



005812
2Ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Química

**Caracterización genética y molecular del gen homólogo
de la *hsp60* de *Drosophila melanogaster*.**

**Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Químicas (Bioquímica)
Presenta:**

M. en C. Lucía Perezgasga Ciscomani

Director de tesis:

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Cuernavaca, Mor.

Septiembre

1999

**TESIS CON
LLA DE ORIGEN**

274562



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINATION

DISCONTINUA.

En memoria de la Mama y de Flavio

A mi papá

A mis hermanos, a Ana y Gerardo

A Camila y a Fernanda

**A Enrique, que ha llenado mi vida,
aún estando lejos.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la UNAM, que a pesar de todo y todos, sigue siendo la Universidad Nacional y que me dió la oportunidad de estudiar y trabajar con magníficos profesores e investigadores.

Al Instituto de Biotecnología, UNAM en donde aprendí a hacer ciencia de alto nivel en un excelente ambiente académico y humano.

A mis tutores, el Dr. Jorge Vázquez y el Dr. Alejandro García Carrancá, por sus contribuciones a mi proyecto de doctorado.

A los integrantes del jurado: Dr. Jorge Vázquez, Dra. Yvonne Rosenstein, Dra. Carmen Gómez, Dr. Alejandro Zentella, Dr. Jesús Aguirre, Dr. Roberto Coria y Dra. Martha Menjívar, por tomarse el tiempo para leer y corregir esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio Zurita-Covarrubias-Lomelí, con los que compartí muchos momentos divertidos dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigas legendarias Adriana, Mayda y Aleka por nuestra solidaria amistad. A mis amigas del "club de Lulú" María Luisa, Nieves, Irma, Rosy y Helena por las reuniones de sano esparcimiento. A Bertha por su apoyo al inicio de mi doctorado y por todos los ratos que hemos pasado juntas. A Martha Vázquez por todos sus consejos y apoyo en el laboratorio. A Lorenzo Segovia por su ayuda y colaboración en uno de los artículos.

A la Unidad de Cómputo del IBT, UNAM por el apoyo técnico.

Al Dr. Mario Zurita que me enseñó biología molecular y porque además de ser un muy buen asesor y amigo, es una excelente persona.

A Toño Lazcano por su amistad y apoyo académico.

A Erwin le agradezco las facilidades que me dió para poder ir a Stanford en varias ocasiones, lo que además me permitió arreglar mi estancia posdoctoral en esa universidad.

Al Dr. Jesús Guzmán, Paty Vargas, Marco Ordaz y Blanca Ruíz de la Div. de Estudios de Posgrado de la Fac. de Química y a María Elena, Irma, Susana y Bety del control escolar del Posgrado de la Fac. de Química, les agradezco su invaluable ayuda y su eficiencia, que fueron fundamentales para mí, estando en Cuernavaca. A la Dra. Farrés y a Lety García por ayudarme con los trámites de titulación durante la huelga.

A mi tía Catita, por estar presente.

Una vez más, a mi padre, por su incansable apoyo en todos los aspectos.

Por un momento pensé que el doctorado no tenía fin. El terminarlo no sólo implicó la perseverancia de acabar lo que se empieza, fue muy complicado empezar en un campo nuevo y muy distinto al que yo me había desarrollado y sobre todo, terminar estando lejos de Enrique, quien se ha vuelto tan importante para mí en estos últimos años.

Resumen

En este trabajo, se caracterizó a nivel genético y molecular el gen *Dmhsp60*, localizado en la región 10A4-5 del cromosoma X de *Drosophila melanogaster*. Mediante la comparación de la secuencia del cDNA en los bancos de datos, encontramos que el producto de este gen presenta una alta identidad a lo largo de toda la proteína con la Hsp60 de diferentes organismos, desde bacterias hasta humanos.

El gen presenta dos intrones y tres exones: el primer exon contiene la región 5' no traducida (5'UTR), al lado está el intrón 5' de ~3Kpb; el segundo exon que empieza con la metionina inicial y que contiene la mayor parte de la región codificante, está interrumpido por el intrón 3' de 63 pb y el tercer exon contiene los restantes 116 codones, así como la región 3' no traducida (3'UTR).

El transcrito es muy abundante en embriones de 0-4h de edad, sus niveles disminuyen en estadios posteriores. Tres alelos fueron caracterizados durante este trabajo: uno debido a la inserción de un elemento P en el intrón 5' que produce un fenotipo letal cuando está en el fondo genético de una deficiencia que abarca la zona donde se localiza el gen; los otros dos alelos pueden considerarse nulos ya que en uno está afectada la producción o estabilidad del transcrito, y en el otro la proteína no es funcional.

La proteína presenta una distribución muy dinámica durante el desarrollo. En algunos casos coincide con células que están migrando, que son metabólicamente más activas, o que tiene más mitocondrias.

El rescate del fenotipo de letalidad embrionaria con el transgen que contiene el fragmento genómico de 15Kpb, en donde se encuentra la unidad transcripcional del gen, así como el análisis molecular del alelo *BP5^{S15}/FM6*, confirmaron que el gen *Dmhsp60* está codificado por el locus *l(1)10Ac*.

