ácido acético (fresco y frío) otros 15 minutos, para finalmente ser sometidos a 2 cambios de etanol 95% de 5 minutos cada uno, al cabo de los cuales se dejaron secar al aire. Frotis de linfocitos humanos que fueron utilizados como células control se sometieron al mismo procedimiento. Los frotis fueron teñidos con el reactivo de Feulgen y se midieron con un microdensitómetro Reickert. El valor promedio de las 20 mediciones obtenidas en cada caso fue utilizado para estimar el contenido de ADN por núcleo haploide, se asumió un valor C humano de 3.4 pg (John & Miklos, 1988).

5. Aislamiento de secuencias repetidas:

La determinación de la presencia de familias de secuencias repetidas se realizó por digestión del ADN genómico purificado con una serie de endonucleasas de restricción tipo II. Las siguientes enzimas fueron utilizadas: Alu I, BamH I, Bgl II, Eco RI, Hae III, Hind III, Pst I y Sma I. Las condiciones de reacción utilizadas

fueron las establecidas por los proveedores y se siguieron las recomendaciones de Maniatis (1982).

En términos generales se digirieron de 10 -20 ug de ADN en volúmenes de reacción de 20-50 ul; la enzima fue adicionada a una relación de una unidad Weiss (1976) por microgramo de ADN y con suero bovino (BSA) a una concentración final de 100 ug/ml como estabilizador enzimático o espermidina (1 mM) como estabilizador de cargas del ADN. La fuerza iónica de la mezcla de reacción fue establecida con la adición del tampón de digestión adecuado para cada enzima. La digestión fue incubada a 37 C de 3-12 horas y la reacción se inhibió con la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM.

Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y teñidos con Bromuro de Etidio. La visualización de dichos fragmentos se hizo por la emisión de fluorescencia por parte del Bromuro de Etidio intercalado en las bases nucleotídicas en respuesta a luz ultravioleta transmitida (300 nm)(Maniatis, 1982).

Las bandas o fragmentos más prominentes que corresponden a familias de secuencias repetidas fueron recuperadas del gel y eluidos de la agarosa por el método de la sílica de Vogelstein y Gillespie (1979) , cuyo fundamento es la adhesión preferencial de los ácidos nucleicos a una suspensión de sílica en ambientes de alta fuerza iónica.

6. Clonaje de secuencias repetidas:

Las secuencias repetidas así recuperadas fueron clonadas en un vector de expresión pUC13 (Messing & Vieira, 1982). La reacción de ligación se realizó con la enzima ligasa T4 y se incubó a temperatura ambiente por 4 horas (King y Blakesley, 1986). La mezcla de ligación fue adicionada a células bacterianas de la cepa JM103 previamente tratadas con Cloruro de Calcio por el método de Hanahan (1985) con el fin de permitir la penetración de los plásmidos a la célula bacteriana, proceso conocido como transformación.

La selección de los plásmidos recombinantes se realizó en un sólo paso en platos de medio LB (triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.5) suplementados con ampicilina a una concentración final de 25 ug/ml, con IPTG (isopropil B-D-tiogalactósido) como inductor y Xgal (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil B-D-galactopiranosido) como indicador de color según la reacción de b-complementación de la enzima b-galactosidasa (Ruther, 1980). Los plásmidos recombinantes pierden la capacidad de producir dicha enzima debido a que la inserción del ADN "extraño" se produce en este gen específicamente. Las clonas bacterianas consideradas como portadoras de plásmidos recombinantes (debido a su inhabilidad de desarrollar color) fueron cultivadas y lisadas con el objetivo de aislar el plásmido y someterlo a electroforesis en geles de agarosa para

comprobar la efectividad de la reacción y el tamaño de los insertos.

7. Secuenciación de ácidos nucleicos:

La secuencia repetida clonada fue subclonada en el plásmido pGEM 7Zf (Promega), para lo cual tanto el inserto como el vector fueron digeridos con la combinación de enzimas Hind III /EcoRI con el objetivo de generar extremos complementarios que permitieran la ligación. Una vez comprobado por electroforesis la efectividad de este subclonaje, se procedió a generar una serie de deleciones unidireccionales del ADN insertado por medio del sistema "Erase a base"(Promega). En este procedimiento desarrollado por Henikoff (1984) el plásmido recombinante derivado de pGEM 7Zf fue digerido con las endonucleasas BamHI y Bst XI para generar un extremo 5'cohesivo cercano al ADN insertado y un extremo 3'romo cercano al promotor de la polimerasa ARN conocida como SP6, respectivamente. Aproximadamente 5 ug de este ADN linearizado fueron sometidos a reacción con la exonucleasa III (Exo III) (250-500 U) en un tampón apropiado (Tris-HCl 66 mM, pH8.0; MgCl2 0.66 mM) a 37 C. A intervalos de 30 segundos se tomaron alícuotas de 2.5 ul de esta mezcla de reacción hasta completar 15 puntos. Cada una de las alícuotas fue vertida en un tubo de microcentrífuga que contenía 2 U de la nucleasa S1 en un tampón de Acetato

de Potasio 0.04 M pH 4.6, NaCl 0.33 M y glicerol 6% . Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y la reacción fue inhibida con la adición de un tampón que contía tris base 0.3 M, EDTA 0.05 M y una incubación de 10 minutos a 7 C. La mezcla resultante fue incubada por 3 minutos a 37 C con la polimerasa Klenow y sometida a ligación con la enzima ligasa T4. Se procedió a la transformación en células competentes (*E. coli* JM103) . Las colonias bacterianas resultantes fueron cultivadas y lisadas con la finalidad de obtener los plásmidos recombinantes que fueron analizados por electroforesis en agarosa.

Deleciones seleccionadas fueron secuenciadas por el método dideoxi (Sanger *et al.*,1977), por medio del sistema SEQUENASE (U.S.B.). En este protocolo, 2 ug de ADN del plásmido delecionado fueron desnaturalizados por la adición de NaOH y EDTA al 0.2 M y neutralizados con Acetato de Sodio al 0.3 M. Posteriormente fueron precipitados con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, lavados con etanol 70% y secado al aire. El ADN desnaturalizado fue resuspendido en agua destilada estéril. La reacción de secuenciación comprendió varias etapas. Durante la fase de asociación 2 ug del ADN a secuenciar preparado en la forma antes detallada se mezclaron con aproximadamente 0.5 pmol del imprimador elegido , en este caso el correspondiente al promotor de la polimerasa ARN Φ 6, el cual está presente en el plásmido pGEM 7Zf seleccionado para el subclonaje , en un tampón que contenía

Tris.HCl 40 mM pH 7.5, MgCl₂ 20 mM, NaCl 50 mM. La reacción se dejó proceder por 15 minutos a 37 C, al cabo de los cuales se adicionó ditiotrietol (DTT) al 0.01 M ; tampón de marcaje que contenía dGTP dCTP, dTTP al 1uM y dATP S³⁵; finalmente se adicionó la polimerasa de ADN obtenida del bacteriófago T7 modificada por Tabor y Richardson (1987) que se conoce como " secuenasa " . La reacción se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se distribuyó en 4 tubos de microcentrífuga rotulados G, A, T, C, cada uno de los cuales contenía un único nucleótido dideoxi (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP respectivamente) además de los tres dNTP restantes a una concentración final de 80 uM. Esta mezcla se incubó a 37 C por 5 minutos y la reacción fue inhibida por la adición de un tampón conteniendo formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xilen-cianol 0.05% .

Las reacciones de secuenciación fueron corridas en geles de poliacrilamida por el método de Laemmli (1970), los cuales fueron fijados en Acido Acético al 10% y teñidos con Azul de Coomassie. Los geles fueron secados en un secador Fotodyne y autoradiografiados .

Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas y analizadas con el programa de computadora conocido como GENEPRO (Hoefer Scientific Instruments, 1986) que permite elaborar patrones de restricción y determinación de homologías de secuencia con genes de diferentes organismos.

8. Elaboración y análisis de una genoteca:

Con el objetivo de contar con múltiples clonas recombinantes que contengan en promedio las secuencias contenidas en el genoma de *Epiperipatus biolleyi*, se elaboró una genoteca. Esta metodología involucró las siguientes etapas:

I Selección de los fragmentos a clonar:

ADN genómico de *Epiperipatus biolleyi* fue digerido parcialmente con la enzima de restricción Sau 3A , lo que permitió obtener una población de fragmentos de aproximadamente 20 Kb. Dicha digestión fue corrida electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.5%, la región correspondiente a 20 kb fue cortada del gel y eluida por medio del método de la sílica. El producto de esta elución se cuantificó por el método de fluorescencia relativa en gel (Maniatis *et al.*, 1982) y fue utilizado como inserto en la reacción de ligación.

II Ligación:

La mezcla de reacción contenía cerca de 150 ng del ADN inserto; 1 ug del ADN vector que correspondía al fago Lambda de reemplazo conocido como **EMBL3** (Pharmacia) (Maniatis *et al.*, 1982) que había sido cortado con la enzima BamHI; 1 unidad de enzima ligasa T4 y un tampón de digestión con Tris-HCl 50 mM pH7.6, MgCl₂ 10 mM, polietilenglicol 8000 al 5%, ATP 1 mM y ditiotrietol 1 mM. La reacción se incubó a 16 C toda la noche.

III Empaquetamiento " in vitro" :

La reacción de ligación fue sometida al proceso de empaquetamiento " in vitro" con el objetivo de permitir el ensamblaje de las partículas virales y la penetración del ADN del fago recombinado. La reacción utilizó extractos de empaquetamiento comerciales (Gigapack II Gold, Stratagene) que fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente con 4 ul de la reacción de ligación; esta mezcla fue diluida con 500 ul de tampón SM (NaCl 5g/L, MgSO₄ 2g/L, Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 y gelatina 0.01 %) y centrifugada por 20 segundos. El sobrenadante fue titulado como se describe a continuación: se elaboraron alrededor de 5 diluciones decimales en tampón SM, las cuales se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente con 100 ul de células de *E. coli* LE392 tratadas con Sulfato de Magnesio (Maniatis et al., 1982). Luego de esta incubación, se adicionaron 4 ml de agar YT suave (medio YT , agar 0.7%) que había sido previamente fundido y mantenido a 50 C. Esta mezcla fue vertida en platos de medio de cultivo YT 1X sólido (extracto de levadura 5g/L, NaCl 5g/L, triptona 8g/L, pH 7.5, agar 1.5%) e incubados a 37 C durante toda la noche. La aparición de placas claras indicó la presencia de partículas viables de fagos recombinantes. El conteo de estas placas permitió la determinación de la concentración del fago o unidades formadoras de placas (UFP).

IV Amplificación de la genoteca:

Una vez verificada la presencia de fagos recombinantes capaces de generar placas se incrementó la población mediante el siguiente método de amplificación: se procedió a empaquetar el resto de la reacción de ligación, y se cultivó esta vez en platos de medio YT 1X a una densidad de 50 000 placas de fagos. Luego de una incubación a 37 C toda la noche, se adicionaron 45 ml de tampón SM esteril y se incubó a 4 C toda la noche. Con una pipeta serológica se recolectó el eluido, el cual fue titulado y constituye la genoteca. La adición de cloroformo aseguró la esterilidad y permite el almacenamiento indefinido a 4 C.

V Análisis de los recombinantes

El análisis de la genoteca, se hizo por hibridación molecular (Hames, 1985) con sondas marcadas radioactivamente con la finalidad de evaluar la presencia de secuencias homólogas a las secuencias Homeo de *Drosophila*.

Se llevaron a cabo 3 ciclos de selección: en el primer ciclo se cultivó la genoteca a una alta densidad de (50 000 placas/plato) en platos de medio YT 2X. Las placas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa según el método de réplica descrito en el Maniatis (1982) . Esta transferencia fue sometida a hibridación bajo condiciones poco estrictas (5XSSC, Denhardt 10X, 37 C). Mediante autoradiografía se detectaron las placas positivas por hibridación. Estas regiones positivas fueron extraídas del

gel y eluidas en tampón SM. En un segundo ciclo de selección, los eluidos fueron cultivados a una menor densidad (10 000 placas/plato), se repitió todo el proceso antes descrito. Los eluidos así obtenidos fueron cultivados a una densidad más baja (500 placas/plato). Estos eluidos finales fueron considerados como una población homogénea de fagos que presentaban al menos un 50% de homología con las secuencias Homeo.