El análisis de la región promotora, así como los ensayos de Northern y Western blot de embriones con y sin choque térmico, demostraron que ni el transcrito ni la proteína son inducibles por calor, por lo que la DmHsp60 no es una chaperonina típica.

Abstract

We present here the genetic and molecular characterization of the *Dmhsp60* gene, located in the 10A4-5 region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. By the cDNA sequence comparison with the genbank, we found that this gene presented a high identity along the entire protein with the Hsp60 from different organisms, from bacteria to humans.

The gene has two introns and three exons: the first exon contains the 5'UTR; beside is the ~3KB 5' intron; the second exon which starts with the initial methionine and has most of the coding region, is interrupted by the 63 bp 3' intron and the third exon which contains the 116 remaining codons, as well as the 3'UTR.

The transcript is abundant in 0-4h embryos and diminishes in posterior stages. Three alleles were characterized during this work: one of them is due to the P element insertion in the 5' intron that produces a lethal phenotype in the background of a deficiency that comprises the region where the gene is located; the other two alleles can be considered null: in one of them, the production or stability of the transcript is affected and the other one produces a non functional protein.

The protein presents a dynamic distribution during development. In some cases, it coincides with cells that are moving or that have a more active metabolism.

The genetic rescue experiments with the 15 Kb genomic fragment, which contains the transcription unit of the gene, as well as the molecular analysis of the *BP5^{S15}/FM6* allele, confirmed that the *Dmhsp60* gene is encoded by the *I(1)10Ac* locus.

The promoter region analysis and the northern and western blot experiments with and without heat shock, demonstrated that neither the transcript nor the protein are heat inducible. Therefore, the DmHsp60 is not a typical chaperonine.

Prólogo

En este trabajo, se presenta la caracterización a nivel genético y molecular del gen de *Drosophila melanogaster* homólogo a *hsp60* de diferentes organismos.

En el apéndice, se anexan los dos artículos que se publicaron como resultado de este proyecto.

Para evitar redundar en los datos, en la parte de resultados sólo se incluyen las figuras de los experimentos que no aparecen en los dos artículos. El resto de las figuras se refieren directamente por el número con el que aparecen en cada uno de los artículos en que se encuentran.

INDICE

Antecedentes	3
I. Introducción	7
1.1 Definición y características de las chaperonas.	7
1.2 Características de las chaperoninas.	9
1.3 Las chaperoninas como marcadores filogenéticos.	12
1.4 Enfermedades asociadas a las chaperoninas.	13
1.5 Papel de las chaperonas en la importación y ensamblaje de proteínas hacia la mitocondria.	14
1.6 Las proteínas de choque térmico en <i>Drosophila melanogaster</i>	15
II. Materiales y métodos.	18
2.1 Cepas de moscas.	18
2.2 Enzimas de restricción, DNA polimerasas y reverso transcriptasa.	18
2.3 Clonación del gen homólogo <i>hsp60</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.4 Purificación de RNA.	19
2.5 Purificación de núcleos de hembras adultas.	19
2.6 Southern y Northern blot.	19
2.7 Secuenciación de DNA con termosecuensasa y terminadores radioactivos.	20
2.8 Modelaje por computadora de la Hsp60 del alelo <i>BP5^{F409}</i> y de la proteína silvestre.	20
2.9 Fraccionamiento subcelular.	21
2.10 Inmunocitoquímica.	21
2.11 Construcción de moscas transgénicas y rescate del fenotipo.	23
2.12 Caracterización morfológica y molecular de los alelos de la <i>hsp60</i>	23
2.13 RT-PCR de hnRNA del alelo <i>BP5^{G93}/FM6</i>	24
2.14 Análisis por Western blot de la Hsp60 de los alelos <i>BP5^{F409}/FM6</i> y <i>BP5^{G93}/FM6</i> y de OreR.	25

2.15 Análisis por “primer extension” para determinar el sitio de inicio de la transcripción y caracterización de la región promotora.	25
III. Resultados	27
3.1 Clonación y secuencia del cDNA de la <i>hsp60</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .	27
3.3 Expresión y distribución de la proteína Hsp60 durante el desarrollo embrionario.	31
3.4 Rescate del fenotipo mediante moscas transgénicas.	33
3.5 Análisis fenotípico y molecular de los alelos <i>BP5^{S15}/FM6</i> , <i>BP5^{F409}/FM6</i> , <i>BP5^{F437}/FM6</i> y <i>BP5^{G93}/FM6</i> .	34
3.6 Organización genómica del gen <i>Dmhsp60</i> y caracterización de la región promotora.	37
IV. Discusión	39
V. Conclusiones	48
Bibliografía	Error! Bookmark not defined.
Apéndice	58

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mapa citogenético y físico de la región 10A y aledañas del cromosoma X de <i>D. melanogaster</i> ._____	5
Fig. 2. Estructura del complejo GroEL/GroES. _____	9
Fig. 3. Dominios funcionales de GroEL. _____	10
Fig. 4. GroEL funciona como un doble toroide. Error! Bookmark not defined.	
Fig. 5. Alineamiento de la Hsp60 de diferentes organismos. ____	28
Fig. 6. Southern blot genómico a alta y baja severidad. _____	29
Fig. 7. Northern blot de embriones sin y con choque térmico. ____	31
Fig. 8. Western blot sin y con choque térmico. _____	32
Fig. 9. Alineamiento entre la DmHsp60 y la Hsp60P1. _____	41

Antecedentes

Diferentes grupos de investigación han realizado estudios de la región 10A y de regiones vecinas en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster*. En uno de estos estudios (Bgatov, 1986), se describe por primera vez al gen *BP5* (más tarde, *hsp60*), como un gen que comienza a expresarse en el estado embrionario, pues algunas mutaciones letales se detectan en este punto. Algunas mutaciones en este gen son letales, otras semi-letales y otras termo-sensibles (a 25° C y a 18° C) y algunas otras, provocan deformación de las ter-guitas y la formación de cromosomas politénicos enanos.

Un año más tarde (Zhimulev, 1987), se publicó un análisis genético detallado de la región 9E-10B (que incluye a la región 10A) mediante 4 tipos diferentes de mutaciones: letales, visibles, esterilidad en machos y esterilidad en hembras y rearrreglos cromosómicos. Así, encuentran que algunos alelos de *BP5*, son hipomórficos, o sea que el producto de este gen es funcionalmente equivalente al silvetsre, pero está presente en una cantidad menor o tiene una actividad menor (Ashburner, 1989). Con este estudio, se hizo patente también que este gen presenta un fenotipo pleiotrópico, ya que sus mutaciones afectan diversas etapas del desarrollo de *Drosophila*.

A principios de 1994 (Kozlova et al., 1994) se reportó la caracterización citogenética y molecular de la banda 10A1-2 y de regiones aledañas del cromosoma X de *Drosophila* a partir de la microdissección de cromosomas politénicos de glándulas salivales en dicha región y de una caminata cromosómica. Dado que el mapa genético que comprende las bandas 10A4-5 del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* determina la localización de *BP5*, y que la caminata cromosómica comprendió esta región en su totalidad, fue posible utilizar un fragmento genómico *XhoI* de 4.5Kpb proveniente de las clonas resultantes de la caminata que contenía a *BP5* (clona 5D del mapa físico, Fig. 1) como sonda para clonar el cDNA correspondiente. De esta ma-

nera, se encontraron 4 clonas en un banco de cDNA de ovarios hecho por "random primer". La clona de cDNA más grande (BP5-3) fue de alrededor de 2.5 Kpb y se usó como punto de partida en la caracterización de este gen.

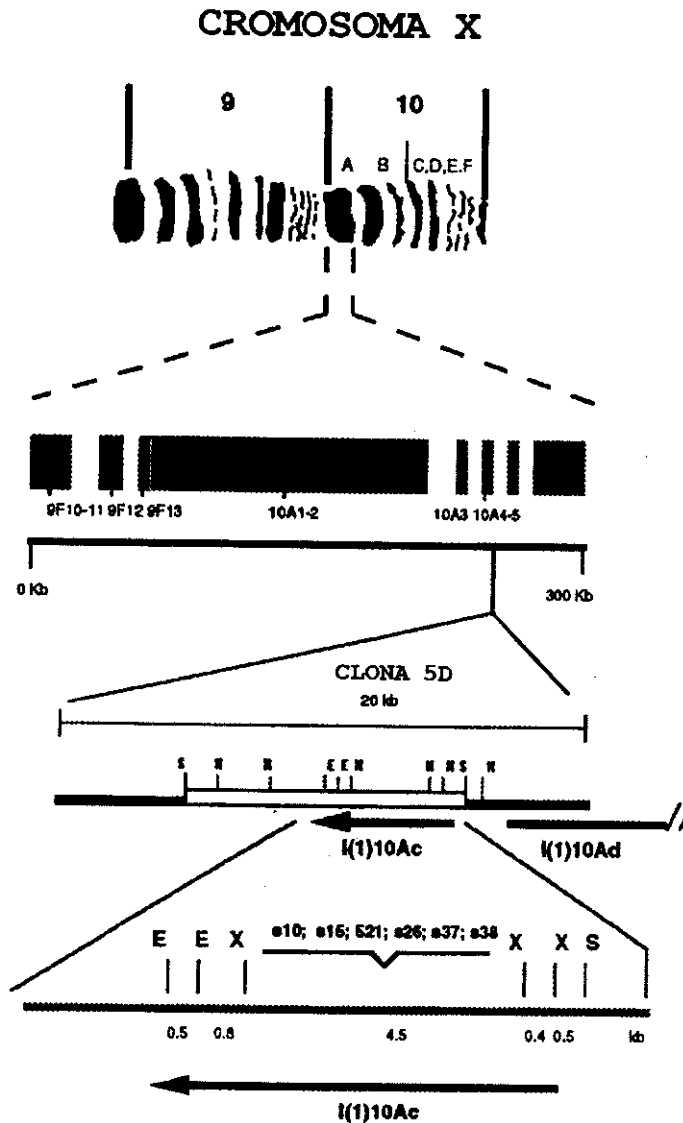


Fig. 1. Mapa citogenético y físico de la región IOA y aledañas del cromosoma X de *Drosophila melanogaster*.