9. Preparación de sondas radioactivas :

El ADN utilizado como sonda se derivó de la clona pGBB que contenía la secuencia codificante del gen Antenapedia e incluía la secuencia Homeo . Por medio de la reacción de polimerización en cadena (Saiki *et al.* ,1985) y la enzima polimerasa Taq se logró la amplificación de sólo la secuencia Homeo presente en este gen. Los dos oligos empleados cubrían los 31 nucleótidos 3' y 26 nucleótidos 5' que limitan la secuencia Homeo. La reacción de amplificación fue corrida en un gel de agarosa al 2% y la banda correspondiente a la secuencia homeo fue electroeluida con el sistema Elutrap (Schleicher & Schuell). El eluido fue precipitado y resuspendido en tampón TE. Una fracción de esta preparación fue marcada radioactivamente mediante la reacción de imprimadores al azar (Feinberg & Vogelstein, 1983) que contenía: 10-500 ng de ADN a marcar desnaturalizado ; 20 ug de hexanucleótidos imprimadores ; tampón de marcaje (Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, MgCl 5 mM,

b-mercaptoetanol 0.01 M); mezcla de nucleótidos no radioactivos (dCTP, dGTP, dTTP) a una concentración final de 60 μ M cada uno, α -dATP P^{32} 2 mCi/ml ; 5 unidades del fragmento de Klenow de la enzima Polimerasa I de ADN . La reacción se incubó por 30 minutos a 37 C. La radioactividad no incorporada fue eliminada con el uso de una minicolumna de Sephadex G50 (Maniatis *et al.*, 1982).

Las clonas que presentaban algún grado de homología a las secuencias Homeo fueron cultivadas con la finalidad de obtener el ADN del fago recombinante. De este material genético se elaborará en una investigación posterior un mapa de restricción que será comparado al mapa correspondiente a otros genes que porten secuencias Homeo. La eventual secuenciación de estos recombinantes Sanger podrá definir sin ambigüedad su identidad como secuencias Homeo.

RESULTADOS:

1 Caracterización del ADN de *Epiperipatus biolleyi*:

1.1 Determinación del valor C:

La medición microdensitométrica de los frotis de hemolinfa de *E. biolleyi* teñidos con Feulgen permitió la estimación del contenido de ADN por núcleo haploide, conocido como valor C. Se obtuvo un valor promedio de 4.7 pg del total de preparaciones (N=25) analizadas. Si se considera que 1 pg equivale a 1×10^8 Kb se puede estimar que el peso molecular del genoma de este organismo es de 9.4×10^8 pares de bases.

1.2 Determinación de perfiles de flotación y %GC:

Mediante ultracentrifugaciones preparativas se determinaron los perfiles de flotación del ADN genómico de *E. biolleyi* en gradientes isopícnicos de Cloruro de Cesio (CsCl)(Fig.1). Se observó un perfil asimétrico con un hombro pronunciado hacia el fondo de la gradiente y una serie dispersa de satélites más livianos.

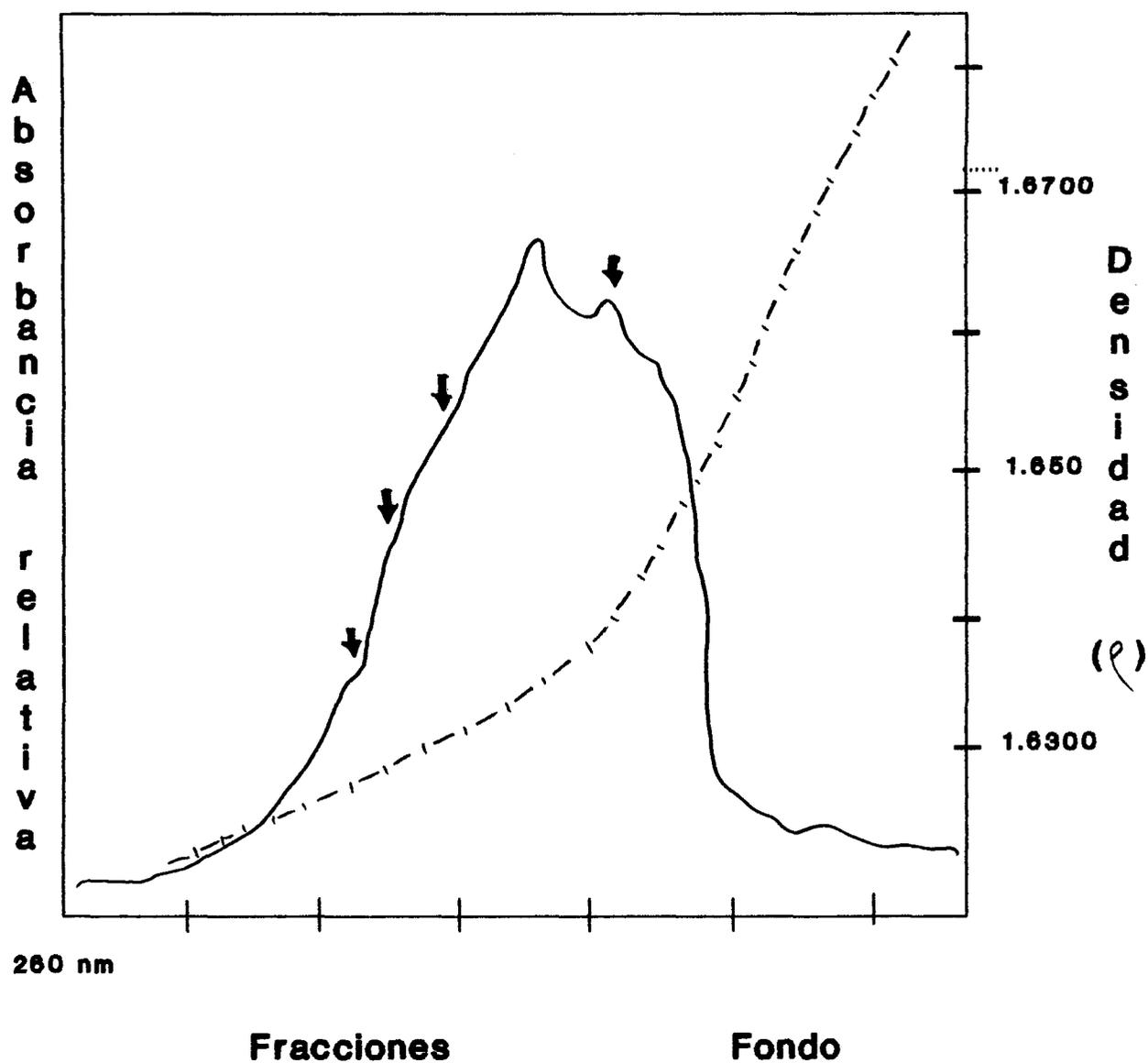


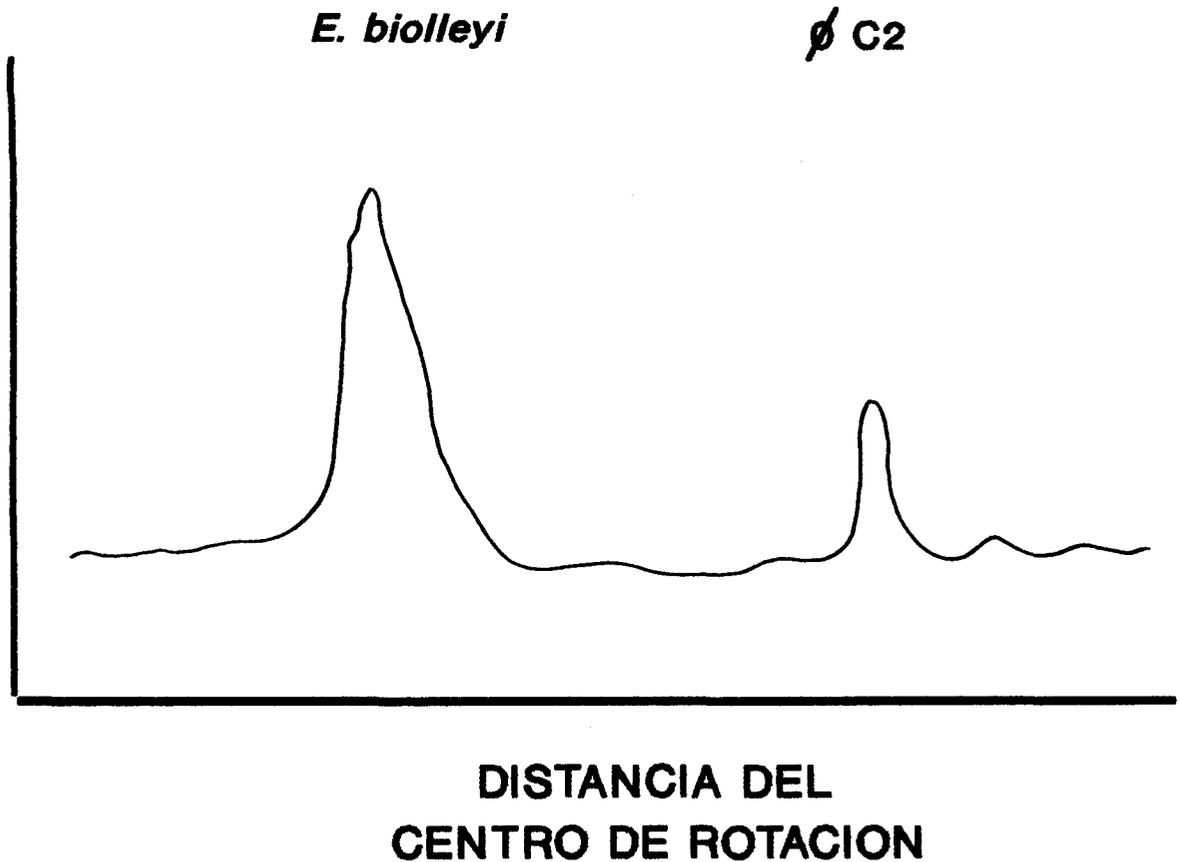
Fig. 1. Perfiles de flotación del ADN genómico de *Epiperipatus biolleyi* en gradientes isopícnicas de Cloruro de Cesio. Las flechas indican la presencia de ADN satelítico. La densidad ρ en g/cm^3 aparece a la izquierda.

La centrifugación analítica (Fig. 2) permitió determinar el porcentaje de bases GC para este organismo. Fueron realizadas 3 estimaciones diferentes, se tomó como referencia fórmulas de cálculo citadas en la literatura (Rolfe & Meselson, 1959; Sueoka, 1962; Tunis & Hearst, 1968), las cuales dieron valores cercanos al 30%.

1.3 Detección de secuencias repetidas:

La digestión del ADN genómico con varias endonucleasas de restricción tipo II estableció la presencia de familias de secuencias repetidas en este organismo. La Figura 3 muestra la corrida electroforética correspondiente a las digestiones con las endonucleasas Hae III, Bgl II y Hind III (datos no mostrados) que revelan la presencia de bandas bien definidas correspondientes a estas secuencias. La Fig. 4 muestra la migración relativa de estas bandas y del ADN marcador de peso molecular (λ Bst E II) en geles de agarosa al 0.8%, la cual permite determinar el peso molecular. Las digestiones con Hae III y Hind III generaron bandas de similar peso molecular, es decir una banda de 1.1 y otra de 2 Kb en cada caso. Mientras que la digestión con la enzima Bgl II sólo generó una banda de 1.99 kb. Esta banda fue extraída del gel, eluída y clonada en el vector pUC13 (PM.2.7 Kb) en el sitio BamHI (Fig. 5). El análisis por electroforesis de los plásmidos recombinantes (Fig. 6) demostró la presencia de al menos dos plásmidos que habían

Absorbancia relativa
(260 nm)



- 0.1000 (% G-C) - 1.658 Rolfe y Meselson (1959)

% G-C= 31.2

- 0.103 (% G-C) + 1.662 Sueoka (1962)

% G-C= 26.4

- 0.098 (% G-C) + 1.660 Tunis y Hearst (1968)

%G-C=29.8

Fig. 2. Ultracentrifugación analítica del ADN de *Epiperipatus biolleyi* en gradientes de Cloruro de Cesio. El ADN de referencia usado se obtuvo del fago ϕ C2 cuya densidad es de 1.742 g/cm³.