El fragmento *XhoI* de 4.5 Kpb contiene 6 inserciones de elementos P que afectan al locus *l(1)10Ac* (Pokholkova et al., 1991). La clona de cDNA BP5-3 hibrida con este fragmento de 4.5 Kpb, así como con el sitio *XhoI* que se encuentra a la derecha de dicho fragmento. La dirección de la transcripción del gen, se indica con una flecha.

Como se mencionó más arriba, la clona BP5-3 se obtuvo de un banco de cDNA de ovarios. Este dato, así como el hecho de que el grupo de Zhimulev haya identificado nuevas mutantes de *BP5*, buscando mutaciones de esterilidad en hembras, nos hizo pensar que el gen *BP5* podría estar involucrado en la ovogénesis de la mosca.

Sin embargo, cuando empezamos a secuenciar y comparamos las primeras 400 pb de dicha clona contra el banco de datos, encontramos una alta similitud a nivel de aminoácidos con varias Hsp60 de diferentes organismos. Este dato sugirió que **BP5 es el gen homólogo de la *hsp60***. A lo largo del texto, se sigue utilizando el nombre de *BP5* para nombrar a las clonas, así como a los alelos de dicho gen que tenemos en el laboratorio, ya que estos alelos fueron obtenidos por el grupo de Zhimulev y se respetó su nomenclatura.

Dado que este gen no había sido descrito anteriormente para *Drosophila*, nos pareció interesante conocer más sobre su función en el desarrollo de este organismo.

I. Introducción

1.1 Definición y características de las chaperonas.

Las chaperonas son proteínas que se unen a formas no nativas de otras proteínas para *in vivo*, facilitar su destino correcto, ya sea su ensamblaje como oligómeros, transporte a un compartimiento subcelular o degradación. Las chaperonas moleculares previenen las interacciones erróneas de los polipéptidos consigo mismos, y con otros polipéptidos (Hartl, 1996).

En el medio intracelular altamente concentrado, el plegamiento correcto de las proteínas es un proceso biológico vital. Durante los procesos de síntesis, ensamblaje o transporte, las proteínas exponen cadenas laterales hidrofóbicas que pueden interactuar con las de otras proteínas favoreciendo su agregación o proteólisis (Parsell and Lindquist, 1993). Las chaperonas moleculares incrementan la eficiencia del plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, de acuerdo a su estructura primaria particular. En células procariontes y eucariontes, este plegamiento es tanto de tipo post-traducciona como co-traducciona (es decir, que un dominio se pliega antes que el siguiente sea sintetizado, y los dominios adyacentes se unen entre sí mediante secuencias flexibles (Ellis, 1999).

Las chaperonas moleculares pertenecen a varias familias de proteínas que se identificaron por primera vez en *Drosophila* porque su expresión aumentaba dramáticamente durante un choque térmico. Cada una de estas familias parece reconocer una conformación específica de la proteína no nativa y actúa sobre ella de una manera característica. Sin embargo, todas tienen en común que reconocen las superficies hidrofóbicas expuestas de las proteínas en su conformación no nativa. La clase de la Hsp70, reconoce las regiones hidrofóbicas en las cadenas lineales de polipéptidos que son liberados en una

conformación extendida con ayuda de co-chaperoninas y la hidrólisis de ATP (Sigler et al., 1998; Parsell and Lindquist, 1993). La clase de la Hsp20 actúa como grupos globulares pequeños que se unen a la superficie de proteínas no nativas durante un choque térmico. Al término de éste, las transfieren a otras chaperonas para que adquieran su forma nativa (Sigler et al., 1998; Parsell and Lindquist, 1993). El grupo de la Hsp90 funciona en grandes complejos multiméricos; los miembros de esta familia reconocen proteínas de transducción de señales, que aún no tienen su conformación nativa, y a los que sólo les falta la unión de su ligando (Sigler et al., 1998; Parsell and Lindquist, 1993). Finalmente está el grupo de las chaperoninas, que incluye a GroEL/Hsp60 y a TRiC (TCP-1 ring complex). Las primeras actúan como un complejo oligomérico de 14 subunidades de 60 KDa cada una, que forman dos anillos heptaméricos (*cis* y *trans*) uno encima del otro (Fig. 2) y reconocen superficies hidrofóbicas expuestas de proteínas globulares no nativas (Sigler et al., 1998). Están presentes en bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Son proteínas muy conservadas en la escala filogenética; su función depende de la co-chaperonina GroES/Hsp10 y de la hidrólisis de ATP. Las del grupo TRiC se encuentran en arqueobacterias y en el citosol de eucariontes. Actúan como un complejo de dos anillos con 8 ó 9 subunidades de ~55 Kda cada una, ayudando al plegamiento de proteínas del citoesqueleto (Gao et al., 1992; Gupta, 1995; Hartl et al., 1994; Yaffe et al., 1992). Aparentemente no requieren de GroES/Hsp10 y sólo son inducibles por calor las presentes en arqueobacterias (Hartl, 1996).



Fig. 2. Estructura del complejo GroEL/GroES.

Figura producida con el programa MolMol.

Vista lateral del complejo en la que se aprecian los dos anillos *cis* y *trans* de GroEL, así como GroES.

1.2 Características de las chaperoninas.

En condiciones normales de crecimiento, los sustratos naturales de GroEL, son GroEL misma, los tres factores de elongación de la traducción (EF-G, EF-Ts y EF-Tu), la cadena α de la RNA polimerasa, la subunidad β de la AT-

Pasa F1 y la enzima 3 (dihidrolipoil-deshidrogenasa) del complejo de la piruvato deshidrogenasa (Dobson and Ellis, 1998).

Recientemente (Xu et al., 1997), se logró cristalizar el complejo asimétrico GroEL/GroES-(ADP)₇, a una resolución de 3Å, con lo que se tuvo una idea más clara de la conformación y de cómo actúa dicho complejo *in vivo*. Cada una de las subunidades que conforman a GroEL/Hsp60 está formada por tres dominios: el dominio apical, que interactúa con la co-chaperonina GroES/Hsp10; el dominio intermedio o de bisagra, y el dominio ecuatorial, que constituye una base relativamente fija y que alberga el sitio de unión al ATP (Fig. 3).



Fig. 3. Dominios funcionales de GroEL.

Tomado del artículo de Xu *et al.*, 1997. El color rojo corresponde al dominio apical, el verde al dominio intermedio o de bisagra y el azul al ecuatorial. Lo que se ve en amarillo en el dominio ecuatorial, corresponde a la molécula de ADP. La figura en gris representa al complejo GroEL/GroES con una subunidad de GroEL en color, para facilitar su ubicación espacial en el complejo.

Como ya se mencionó, GroEL forma un complejo con GroES para promover el ensamblaje correcto de otras proteínas en dos etapas. En el estado

de “unión activa”, la cavidad central de cada anillo de GroEL se abre hacia el final del cilindro para que pueda entrar el polipéptido no nativo en el anillo *cis*, exponiéndose así una cavidad hidrofóbica que parece unir a las especies no nativas mediante las superficies hidrofóbicas expuestas. En el estado de “ensamblaje activo”, la unión de GroES al anillo *cis* de GroEL en presencia de ATP, provoca un cambio conformacional en GroEL que promueve el plegamiento de la proteína no nativa en el canal central, que ahora es de naturaleza hidrofílica. La hidrólisis de ATP en el anillo *cis* debilita la interacción GroEL/GroES, mientras que el plegamiento del polipéptido continúa. La unión de ATP en el anillo *trans* promueve la liberación de GroES y del polipéptido del anillo *cis* (Fig. 4). Este mecanismo alostérico negativo sugiere que el mecanismo de plegamiento dependiente de ATP, requiere de un doble toroide (Bukau and Horwich, 1998; Sigler et al., 1998; Xu et al., 1997). Un estudio reciente (Rye, 1999) demostró que en presencia del sustrato no nativo y de GroES, los dos anillos de la chaperonina funcionan de manera coordinada y direccional, ya que la hidrólisis de ATP en el anillo *cis* ocurre cuando se une un nuevo polipéptido no nativo en el anillo *trans* y posteriormente se une GroES. De esta manera, GroEL alterna sus anillos como complejos *cis* activos, gastando 7 ATPs por ciclo de plegamiento.

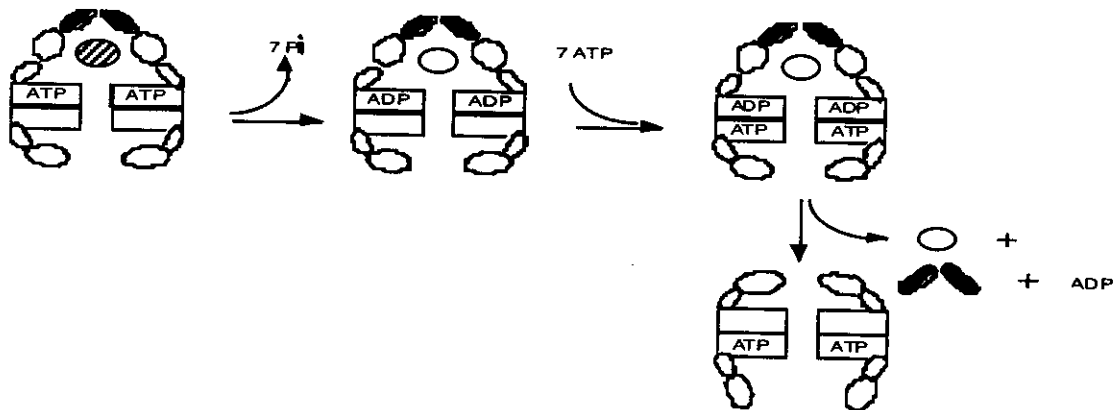


Fig. 4. GroEL funciona como un doble toroide.

Tomado de Sigler et al., 1998. Los óvalos negros representan a GroES; el círculo rayado al polipéptido no nativo y el círculo blanco al polipéptido plegado por el complejo GroEL/GroES.