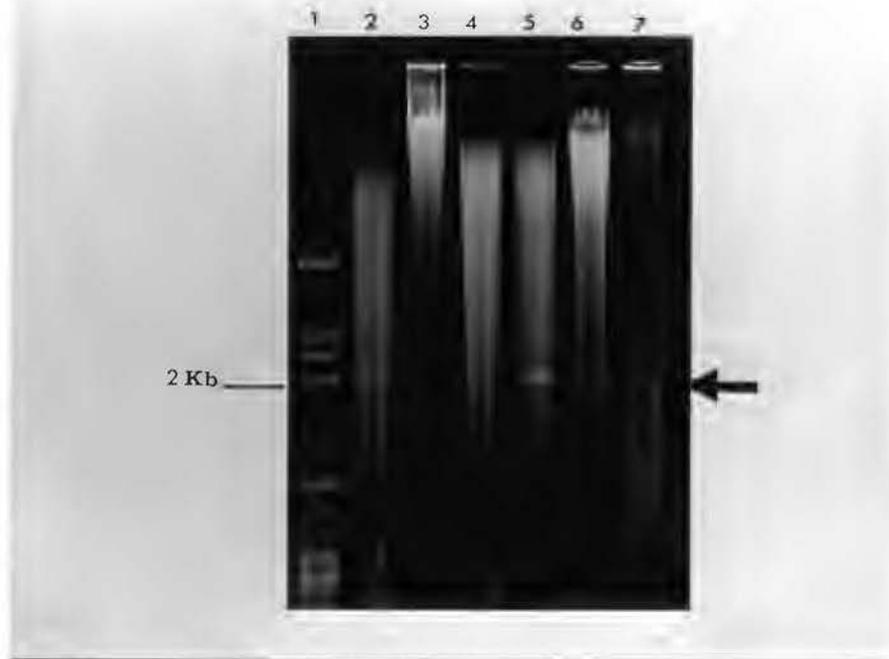


Fig. 3. Separación electroforética (agarosa 0.8%) del ADN genómico de *Epiperipatus biolleyi* digerido con varias endonucleasas de restricción, (carril 1 Marcador de peso molecular, Lambda/Hae III; carriles 2-6 ADN *E. biolleyi* digerido con Hae III, BamHI, EcoRI, Bgl II, Pvu II respectivamente; carril 7 ADN *E. biolleyi* sin digerir. La flecha indica la movilidad de la secuencia repetida que fue clonada.

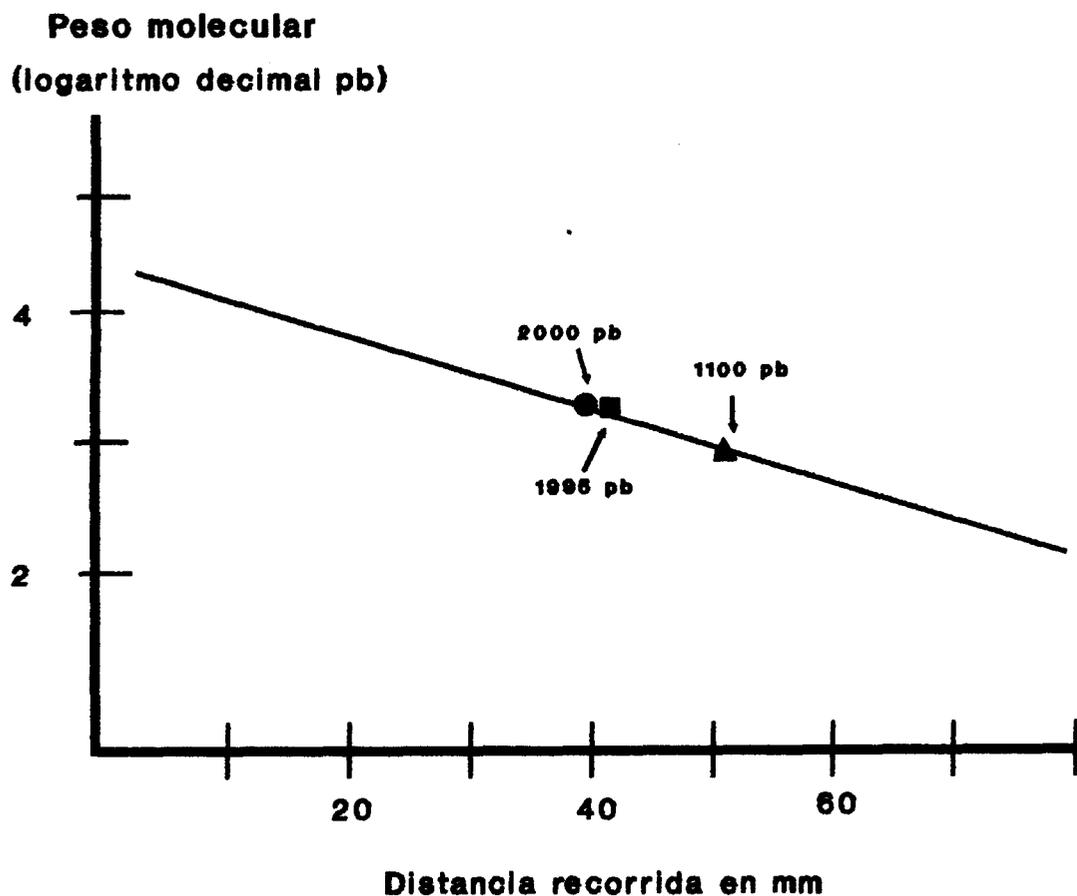


Fig. 4. Determinación del peso molecular de las bandas correspondientes a familias de secuencias repetidas localizadas en el genoma de *E. biolleyi* por digestión con endonucleasas de restricción. El gráfico fue trazado con el ADN de Lambda/Bst E II como control. Los símbolos representan:

- (●) Bandas de 2 Kb obtenidas por digestión con Hae III y Hind III
- (■) Banda de 1.99 Kb obtenida por digestión con Bgl II
- (▲) Bandas de 1.1 Kb obtenida por digestión con Hae III y Hind III.

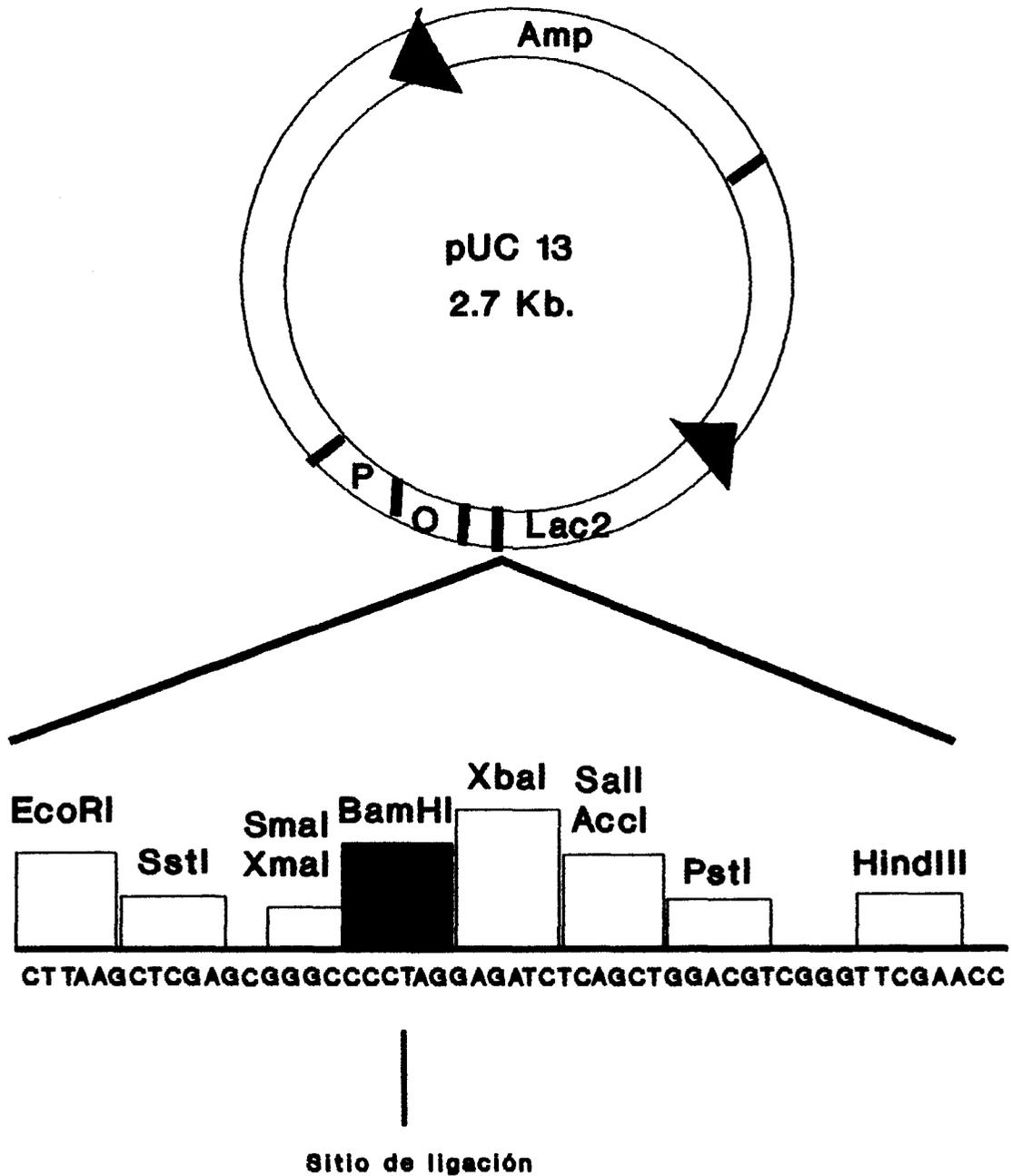


Fig. 5. Representación esquemática del plásmido pUc13, utilizado como vector de clonaje. Se muestra la región múltiple de clonaje, en particular el sitio Bam HI en el cual se realizó la inserción de la secuencia Bgl II.

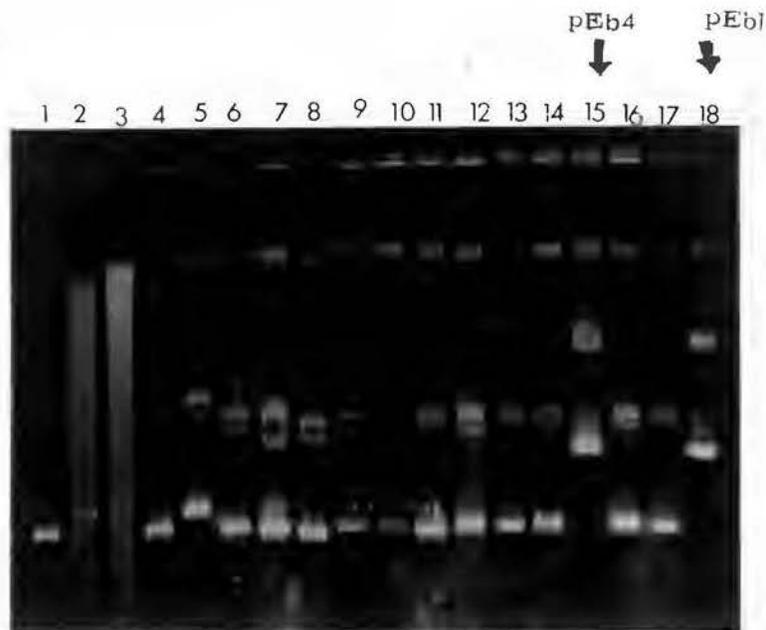


Fig. 6. Separación electroforética (agarosa 0.8%) de las clonas recombinantes producto del clonaje de la secuencia Bgl II en el sitio BamH I del plásmido pUC 13. Carril 1 y 8 pUC13 sin digerir; carriles 9-18 plásmidos pEb10-pEb1. Las flechas señalan los plásmidos pEb1 y pEb4 seleccionados como los recombinantes más prometedores.

incrementado su peso molecular con respecto al pUC13 y que contenían la secuencia Bgl II (Fig. 6). Estos plásmidos fueron denominados pEb1 y pEb4 (plásmido *Epiperipatus biolleyi*). Con marcadores de peso molecular adecuados (datos no mostrados) se determinó un peso molecular alrededor de las 4.6 Kb para este plásmido recombinante, valor muy cercano al teórico esperado. La digestión doble de los plásmidos pEb4 y pEb1 con las endonucleasas HindIII/Eco RI liberó un fragmento de aproximadamente 2 Kb (Fig. 7). Se sabe que estas enzimas flanquean el sitio múltiple de clonaje del plásmido pUC13. Estos resultados confirman que al menos en estos dos plásmidos el clonaje de la secuencia Bgl II fue exitoso y que aparentemente contienen un inserto de igual talla. La Figura 8 muestra el plásmido pEb4 y la localización relativa de la secuencia Bgl II.

El análisis posterior de la secuencia Bgl II clonada involucró la elaboración de un mapa de restricción. De una serie de 25 endonucleasas utilizadas, únicamente la enzima Alu I demostró poseer un sitio interno en este inserto. Sin embargo, debido a que el plásmido pUC13 original posee alrededor de 14 sitios Alu I en regiones cercanas al sitio múltiple de clonaje, lo que hace más complejo la elaboración del mapa de restricción, y debido a la posibilidad de llevar a cabo una estrategia aún más directa como es la secuenciación por el método dideoxi de Sanger, se decidió no proseguir con el mapeo de restricción.