Un análisis mutacional ha permitido distinguir los aminoácidos que son importantes para la función de GroEL: la lisina-3 (que está altamente conservada) es crucial para el ensamblaje de las subunidades (Horovitz et al., 1993); el aspártico 398 se necesita para la hidrólisis del ATP y la progresión del ciclo de ensamblaje. Los aminoácidos tirosina 199, serina 201, tirosina 203, fenilalanina 204, leucinas 234, 237 y 259 y valinas 263 y 264 son necesarios para la unión del polipéptido no nativo en la superficie del dominio apical, y posteriormente, para la unión de GroES al mismo dominio (Xu et al., 1997).

Aún cuando hay muchas evidencias de que GroEL funciona como un doble toroide, los análisis serológicos de extractos mitocondriales crudos de células de ovario de hamster fraccionadas por filtración en gel, así como la sobreexpresión de la Hsp60 humana en *E. coli*, sugieren que la Hsp60 mitocondrial de mamíferos existe como un anillo sencillo en contraste con GroEL, ya que presenta una masa de 400 KDa y en una micrografía electrónica, aparece como un sólo toroide con 7 subunidades (Nielsen and Cowan, 1998; Viitanen et al., 1992).

1.3 Las chaperoninas como marcadores filogenéticos.

Las Hsp60 son proteínas de mantenimiento (housekeeping) que están distribuidas de manera ubicua entre las eubacterias y los organelos eucariontes. En un alineamiento de secuencias de Hsp60 de diferentes organismos, se encontraron características comunes importantes entre ellas (Gupta, 1995):

1) Muchas de las Hsp60 tienen una o más repeticiones de la secuencia GGM o GGGM en el extremo carboxilo terminal. Las excepciones son las secuencias de los cloroplastos y las de homólogos de la Hsp60 en organismos que tienen más de un gen *hsp60*. La delección de esta secuencia repetida en *E. coli* parece no afectar su actividad *in vitro*, por lo que no se conoce el significado estructural o funcional de esta región.

- 2) En todas las especies de eucariontes, la Hsp60 mitocondrial está codificada en el núcleo y tiene una secuencia líder amino-terminal, rica en aminoácidos básicos e hidroxilados como arginina, lisina, serina y treonina, que es necesaria para su importación a la mitocondria. En algunas Hsp60 de cloroplastos, esta secuencia está presente, pero no se ha demostrado que sirva para la importación hacia dicho organelo.
- 3) La comparación de secuencias entre las diferentes Hsp60, indica que la mínima identidad observada entre dos Hsp60 es cerca del 40% a lo largo de toda la proteína. Además, del 18 al 20% de las sustituciones de aminoácidos son conservativas.
- 4) El alineamiento de las Hsp60 muestra "firmas" que se comparten entre a) miembros de la subdivisión de bacterias α -púrpuras gram negativas y los homólogos mitocondriales, y b) entre las cianobacterias y los homólogos de los cloroplastos. Estos datos apoyan la hipótesis endosimbiótica para el origen de los organelos eucariontes (Margulis, 1970). En el caso de las mitocondrias, estudios previos basados en las secuencias de rRNA y citocromo C, habían demostrado que el ancestro que había dado origen a las mitocondrias estaba relacionado a la subdivisión de bacterias α -púrpuras. Sin embargo, debido a la variación en el tamaño de las secuencias de rRNA de los organelos, así como de las del citocromo C de procariontes, era importante confirmar estos datos con otras moléculas que presentaran un alto grado de conservación tanto en su secuencia como en la estructura (Gupta, 1995; Viale and Arakaki, 1994).

1.4 Enfermedades asociadas a las chaperoninas.

Existen varios reportes en los que se ha encontrado una gran antigenicidad y niveles altos de anticuerpos anti-Hsp60 en enfermedades infecciosas y autoinmunes (Ryan et al., 1997). Debido a la alta homología entre las chaperoninas de diferentes especies, se ha visto que el epítoto localizado en-

tre los aminoácidos 180-196 de GroEL de *Mycobacterium leprae*, así como el de otras especies, es reconocido por el 20% de las células T $\gamma\delta$ de ratón y el de la Hsp60 del mismo organismo (Born et al., 1990; O'Brien et al., 1992). Así mismo, se han encontrado células T específicas para Hsp60 en pacientes con artritis reumatoide (de Graeff-Meeder et al., 1995; Res et al., 1988) y contra esclerosis múltiple (Prabhakar et al., 1994; Selmaj et al., 1991).

En 1993 (Agsteribbe et al., 1993) se reportó la muerte de un bebé dos días después de su nacimiento. En el cultivo de fibroblastos de piel, se encontró que las actividades de las enzimas de la fosforilación oxidativa, del metabolismo del piruvato, de la β -oxidación y de otras vías metabólicas mitocondriales, eran mucho menores de lo normal; la morfología de las mitocondrias estaba alterada y los niveles de la Hsp60 mitocondrial eran sólo del 20%. Los autores concluyen que este desorden mitocondrial puede ser causado por defectos en la síntesis y mantenimiento de las mitocondrias, debido a defectos en la importación de proteínas hacia la mitocondria, o en el ensamblaje de enzimas, como consecuencia de una disminución en la cantidad de la Hsp60.