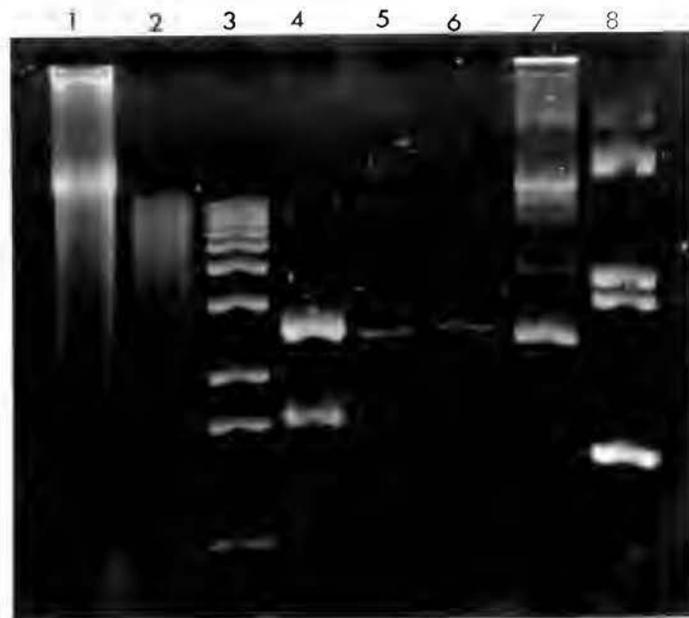


Fig. 7. Separación electroforética (agarosa 0.8%) de los plásmidos recombinantes que contienen la secuencia Bgl II (pEB4 y pEb1). se demuestra la liberación de este inserto por digestión doble con las enzimas Hind III/Eco RI. Carriles 1 y 2 ADN *E. biolleyi* sin digerir; carril 3 Marcador de peso molecular 1 KB (Pharmacia); carriles 4 y 7 plásmido pEb4 digerido con ECO RI/Hind III y sin digerir respectivamente ; carriles 5 y 6 plásmido pEb1 sin digerir y digerido con Eco RI/Hind III respectivamente; carril 8 pUC13 sin digerir.

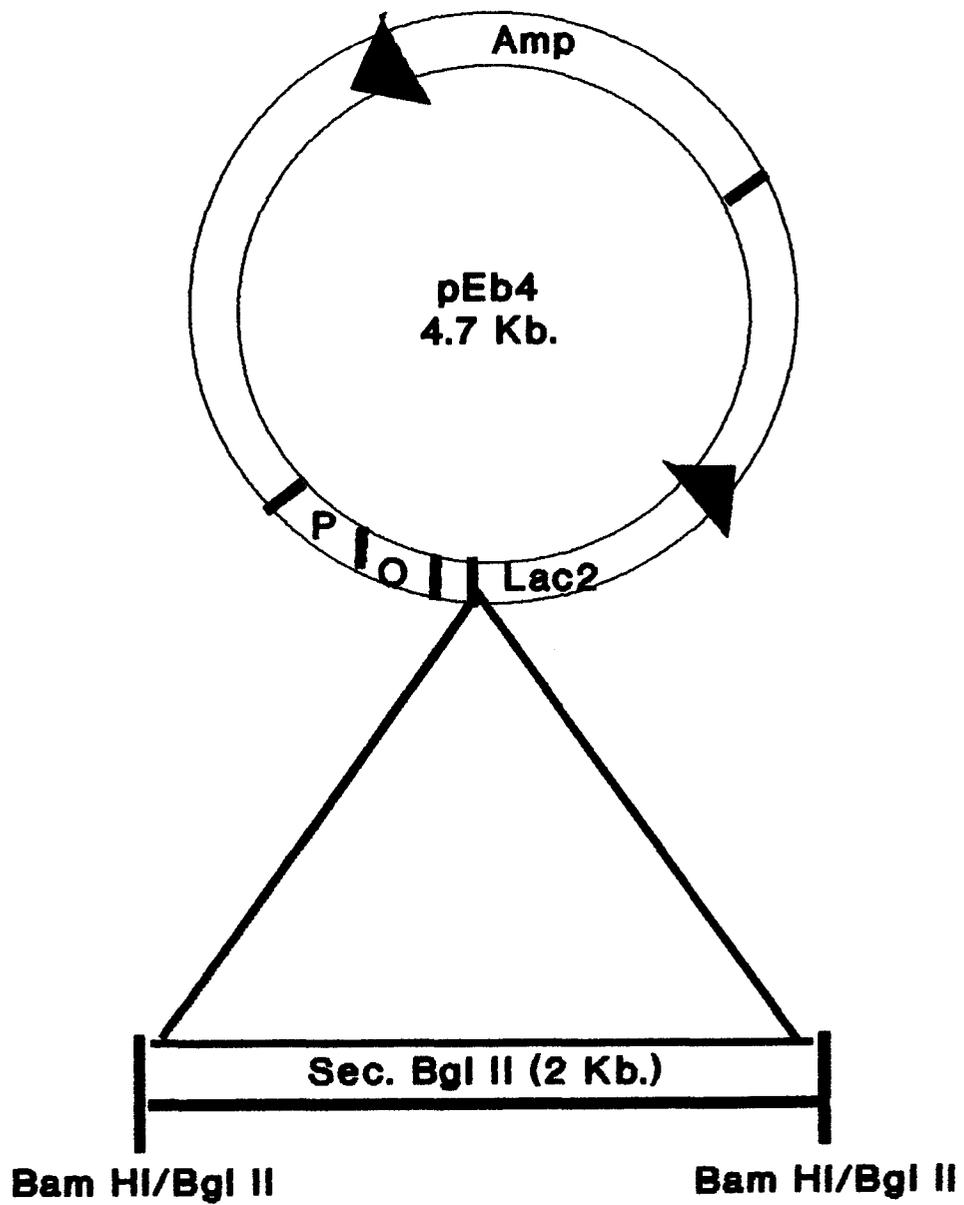


Fig. 8. Representación esquemática del plásmido pEb4 se, muestra la inserción de la secuencia Bgl II en el sitio Bam HI de la región múltiple de clonaje .

1.4 Secuenciación de la familia repetida BglII:

Debido a que el método de secuenciación de Sanger no permite la secuenciación de fragmentos de ADN de tallas mayores a 500 pb, se hizo necesario el subclonaje de la secuencia Bgl II en el plásmido pGEM 7Zf (Fig. 9) que permite la generación de deleciones unidireccionales. Para este subclonaje ambos plásmidos pGEM 7Zf y pEb4 fueron sometidos a una doble digestión con las enzimas EcoRI/Hind III a fin de liberar el inserto y generar extremos cohesivos compatibles que permitan la ligación. Esta doble digestión lineariza ambos plásmidos como se demuestra en la Figura 10. Luego de la ligación y transformación se obtuvo una serie de plásmidos recombinantes (Fig. 11 A), los numerados como 5, 6, 7 y 10 son los más prometedores. Estos plásmidos fueron cultivados y digeridos nuevamente con la combinación de enzimas EcoRI/HindIII (Fig. 11 B) y se demostró que el plasmido 10 generaba un inserto de un tamaño ligeramente inferior a las 2 Kb. Este plásmido fue denominado pGEB4-10 (Fig. 12) y fue utilizado para generar las deleciones. Con este fin, se seleccionaron dos endonucleasas contenidas en el sitio múltiple de clonaje del plásmido que cumplieran con las siguientes características: la enzima cuyo sitio de corte esté más cercano al inserto debe generar un extremo 5' cohesivo, mientras que la más cercana al sitio imprimador debe generar un extremo 3' romo o protegido. Se probaron 6 enzimas contenidas en el sitio múltiple de clonaje del

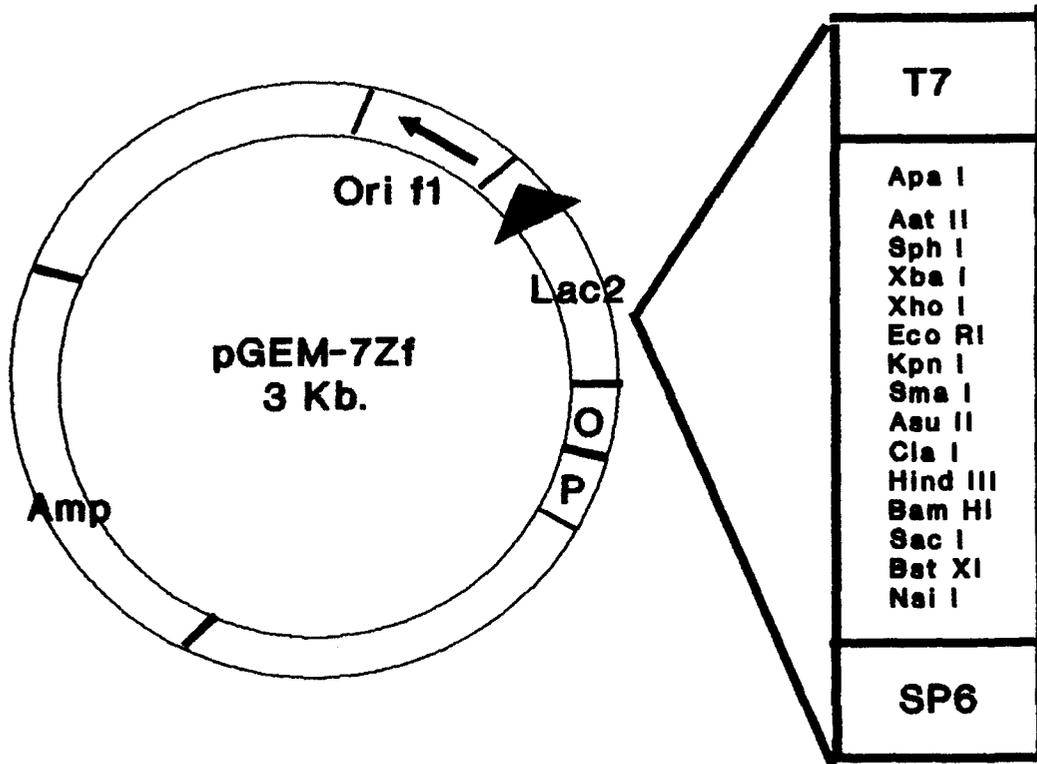


Fig. 9. Representación esquemática del plásmido pGEM 7Zf utilizado como vector en el subclonaje de la secuencia Bgl II en el sitio Hind III/Eco RI

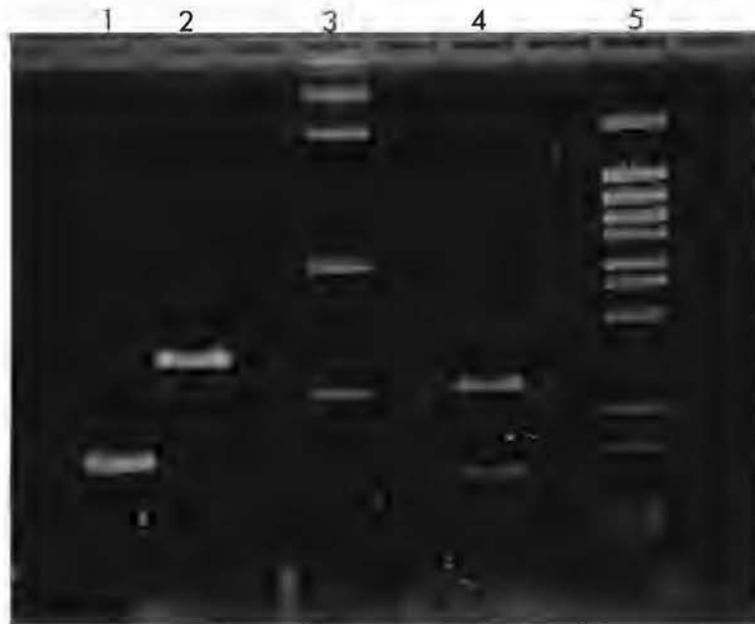


Fig. 10. Preparación de los plásmidos pEB4 y pGEM 7Zf para el subclonaje de la secuencia Bgl II, por digestión doble con las enzimas Hind III/Eco RI. Carriles 1 y 2 pGEM 7Zf sin digerir y digerido con Hind III/Eco RI, respectivamente; carriles 3 y 4 pEb4 sin digerir y digerido con Hind III/Eco RI respectivamente ; carril 5 Marcador de peso molecular Lambda Bst E II.