1.5 Papel de las chaperonas en la importación y ensamblaje de proteínas hacia la mitocondria.

La mayoría de las preproteínas mitocondriales se sintetizan en el citosol y presentan péptidos señal de importación en el extremo amino terminal. Estos péptidos tienen de 15 a 40 residuos de longitud y son ricos en aminoácidos básicos e hidrofóbicos que adquieren la conformación de una α -hélice anfifílica (Ryan et al., 1997).

La Hsc70 (la isoforma constitutiva de la Hsp70) se asocia cotraducionalmente en forma directa con los ribosomas, previniendo interacciones erróneas de los polipéptidos nacientes, o el ensamblaje prematuro de los mismos. DnaJ en *E. coli* estimula la actividad de ATPasa de la Hsc70; su

homólogo en levaduras es Ydj1p (o MAS5). De esta manera, Ydj1p estimula la disociación de la Hsc70 de la proteína que va a ser importada a mitocondria y que posee un péptido señal (preproteína). Ydj1p se farnesila en el extremo carboxilo terminal y se une a membrana, por lo que podría conducir al complejo Hsc70-preproteína, a los receptores en la membrana mitocondrial (Lithgow, 1993). En la membrana mitocondrial está localizado el factor estimulador de la importación hacia la mitocondria (MSF), que mediante la hidrólisis de ATP, transfiere a la preproteína a los componentes de la translocasa de la membrana externa (subunidades del receptor Tom37/Tom70) a la vez que se separa de la membrana (Hachiya, 1994; Hachiya, 1995). La entrada de la preproteína a la membrana mitocondrial interna, se lleva a cabo por la acción de 3 proteínas que forman parte de la translocasa de la membrana interna: Tim17, Tim23 y Tim44. Tim44 se une a la preproteína entrante, así como a la Hsp70 de la matriz mitocondrial (mt-Hsp70). Una vez dentro de la matriz, la peptidasa procesadora de la matriz mitocondrial (MPP) corta el péptido señal. Mt-Hsp70-ADP se une a Tim44 y a la proteína entrante. GrpE cataliza el intercambio de ATP por ADP en la mt-Hsp70, lo que produce un cambio conformacional que provoca que la proteína entre hacia la matriz mitocondrial, liberándose mt-Hsp70 de Tim44. Posteriormente, algunas proteínas se unen a la Hsp60 mitocondrial para adquirir su conformación nativa (Ryan et al., 1997).

1.6 Las proteínas de choque térmico en *Drosophila melanogaster*.

La inducción *in vivo* de los “puffs” (regiones de alta transcripción, fácilmente visibles en cromosomas politénicos) en *Drosophila* es muy rápida, ocurre 1 min después del incremento de temperatura a 37° C, aunque dichos puffs siguen creciendo durante 30 ó 40 minutos más, antes de regresar a su tamaño normal.

En larvas de *Drosophila buckii* pequeños choques de temperatura provocan cambios en los patrones de los puffs de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales (Ritossa, 1962). Más tarde Ashburner (Ashburner, 1970) confirmó estos datos, exponiendo ya sean larvas de tercer instar, o sus glándulas salivales, a 37° C durante 40 minutos y notó que se desarrollaban 9 puffs característicos en los loci 33B (cromosoma 2), 63BC, 64F, 67B, 70A, 87A, 87B, 93D y 95 D (cromosoma 3), mientras que había una regresión general de todos los otros puffs, excepto aquéllos que codifican para las histonas o para los genes mitocondriales. Otros tipos de estrés (perturbaciones en la cadena respiratoria o tratamiento con metales pesados), pueden provocar el mismo comportamiento, por lo que la respuesta al choque térmico debe considerarse como una adaptación de la célula al estrés del medio ambiente (Echalier, 1997).

En 1974, Tissiers (Tissiers, 1974) y luego en 1975 Lewis, (Lewis et al., 1975) contribuyeron al entendimiento de la respuesta al choque térmico a nivel molecular con 3 observaciones fundamentales: a) que se incorporaba uridina marcada en los puffs que se inducían por el choque térmico, b) que la inducción de los puffs coincide con la síntesis *de novo* de 6 a 7 polipéptidos (Hsp83, Hsp70, Hsp68, Hsp26, Hsp27, Hsp23 y Hsp22) que no son tejido-específicos, y que se sintetizan en todos los tipos celulares que se han probado (glándulas salivales, intestino, tubos de malpigio, discos imagales y cerebro de larvas y adultos) y c) que la traducción de mRNAs preexistentes se detiene. Más tarde se demostró que las células en cultivo se comportan de la misma manera ante un choque térmico (Echalier, 1997).

Otra característica importante de los genes *hsp* en *Drosophila* es que ninguno excepto, el *hsp83*, presenta intrones (Echalier, 1997), lo que resulta muy importante para poder responder rápidamente ante un choque térmico.

En estos estudios no se identificó a ninguna proteína que correspondiera a la Hsp60. De la misma manera, no se detectó la formación de puffs en la zona donde está localizado el gen *BP5* (locus *I(1)10Ac* del cromosoma X, ver resultados de esta tesis más adelante). Sin embargo, es posible que la pro-

teína no sea inducible por calor, o que se induzca poco, de manera que no sea fácilmente detectable, como sucede en el caso de la Hsp60 mitocondrial de *Tetrahymena thermophila* (McMullin and Hallberg, 1987).