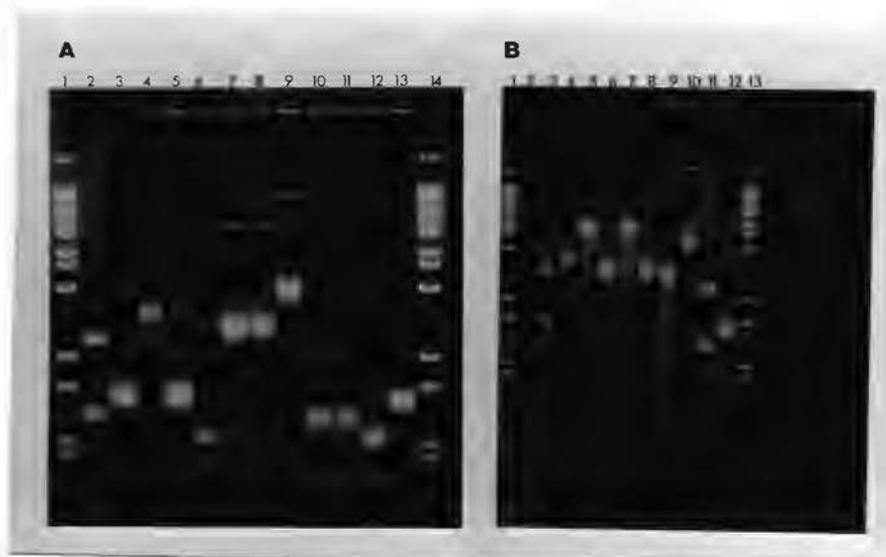


Fig. 11. Separación electroforética de los plásmidos (serie pGEb4) recuperados del subclonaje de la secuencia Bgl II en el plásmido pGEM 7Zf. A. carriles 1 y 14 Marcador de peso molecular Lambda Bst E II; carril 3 pGEM 7ZF sin digerir; carril 2 pEB4 Hind III/Eco RI; carriles 4-13 plásmidos recombinantes numerados de 10 (pGEb 4-10) a 1 (pGEb4-1) respectivamente. La digestión doble con Hind III/Eco RI de los plásmidos de mayor peso molecular se muestra en B: carriles 1 y 13 Marcador de peso molecular Lambda Bst E II; carriles 3 -10 plásmidos pGEb 4-10, pGEb 4-7, pGEb4-6, pGEb 4-5 digeridos con Hind III/Eco RI y sin digerir respectivamente; carril 11 pEb 4 digerido con Hind III/Eco RI; carril 12 pGEM 7Zf sin digerir.

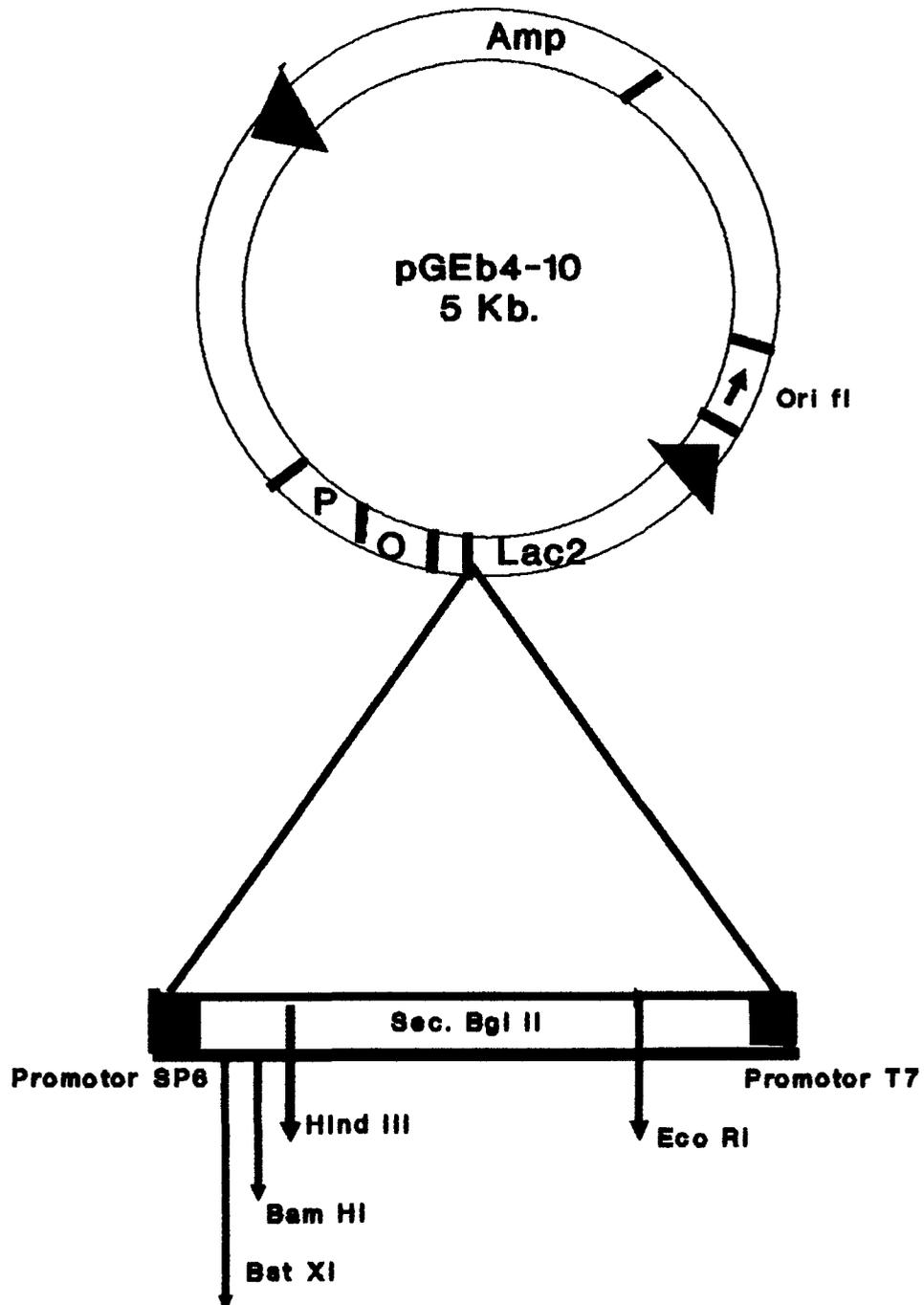


Fig. 12. Representación esquemática del plásmido recombinante pGEb4-10 producto del subclonaje de la secuencia Bgl II. Se muestran cuatro sitios de restricción.

plásmido pGEM 7Zf (Fig. 9), se eligieron las enzimas BamHI y Bst XI (Fig. 13). Luego de digerir el plásmido pGEB10 con esta combinación de endonucleasas y por intermedio de la exonucleasa III se obtuvo una serie de deleciones unidireccionales (Fig. 14), 9 de las cuales fueron seleccionadas para ser secuenciadas (Fig. 15). Resultados preliminares de la secuenciación de la familia Bgl II se presentan en la Figura 16 . En total fueron secuenciados 1519 nucleótidos que poseían un contenido AT de 64.4% . Los sitios de restricción presentes en esta secuencia se muestran en la Figura 17. La búsqueda de homología entre las diferentes deleciones, reveló la presencia de un motivo cercano a las 50 pb que se encuentra en al menos 6 de las deleciones analizadas. La búsqueda de homología con secuencias contenidas en el banco génico de programa Genepro, demuestra la presencia en la secuencia Bgl II de regiones 50 % homólogas a una serie de genes de invertebrados (Ver Apéndice).

2. Elaboración y análisis de la genoteca:

La digestión del ADN genómico de *E. biolleyi* con la enzima Sau 3A permitió la obtención de los fragmentos de 20 kb (Fig. 18) que fueron utilizados como insertos para la construcción de la genoteca en el fago vector Lambda **EMBL3A** (Fig. 19) . La Figura 20 muestra un etapa preliminar en la que se determinó el tiempo y concentración de enzima

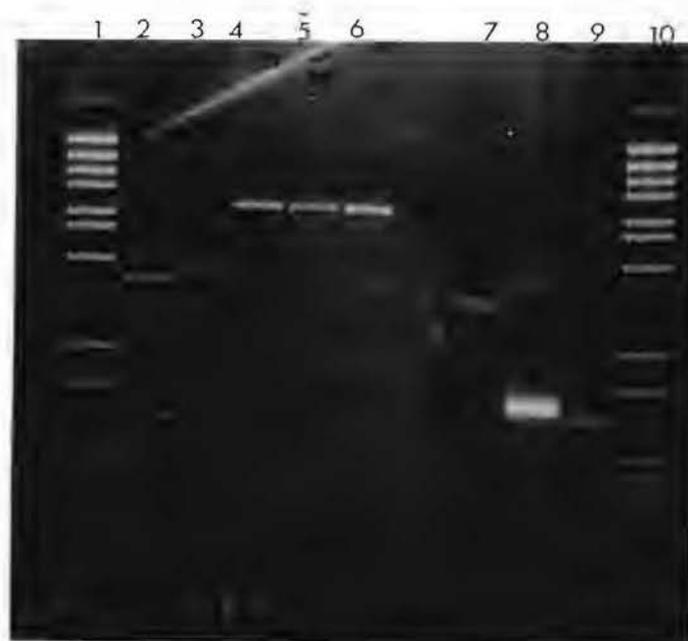


Fig. 13. Selección de la combinación de endonucleasas de restricción a ser utilizadas en la generación de la serie de deleciones unidireccionales del plásmido pGEB 4-10. Carriles 1 y 11 Marcador de peso molecular Lambda Bst E II; carril 2-7 pGEB 4-10 digerido con Sac I, Nsi I, Bst XI, Bam HI, Apa I, Alu I; carril 8 pGEB 4-10 sin digerir; carril 9 pGEM 7Zf sin digerir; carril 10 pEB4 Hind III/Eco RI.

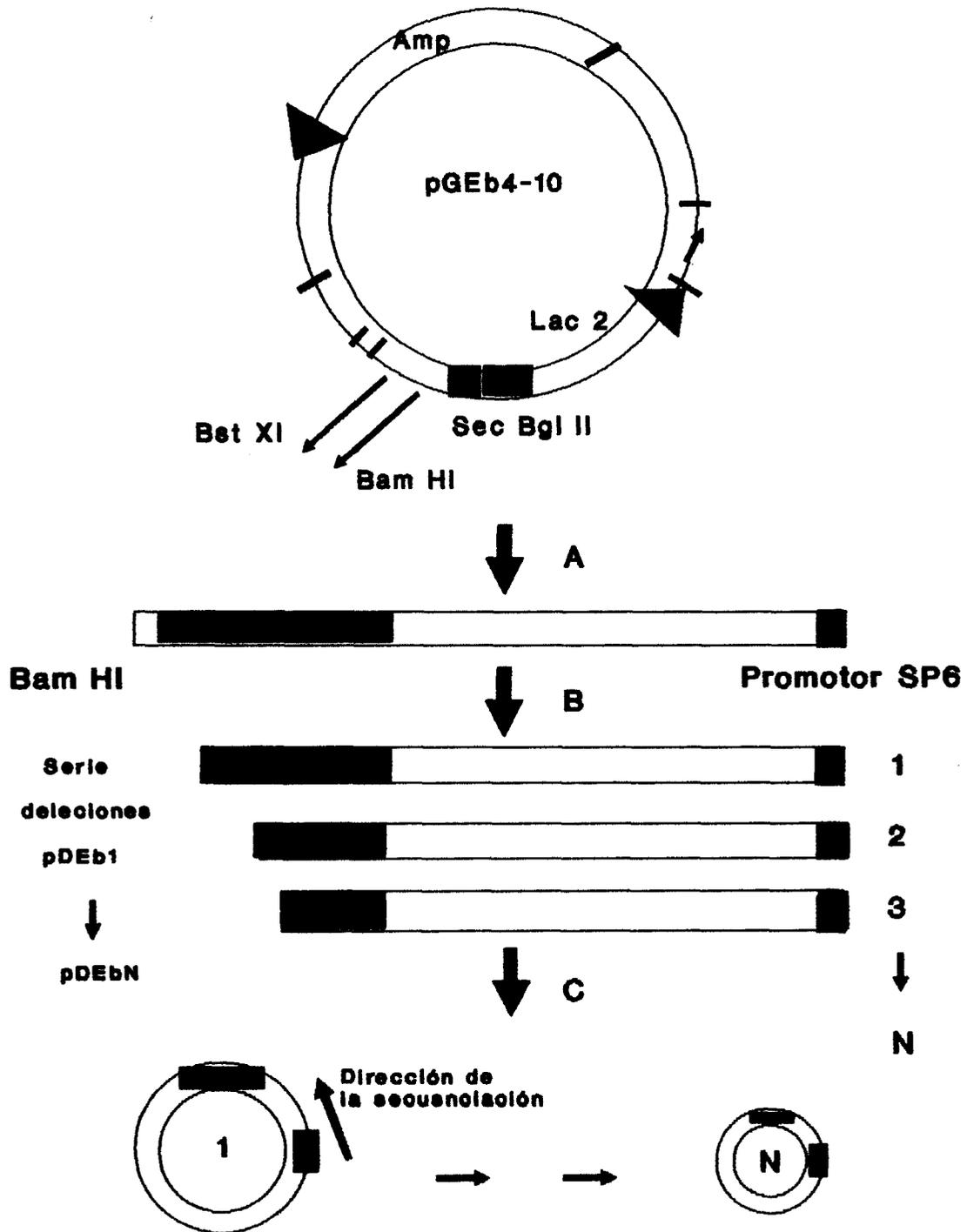


Fig. 14. Diagrama de la elaboración de una serie unidireccional de deleciones del plásmido pGEb4-10 para lo cual se utilizó el sistema "Erase a base". A: digestión con Bam HI/Bst XI; B: digestión con Exonucleasa III y nucleasa S1; C: incubación con fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y Ligasa T4.

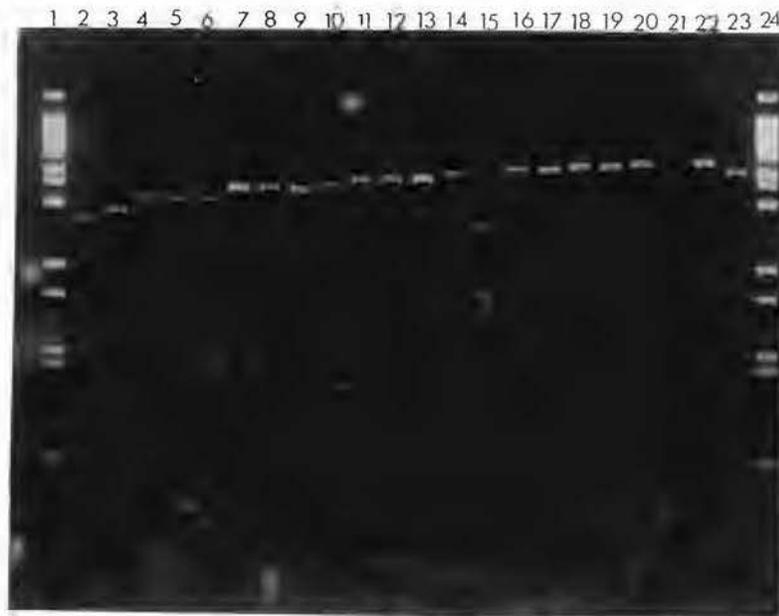


Fig. 15. Separación electroforética de los plásmidos recombinantes que contienen las deleciones unidireccionales del plásmido pGEb4-10., denominadas como serie pDEb. Carriles 1 y 24 Marcador de peso molecular Lambda Est E II; carriles 2 a 23 plásmidos en el siguiente orden: pDEb14-1, 14-2, 13-2, 12-1, 11-2, 9-1, 9-2, 10-1, 11-1, 13-1, 8-1, 6-2, 6-1, 4-2, 3-1, 2-2, 2-1, 5-2, 1-1, 0-2, 0-1.

1. pDEb 0-1 (164 nucleótidos)
 CCCTAATCTT ACCCTAACCC ATTTATGTTT AATCTTCAA ATTTTGTAC ATAGTGAAAG
 AAGAAATTGA AAGCATTGCA TTTTGGATCA GTTTTCTGC AATTAATAAT AATATCTTAC
 TTTATCCCAT TCTCATATCA AACCTTTACC TCATCTACT TTGTTAAAC
2. pDEb 1-1 (203 nucleótidos)
 ACCCCGGGTT CGAAATCGAT AAGCTTGGGC TGCAGGTCGA CTCTAGACCA CTA CTTTAAAC
 CATAACCCTA ATCTTACCCT AACCCTAATA TTTATGTTCA ATCTTCAAAT TTTGTACATA
 GTGAAGAAGA ATGAAGCATT GCATTTGACT AGAACTGCAT AATAATTCTC ATACTACCTT
 ACACTACTAC TACTGTACAC TAC
3. pDEb 2-1 (159 nucleótidos)
 GGTTCGGTA CCCCgggTTC GAAATCGATA AGCTTGGGCT GCAGGTCGAC TCTAGAGGAT
 CTTACTTTAA CCATAACCCT AATCTTACCT AACCTAATAT TTATGTTCAA TCTTGAATTG
 TACATAGTGA AGAGAATGAG CATGCATIGA TCAGTCTGCA
4. pDEb 2-2 (179 nucleótidos)
 CAATAAAAAA AATCCTTGCC CAAACCCTAA CTCAATTTTT AATCAAAACC ATCTTTCTAA
 ATTTACAATT TTTACATCAT TTAAAATGGG CAGTTATCAG GATTGCAAAA TTTATTGAAT
 ATCTACATTT TTAATAAAAA TTANNAGACG CTGACTCATA TCAAGCAGTT TAATAGTAG
5. pDEb 3-2 (167 nucleótidos)
 GTTGGTACCC CGGGGTTTCGA AATCGATAAG CTTGGGCTGC AGGTCGAGTC TAGAGGATCT
 TACTTTAACC ATAACCCTAA TCTTACCCTA ACCCTAATTA TTTAGTTCAA TCTTCAATTT
 TGTACATGTG AAGAGATAGA AGCATGCATT TGTACAGTTT CGCTAAA
6. pDEb 5-2 (147 nucleótidos)
 TTCGAAATCG ATAAGCTTGG GCTGCAGGTC GACTCTAGAG GACTTCTTAA CCATAACCCT
 AATCTTACCT AACCTAATAT TTATGTCATC TCAATTTCTA CATAGTGAAG AGAATGAAGC
 ATGCATTTGA CAGTTCGCAT AATAACT
7. pDEb 6-1 (152 nucleótidos)
 GGTTCGGTAC CCCGGGTTTCG AAATCGATAA GCTTGGGCTG CAGGTCGACT CTAGAGGATC
 TTACTTTAAC CAATACCCAT ACTTTACCTA ACCCTAAATT TTATGTCACT TCAATTTTCAT
 CAATGTGAAG AGAATGAGCT GCATTTGATC AG
8. pDEb 10-1 (198 nucleótidos)
 GCTTCAGTTA CCACACTTGT TGAAGATAAT GCTACTTCTC AGAAAGTACA ATAGATAGCA
 TCACAATTGA GATGGCACAT AAAAGTGCCA AATAATCTGA ATGTGAAATA TGTAGAGTGA
 TTCTAACAAA CTTGCTTGAA CCATAACTGT AATCAACATT ACTAGCTCTA CTA CTTGCATG
 CAGTATATCT GATAGCAT
9. pDEb 14-2 (152 nucleótidos)
 TCCCCGGGCG AGCTCGAATT TTTTAAAGC AAAATATTTA ATAAATTATG CAATGCTGTT
 AATTGAATAT TTTAGTTTTA GTAATGTTTA TAAACAAACT TAGGATGAGT AGTGATAAGA
 GATAGATAGT AGATATATAT GCGTCTCATG CA

Fig. 16. Secuencia nucleotídica de los plásmidos delecionados derivados del plásmido pGEb 4-10 que contiene la secuencia repetida Bgl II de *Epiperipatus biolleyi*. Se subraya el motivo de 50 pares de bases que se repite en al menos 4 de los plásmidos.

BASE	CANTIDAD	PORCENTAJE
A	497	32.7
T	482	31.7
G	235	15.4
C	303	19.9
AT	979	64.4
GC	538	35.4

ENZIMAS CON SITIOS DE RESTRICCIÓN:

AccI	Sal I
Afl III	Sma I
Asp 718	SphI
Asu II	Xba I
Ava I	Xho II
Ava III	Xma I
Bcl I	Alu I
Bvu I	Dpn I
Cla I	Hpa II
Hgi AI	Mae I
Hinc II	Mbo I
Hind III	Msp I
Kpn I	Rsa I
Pst I	Taq I

Fig. 17. Composición de bases y sitios de restricción de la secuencia repetida Bgl II obtenidos del análisis por computadora de las secuencias de la serie de deleciones unidireccionales obtenidas del plásmido pGEb 4-10.

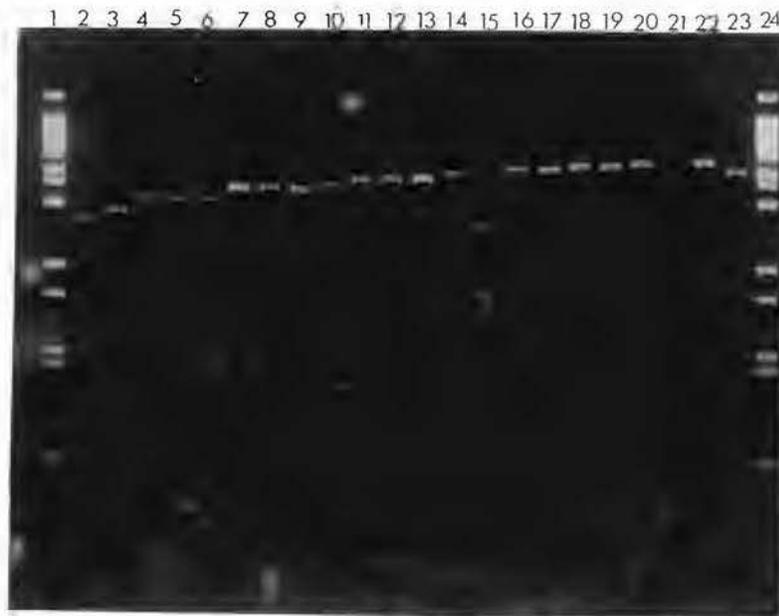


Fig. 15. Separación electroforética de los plásmidos recombinantes que contienen las deleciones unidireccionales del plásmido pGEb4-10., denominadas como serie pDEb. Carriles 1 y 24 Marcador de peso molecular Lambda Est E II; carriles 2 a 23 plásmidos en el siguiente orden: pDEb14-1, 14-2, 13-2, 12-1, 11-2, 9-1, 9-2, 10-1, 11-1, 13-1, 8-1, 6-2, 6-1, 4-2, 3-1, 2-2, 2-1, 5-2, 1-1, 0-2, 0-1.



Fig. 20. Determinación del tiempo óptimo de digestión parcial del ADN genómico de *E. biolleyi* con la enzima Sau 3A, para la obtención de una población enriquecida en fragmentos de 20 Kb. Carriles 1 y 7 Marcador de peso molecular Lambda Bst E II; carriles 2-5 ADN genómico de *E. biolleyi* /Sau 3A digerido por 60 minutos, 30 minutos (carriles 3 y 4) y 15 minutos, respectivamente; carril 6 ADN genómico sin digerir.

adecuada para tal efecto . Para este experimento se determinó una dilución de 1/1250 de enzima y un tiempo de digestión de 30 segundos como los óptimos.

Los insertos fueron clonados y empaquetados in vitro. Debido a las restricciones impuestas por el sistema de empaquetamiento del vector (EMBL 3A) se sabe con certeza que solamente fragmentos de ADN de 18.5-21.5 Kb han sido insertados . La eficiencia promedio de las reacciones de empaquetamiento fue de 2.5×10^3 placas/ug de ADN . Los fagos recombinantes empaquetados a este nivel constituyen la genoteca. La titulación de esta genoteca permitió estimar que contiene 150 000 fagos recombinantes.

3. Detección de secuencia de consenso Homeo:

La genoteca fue analizada con la finalidad de detectar la presencia de secuencia Homeo por medio de hibridación molecular. Se obtuvieron 20 fagos recombinantes que presentaban hibridación positiva con las sondas Homeo. La Figura 21 muestra una autoradiografía que contiene placas de fagos positivas. Debido a las condiciones de hibridación que se utilizaron se calcula que estas clonas poseen al menos un 50% de homología con las secuencias Homeo.

Para evaluar la capacidad de la sonda utilizada para detectar secuencias Homeo clonadas pertenecientes a algunas de las familias en que han sido clasificadas, se realizaron hibridaciones en filtro bajo diferentes condiciones de hibridación . En condiciones altamente

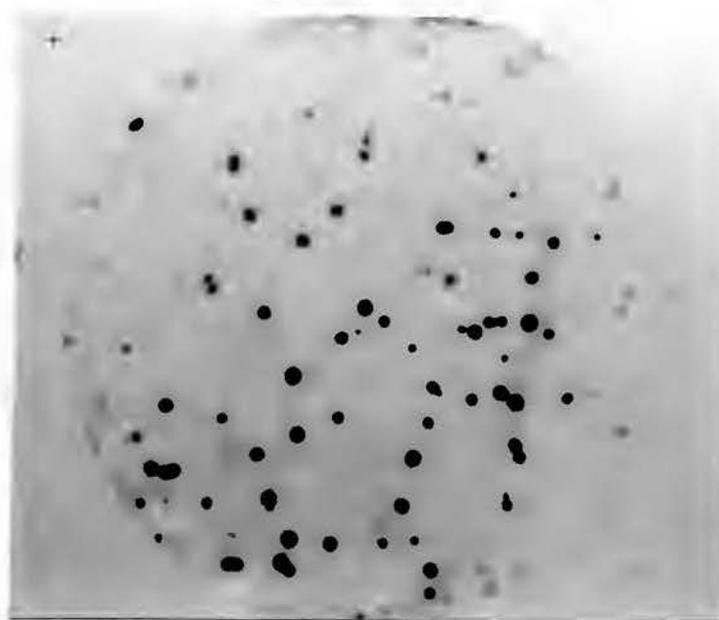


Fig. 21 . Selección de los fagos recombinantes homólogos a la secuencia **Homeo** de *Drosophila* por hibridación molecular a réplicas en papel de nitrocelulosa . Se muestra el producto de una autorradiografía en la cual los puntos negros representan placas de fagos recombinantes con hibridación positiva.

estrictas (2xSSC, 65 C) (Fig. 22) la sonda fue capaz de detectar las secuencias Homeo de los genes **Antenapedia (Antp)**, **Ultrabitorax (Ubx)** , **Reduccion de las cerdas sexuales (Scr)** y **fushi-tarazu (ftz)** este último debilmente. En condiciones poco estrictas (5xSSC, 45 C)(Fig. 23) se detectaron los 4 genes anteriores además de señales débiles de los genes "goosberry"(gsb), "even-skipped"(eve) y "engrailed"(en) . Los genes "bicoid"(bcd), "paired"(prd) y "caudal"(cad) presentaron resultados negativos en todos los casos. El cuadro 1 resume los resultados obtenidos de estos experimentos.

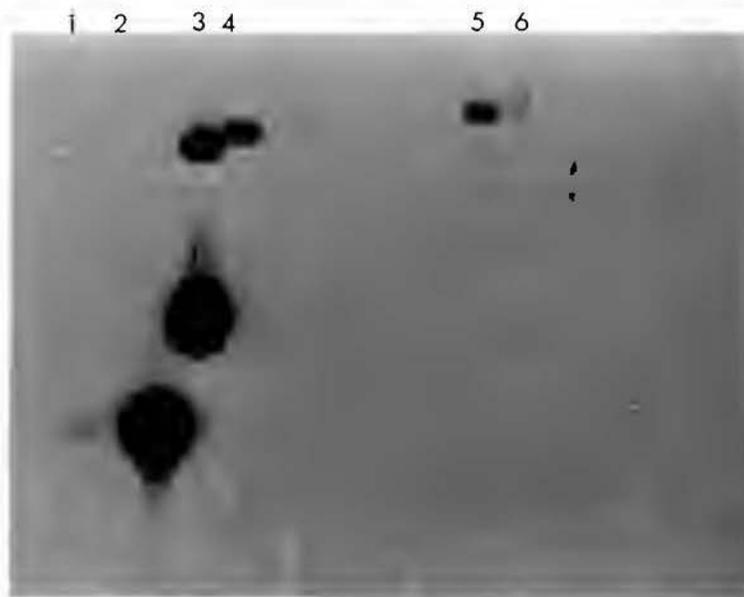


Fig. 22. Evaluación de la capacidad de la sonda **Homeo** de detectar por hibridación en condiciones estrictas secuencias **Homeo** de *Drosophila* clonadas pertenecientes a clases diferentes. Las secuencias **Homeo** analizadas pertenecen a los genes : 1. **ftZ**, 2 y 3 **Antenapedia**, 4 **Scr**, 5 y 6 **Ultrabitorax**.



Fig. 23. Evaluación de la capacidad de la sonda **Homeo** de detectar por hibridación en condiciones poco estrictas secuencias **Homeo** de *Drosophila* clonadas pertenecientes a clases diferentes. Las secuencias **Homeo** analizadas pertenecen a los genes: 1, 2, 14 y 15 **engrailed**: 3 y 4 **Ultrabitorax**: 5 y 6 **eve**: 7 **gsb**: 8 y 9 **Scr**: 10 y 11 **Antenapedia**: 12 y 13 **ftz**.

CUADRO 1. Detección de secuencias Homeo de *Drosophila* clonadas pertenecientes a diferentes familias, por hibridación molecular con una sonda Homeo del gen **Antenapedia**.

GEN	ABREV.	FAMILIA ⁽¹⁾	HOMOLOGIA % ⁽²⁾	HIBRIDACION	
				E ⁽³⁾	PE
Antenapedia	Antp	ANTP	100	+	+
Ultrabitorax	Ubx	ANTP	88	+	+
Sex combs reduced	Scr	ANTP	92	+	+
Fushi-tarazu	ftz	ANTP	82	+	+
Even-skipped	eve	eve	60	-	+
Engrailed	en	en	60	-	+
Goosberry	gbs	prd	37	-	+
Paired	prd	prd	36	-	+
Bicoid	bcd	NC ⁽⁴⁾	41	-	-
Caudal	cad	NC	52	-	-

(1) Clasificación de Scott & Tamkun 1989.

(2) Se refiere al % de homología a nivel de aminoácidos.

(3) Condiciones de hibridación, E :estrictas (SSC 2X, 65 C)
PE:poco estrictas (SSC 5X, 37C).

(4) No clasificadas en un grupo particular.

DISCUSION:

La caracterización del material genómico del onicóforo *Epiperipatus biolleyi* revela particularidades que aunadas a las ya anotadas a nivel anatómico y filogenético hacen de estos organismos un modelo de gran relevancia. Las estimaciones del % GC (30%) demuestran un genoma rico en AT (70%) que, sin embargo, presenta un ADN satelítico importante rico en GC (como lo demuestra su localización hacia el fondo de las gradientes isopícnicas de CsCl). Podría suponerse que este satélite contribuye en forma importante a la fracción codificante GC rica del genoma. Comparando este valor con el de otros organismos eucariotas (levaduras 38%; mamíferos 41%), se demuestra que es un valor inusualmente bajo.

Este organismo presenta un genoma de talla considerable (9.4×10^9 pb) como se deduce de su alto valor C (4.7 pg). Al comparar estos valores con los correspondientes a algunos invertebrados particularmente artrópodos (Cuadro 2) se demuestra que en general los resultados son mayores, únicamente comparables a los de *Limulus polyphemus*, lo cual no es del todo sorprendente, ya que con frecuencia organismos considerados como fósiles vivientes o grupos muy antiguos presentan genomas de talla considerable.

Las digestiones con enzimas de restricción ponen en evidencia que este genoma al igual que el de la mayor parte

CUADRO 2. Contenido de ADN por núcleo haploide de algunos invertebrados.

ESPECIE	VALOR C (pg)
ONYCHOPHORA	
<i>Epiperipatus biolleyi</i>	<u>4.7</u> ¹
PROTOZOA	
<i>Tetrahymena pyriformes</i>	0.2
COELENTERATA	
<i>Aurelia aurita</i>	0.7
NEMERTINI	
<i>Cerebratulus</i>	1.4
MOLLUSCA	
<i>Aplysia californica</i>	1.8
<i>Crassostrea virginica</i>	0.7
<i>Spisula solidissima</i>	1.2
<i>Loligo loligo</i>	<u>2.8</u>
ARTHROPODA	
<i>Prosimulium multidentatum</i>	0.18
<i>Drosophila melanogaster</i>	0.18
<i>Limulus polyphemus</i>	<u>2.8</u>
<i>Musca domestica</i>	0.9
<i>Chironomus tentans</i>	0.21
ECHINODERMATA	
<i>Strongylocentrus purpuratus</i>	0.9
CHORDATA	
<i>Homo sapiens</i>	3.5

Tomado de John & Miklos, 1988.

¹ Valor determinado en esta investigación, equivale a un peso molecular de 9.4×10^9 pares de bases (pb).

de los eucariones posee una fracción importante representada por familias de secuencias repetidas. Al menos 3 endonucleasas de restricción (Hae III, Hind III, Bgl II) revelaron la presencia de estas secuencias. Un breve análisis de los sitios de reconocimiento muestra como únicamente la enzima Hae III reconoce un tetranucleótido rico en bases G-C (GG'CC), mientras que Hind III y Bgl II reconocen hexanucleótidos con un 67% de bases AT (Hind III A'AGCTT y BglII A'GATCT). Estos resultados pueden correlacionarse con la presencia de ADN sateliticos en ambas regiones (pesada y liviana) de los gradientes de Cloruro de Cesio; es decir algunas de estas secuencias repetidas debido a su composición de bases, podrían bandear separadamente del pico de ADN principal.

Si se toma en cuenta la estimación de Singer (1982,) que considera que las familias de secuencias repetidas visibles en geles de agarosa luego de digestión con endonucleasas representan al menos un 0.5% del genoma , podemos considerar que la secuencia Bgl II que fue clonada contribuye con 4.7×10^8 pb a este genoma, y ya que la unidad de repetición es cercana a las 2 Kb se deduce que esta secuencia se repite aproximadamente 23 000 veces. De acuerdo con la clasificación de Singer , correspondería a una secuencia moderadamente repetida , pero a diferencia de estas que se caracterizan por encontrarse dispersas con secuencias únicas, la secuencia Bgl II parece estar organizada en tandem, es decir, grupos de copias

consecutivas, lo cual fue determinado mediante digestiones parciales con la enzima Bgl II en las cuales se produce una escalera de bandas (datos no mostrados). La secuenciación de las deleciones correspondientes a esta familia permitió establecer el patrón de restricción, corroborando la presencia de sitios reconocidos por la endonucleasa Alu I como se determinó previamente por el mapeo de restricción. Sin embargo debido a la ausencia de regiones homólogas traslapantes además del motivo de 50 pb mencionado anteriormente (resultados), no fue posible establecer la secuencia completa de esta familia. Problemas de tipo técnico como la presencia de discontinuidades en la serie de deleciones (ej. ausencia del plásmido 0-2 (carril 20, Fig. 15), con seguridad fueron los responsables de la ausencia de regiones traslapantes indispensables para la "reconstrucción" de esta secuencia. A pesar de lo anterior, los datos de composición de bases pueden considerarse bastante confiables, una composición AT de 64%, que concuerda con la composición genómica. Los estudios de homología demostraron regiones compartidas con genes de otros invertebrados pertenecientes a familias multigénicas tales como histonas, ARN ribosomales, algunos ADN satelíticos y elementos transponibles. Debido a que esta homología es baja su significancia real debe ser evaluada.

Esta especie presenta un cariotipo de $n=58$, con cromosomas bimodales, inclusive algunos metacéntricos grandes (Morera *et al.*, en preparación). Hibridaciones " in

situ" de estas preparaciones , que utilizaron como sonda la secuencia Bgl II marcada con biotina sugieren la localización de esta secuencia en varios cromosomas (datos no mostrados).

La detección en el genoma de *E. biolleyi* de secuencias homólogas a las secuencias de consenso Homeo de *Drosophila*, fue abordado primeramente con ADN genómico digerido , separado en geles de agarosa y transferido a membranas de nitrocelulosa por la técnica de Southern (1975). Estas membranas fueron hibridadas con sondas marcadas con S³⁵, P³² o biotina. En todos los casos se obtuvo resultados negativos (datos no mostrados). Estos resultados negativos lejos de indicar la ausencia de las secuencias Homeo en onicóforos ponen de manifiesto las limitaciones de la técnica como lo argumentan Scott y Tamkun (1989). Los hallazgos recientes de secuencias Homeo en nemátodos como *C. elegans* (Kenyon, 1991) previamente catalogado como carente de ellas respaldan esta apreciación. Considerando estas experiencias se decidió evaluar una nueva estrategia que involucró la elaboración de una genoteca de *E. biolleyi* y su análisis con sondas marcadas con P³². Como resultado se obtuvo una genoteca de 150 000 fagos recombinantes. Se estima que debido a las restricciones impuestas por el sistema de empaquetamiento del vector , cada uno de estos fagos debe contener de 20 Kb lo que representa el clonaje de 3X10⁹ pb en total, es decir, alrededor un 40 % del genoma de *Epiperipatus biolleyi* (9.4

X10⁹ pb). Si bien la genoteca obtenida cubre sólo parcialmente el genoma del onicóforo, constituye el primer clonaje del ADN genómico de un miembro de este grupo de organismos y puede ser tomada como punto de partida para posteriores estudios moleculares de muy diversa índole, como podría ser la localización de los genes que codifican los principales componentes de la secreción glandular adhesiva de los onicóforos cuyo valor taxonómico se está evaluando (Mora *et al.*, en preparación).

El análisis de esta genoteca para detectar secuencias Homeo, dio como resultado el aislamiento de 20 fagos recombinantes que presentan al menos un 50% de homología con el ADN utilizado como sonda. Debido a la dificultad de disponer del isótopo P³², no fue posible realizar hibridaciones en condiciones más estrictas, lo que podría proveer un indicio del grado de divergencia de estas secuencias en relación a la sonda. Sin embargo, la eventual secuenciación de cada uno de estos recombinantes permitirá una comparación directa con las diferentes secuencias Homeo de las que se tiene referencia y contestar a una serie de interrogantes como por ejemplo: constituyen estas secuencias clonadas de *K. biolleyi* secuencias Homeo sensu stricto?, cumplen con los requerimientos de secuencia, conservación y funcionalidad que se han postulado (Scott & Tamkun, 1989) comparten las secuencias Homeo aisladas hasta la fecha? ;es su expresión pautada en las diferentes etapas del desarrollo embrionario?. Por lo tanto, los resultados hasta ahora

obtenidos abren la posibilidad de ampliar el estudio de los onicóforos , con aspectos como la organización de las secuencias Homeo y su expresión durante el desarrollo embriológico.

Algunas predicciones en cuanto a la organización de las secuencias Homeo en onicóforos pueden ser obtenidas al analizar la información disponible en otros organismos. Las secuencias Homeo fueron descubiertas y han sido extensamente estudiadas en *Drosophila*, donde los genes que las portan se organizan en 2 complejos; esta característica se repite en otros grupos entre ellos mamíferos en los que se han encontrado al menos 4 complejos (De Robertis *et al.*, 1990). El hallazgo (Beeman *et al.*, 1989) de un complejo único en el coleóptero *Tribolium castaneum* que parece contener genes homólogos a miembros de los dos complejos presentes en los dípteros ha sido relevante . Debido a que los coleópteros se consideran un grupo más antiguo, este hallazgo parece apoyar la hipótesis de que existió un único complejo ancestral el cual sufrió duplicación y divergencia. A la luz de esta hipótesis y al considerar la posición filogenética de los onicóforos cercana al probable ancestro de anélidos y artrópodos, podría especularse la presencia en onicóforos de un complejo aún más cercano al ancestral . Esta hipótesis se contrapone a lo expuesto por Raff y Kaufman (1983) quienes consideran que la delección de ambos complejos daría como resultado un patrón semejante a los onicóforos.

De relevante importancia sería el estudio de la

expresión embriológica de los genes homeóticos en onicóforos. Si bien los onicóforos han sido considerados fósiles vivientes por haber congelado características anatómicas; embriológicamente han sufrido una activa evolución ya que se encuentra toda una gama de estrategias reproductivas, desde formas ovíparas, ovovivíparas hasta formas vivíparas placentadas como los miembros del género en estudio. Anderson (1973) estudió y comparó los eventos embriológicos en organismos ovíparos miembros del género *Peripatopsis* y onicóforos placentados, lo que le permitió determinar una serie de diferencias en el desarrollo. Si los genes que portan secuencias **Homeo** en onicóforos participan en el control de desarrollo embriológico como lo hacen en *Drosophila*, la definición de los patrones de expresión de estos genes podría revelar si estas diferencias residen en la presencia de genes diferentes o en eventos de heterocronía, es decir un cambio en el patrón de expresión temporal o espacial de un gen o genes particulares. Particularmente la condición vivípara placentada de *E. biolleyi* permite abordar esta interrogante ya que experimentalmente se ha podido comprobar la presencia de cerca de 10 embriones en diversas etapas del desarrollo en cada uno de los dos tubos uterinos de la hembra.

BIBLIOGRAFIA:

- AKAM, M. 1989. Hox and Hom: Homologous Gene Clusters in insects and Vertebrates Cell 57: 347-349.
- ANDERSON, D.T. 1973 Embriology and phylogeny in Annelids and Arthropods. Pergamon Press Oxford, N.Y. p. 93-125.
- BARNES, R. 1969. Zoología de los Invertebrados. Centro regional de Ayuda Técnica. México. p.394-600.
- BLAKESLEY, R.W. & P.V, KING. 1986. Optimizing DNA ligations for transformation. FOCUS 8(1): 1-3.
- BEEMAN, R.W., J.J. Stuart, M.S. Haas, and R.E. Denell. 1989. Genetic Analysis of the Homeotic Gene Complex (HOM-C) in the beetle *Tribolium castaneum*. Developmental Biology 133; 196-209.
- BENDER, W. ,M. AKAM, F. KARCH, P.A. BEACHY, M. PEIFER, P. SPIERER, E.B. LEWIS, & D.S. HOGNESS. 1983. Molecular genetics of the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster*. Science 221;23-29.
- BIGGIN, M.D. & R. TJIAN. 1989. Transcription factors and the control of *Drosophila* development. Trends in Genetics 5 (11): 377-383.
- BOUCHARD, R.A. 1982. Moderately repetitive DNA in evolution. Int. Rev. Cytol. 76: 113-193.
- BOUVIER, E.L. 1902. Un Péripate de Costa Rica. Bull. Soc. Ent. Fr. 15: 239.
- BRUSCA, A. & BRUSCA. 1990. Invertebrates. Sinauer. M.S. p. 667-691.
- CAMPIGLIA, S.S. 1976. The blood of *Peripatus acacioi* Marcus & Marcus (Onychophora)-III. The ionic composition of the hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 54A :129-133
- CAVALIER-SMITH, T. 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell, growth rate, and the solution of the DNA C-Value paradox. J. Cell. Sci. 34: 247-278.

- DE ROBERTIS, E.M. , G. OLIVER, & C.V. E. WRIGHT. 1990. Homeobox Genes and the vertebrate body plan. *Scientific American* , 46-52.
- DEININGER, P.L. & G.R. DANIELS. 1986. The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. *Trends in genetics* 2 (3): 76-80.
- DESPLAN, C. , J. THEIS, & P.H. O'FARRELL. 1988. The sequence specificity of Homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54: 1081-1090.
- DIAZ, M.O. , G. BARSACHI-PILONE, K.A. MAHON, & J.G. GALL. 1981. Transcripts of both strands of a satellite occur on lampbrush chromosome loops of the newt *Notophthalmus*. *Cell* 24: 649-659.
- DRIEVER, W., & C. NUSLEIN-VOLHARD. 1988. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* 54: 83-93.
- FEINBERG, A.P. & B. VOGELSTEIN. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *ANAL. BIOCHEM.* 132: 6.
- GABOR M. , G.L. 1982 . Sequencing and manipulating highly repeated DNA. In: *Genome Evolution* edited by G.A. Dover & R.B. Flavell, Systematics Association, vol.20, Academic Press, London, pp. 41-67.
- GENEPRO VERSION 3.00. 1986. Riverside Scientific Enterprises. Seattle.
- GHISELIN, M.T. 1985. A movable feaster. *Natural History*. 94(9): 54-61.
- GOULD, S.J. 1989. *Wonderful Life: The Burgess Shale and the Nature of History*. W.W. Norton & Company, Inc. New York. p.347.
- HANAHAH, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In: *DNA cloning I. A practical approach* edited by D. M Glover, IRL Press Limited, England, p. 109-135.
- HAMES, B.D., S.J. Higgins. 1985. *Nucleic acid hybridization* IRL. Press Oxford, Washington DC. p. 245.

- HENIKOFF, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28:351.
- HOLLAND, W. , B.L.M. HOGAN. 1986. Phylogenetic distribution of Antennapedia-like boxes. *Nature* 321: 251-253.
- INGHAM, P.W. 1988. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335: 25-34.
- JAMRICH, M.R. , R. WARRIOR, R. STEELE, & R. GALL. 1983. Transcription of repetitive sequences on *Xenopus* lampbrush chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1012-1026.
- JELINEK, W.R. , & C.W. SCHMID. 1982. Repetitive sequences in eucaryotic DNA and their expression. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 813-844.
- JOHN, B., & G. MIKLOS. 1988. The eukaryote genome in Development and Evolution. ALLEN & UNWIN. London.
- KENYON, C., & B. WANG. 1991. A Cluster of Antennapedia-Class Homeobox Genes in a Nonsegmented Animal. *Science* 258: 354-358.
- KESSEL, M. & P. GRUSS. 1990. Murine Developmental Control Genes. *Science* 249: 374-379.
- KING, P.V. , R.W. BLAKESLEY. 1986. Optimizing DNA Ligations for Transformation. *Focus* 8(1):1-2.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:681-685.
- LAIRD, C.D. 1973. DNA of *Drosophila* chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 7: 177-204.
- LAUGHON, A., & M.P. SCOTT. 1984. Sequence of *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature* 310: 25-31.
- LEVINE, M. 1988. Molecular analysis of dorsal-ventral polarity in *Drosophila*. *Cell* 52: 785-786
- LEVINE, M. & T. HOEY. 1988. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55: 537-540.

- LEWIS, E.B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. Nature 276: 565-570
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH & J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning : A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. N.Y. p.455.
- MANTON, S.M. 1972. The evolution of arthropod locomotory mechanisms , Part 10. J. Linn. Soc. Zool. 51: 203-400.
- McGINNIS, W., M.S. LEVINE, E. HAFEN, A. KUROIWA, & W.J GEHRING. 1984 . A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. Nature 308: 428-433.
- MEINKOTH, J. & G. WAHL. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Analytical Biochemistry 138: 267-284.
- MESELSON, M., W. STAHL, & J. VINOGRAD. 1957. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. Proc. Natl. Acad. Sci. 43 (7): 581-588.
- MORA, M. , A. Herrera, B. Morera, & P. León, Patrón peptídico de las secreciones adhesivas de los onicóforos del género *Epiperipatus* (Peripatidae, Onychophora) (En preparación).
- MORERA, B.G. Biosistemática de los Onicóforos de Costa Rica.(En preparación)
- MORERA, B.G., & M. Mora. Autoecología de *E. biolleyi*. (En preparación)
- MORERA, B.G, A. Herrera, M. Mora, & P. León. Análisis citológico de los cromosomas de *E. biolleyi* (En preparación).
- MIRSKY, A.E. & H. RIS. 1951. The Desoxyribonucleic Acid content of animal cells and its evolutionary significance. J. Genet. Physiol. 34: 451-462.
- MIZUNO, S. & H.C. MacGREGOR. 1974 . Chromosomes, DNA sequences and evolution in salamanders of the genus *Plethodon*. Chromosoma (Berlin) 48: 239-296.

- NUSLEIN-VOLHARD, C. & E. WIESCHAUS. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. Nature 287: 795-800.
- OHKUMA, Y., M. HORIKOSHI, R.G. ROEDER, & C.L. DESPLAN. 1990. Binding site-dependent direct activation and repression of in vitro transcription by *Drosophila* Homeodomain proteins. Cell 61: 475-484.
- PABO, C.O., & R.T. SAUER. 1984. Protein-DNA recognition. Annu. Rev. Biochem. 53: 293-321.
- PEIFER, M., F. KARCH, & W. BENDER. 1987. The bithorax complex: control of segmental identity. Genes & Development 1: 891-898.
- QIAN, Y.Q., M. BILLETER, G. OTTING, M. MULLER, W.J. GEHRING & K. WUTHRICH. 1989. The structure of the Antennapedia Homeodomain determined by NMR Spectroscopy in solution: Comparison with prokaryotic repressors. Cell 59: 573-580.
- RAFF, R.A. & T.C. KAUFMAN. 1983. Embryos, Genes, and Evolution Macmillan Publishing Co., New York. p. 395.
- RUTHER, U. 1980. Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. Molec. Gen. Genet. 178: 475-477.
- ROLFE, R., & M. MESELSON. 1959. The relative homogeneity of Microbial DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 45:1039-1043.
- ROTH, S., D. STEIN, & C. NUSSLEIN-VOLHARD. 1989. A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. Cell 59: 1189-1202.
- SAIKI, R.K., S. SCHARF, & F. FALOONA. 1985. Enzymatic Amplification of B-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science 230: 1350-1354.
- SANGER, F., S. MIKLEN, & A.R. COULSON, 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
- SEQUENASE. Protocols for DNA sequencing. United States Biochemical Corporation. Cleveland. p. 10.

- SINGER, M.F. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.* 76: 67-1112.
- SCOTT, M.P., A.J. Weiner, T.I. HAZELRIGG, B.A. POLISKY, V. PIRROTA, F. SCALENGHE, & T.C. KAUFMAN. 1983. The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell* 35: 763-776.
- SCOTT, M.P., & A.J. WEINER. 1984. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4115-4119.
- SCOTT, M.P. 1985. Molecules and puzzles from the antennapedia homoeotic gene complex of *Drosophila*. *Trends in Genetics* 1 (3): 74-80.
- SCOTT, M.P. & S.B. CARROLL. 1987. The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* 51: 689-698.
- SCOTT, M.P., J.W. TAMKUN, & G.W. HARTZELL III. 1989. The Structure and function of the homeodomain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 989 : 25-48.
- STRAUSS, F. & A. VARSHAVSKY. 1984. A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* 37 : 889-901.
- STRUHL, K. 1989. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eucaryotic transcriptional regulatory proteins. *TIBS* 14: 137-138.

- SUEOKA, N. 1962. On the genetic Basis of Variation and heterogeneity of DNA bases composition. Proc. Nat. Acad. U.S.A. 48:582-592.
- TABOR, S., & C.C. RICHARSON. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84 (14):4767-4771.
- TREISMAN, J., P. GONCZY, M. VASHISHTHA, E. HARRIS, & C. DESPLAN. 1989. A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. Cell 59: 553-562.
- TUNIS, M.J.B., & J.E. HEARST. 1968. On the hydration of DNA. II Base composition dependence of the net hydration of DNA. Biopolymers 6:1345-1353.
- VARLEY, J.M, H.C. MACGREGOR, I. NARDI, C. ANDREWS, & H.P. ERBA. 1980. Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus carnifex*. Chromosoma 80: 289-307.
- VIEIRA, J. & J. MESSING. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19: 259-268.
- VOGELSTEIN, B. & D. GILLESPIE. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(2): 615-619.
- WILSON, A.C., F. MAXSON, & V.M. SARICH. 1974. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 2843-2847.