Estos datos, así como el fenotipo pleiotrópico del gen homólogo *hsp60* de *Drosophila melanogaster* (*Dmhsp60*), nos dieron la pauta para plantear el siguiente objetivo general:

“Caracterizar genética y molecularmente el gen *Dmhsp60*” mediante los siguientes objetivos particulares:

1. Caracterizar las clonas de cDNA, por medio de la obtención de la secuencia completa para conocer la naturaleza del producto codificado.
2. Determinar el patrón de expresión del gen durante el desarrollo de *D. melanogaster* mediante ensayos de tipo Northern blot, y de la proteína por medio de un fraccionamiento subcelular y análisis subsecuente por Western blot.
3. Analizar la distribución de la proteína durante el desarrollo embrionario de la mosca, con ensayos de inmunocitoquímica.
4. Rescatar el fenotipo de letalidad de los alelos del locus *l(1)10Ac* (posible *hsp60* de *Drosophila melanogaster*) por medio de la complementación con el gen silvestre, a través de la generación de moscas transgénicas.
5. Caracterizar a nivel morfológico y molecular diferentes alelos del gen.
6. Caracterizar la región 5' regulatoria del gen.

II. Materiales y métodos.

2.1 Cepas de moscas.

La cepa silvestre que se utilizó en todos los experimentos fue OreR. Los alelos de *hsp60* (*BP5⁴⁰⁹/FM6*, *BP5⁴³⁷/FM6*, *BP5⁶⁹³/FM6* y *BP5⁵¹⁵/FM6*) se mantuvieron en presencia del cromosoma balanceador *FM6* (Lindsley, 1992; Zhimulev, 1987).

2.2 Enzimas de restricción, DNA polimerasas y reverso transcriptasa.

Todas las enzimas utilizadas en este trabajo fueron comerciales y se usaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

2.3 Clonación del gen homólogo *hsp60* de *Drosophila melanogaster*.

La clona BP5-3 que fue aislada de una biblioteca de cDNA de ovario hecha por "random primer", se usó como sonda para buscar nuevas clonas de cDNA, que tuvieran completo el extremo carboxilo terminal, en un banco comercial de cDNA de embriones de 2-14h de desarrollo hecho con oligo dT (Stratagene). Las condiciones de hibridación se hicieron de acuerdo a Sambrook (Sambrook, 1989).

2.4 Purificación de RNA.

El RNA total se extrajo en todos los casos de acuerdo al protocolo de Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). La purificación del RNA Poly A⁺ se hizo de acuerdo al protocolo de Sambrook.

2.5 Purificación de núcleos de hembras adultas.

Se hizo esencialmente de acuerdo al protocolo de Lee (Lee et al., 1992) con algunas modificaciones: se usó un politron para moler las moscas, en lugar de un omni mixer y para quitar la cutícula y todos los desechos de las moscas después de molerlas, se pasó dos veces el extracto por una jeringa con fibra de vidrio.

2.6 Southern y Northern blot.

El DNA se cortó con enzimas de restricción y se separó por electroforesis de acuerdo a su peso molecular en geles de agarosa en amortiguador de boratos (Sambrook, 1989). El RNA se separó según su peso molecular en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído. Los ácidos nucleicos se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham). Las sondas se marcaron con el kit comercial "prime it II" de Stratagene, de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se hibridaron a alta o baja astringencia con los ácidos nucleicos de acuerdo al protocolo de Sambrook (Sambrook, 1989).

2.7 Secuenciación de DNA con termosecuencia y terminadores radioactivos.

Las clonas de cDNA se secuenciaron primero utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7 del plásmido pBluescript II (pKS) y posteriormente con oligonucleótidos específicos que se diseñaron sobre la secuencia; los fragmentos provenientes de la amplificación a partir de DNA genómico de los alelos de la *hsp60* (BP5^{F409}/FM6, BP5^{F437}/FM6 y BP5^{G93}/FM6) se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos específicos que se usaron para secuenciar los cDNAs. En el caso del alelo BP5^{S15}/FM6, producto de la inserción del elemento P, primero se amplificó el fragmento a partir de DNA genómico de esa línea, utilizando el oligonucleótido de las secuencias invertidas repetidas del elemento P y oligonucleótidos específicos de la *hsp60*, y posteriormente, se usaron esos mismos oligonucleótidos para la reacción de secuencia. Para secuenciar la región promotora de la clona genómica en CaSpeR, se utilizó primero un oligonucleótido reverso que se diseñó sobre la región 5' no traducida (5' UTR) de la clona de cDNA BP5-3. Posteriormente, se diseñaron otros oligos para seguir avanzando en dirección 5' sobre la clona genómica. Las reacciones de secuencia se hicieron con el "kit" para secuenciar con terminadores radioactivos y termosecuencia (Amersham) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las reacciones se corrieron en geles desnaturalizantes de acrilamida al 7% (Sambrook, 1989). El análisis de secuencia se hizo con el programa GCG versión 8 (Devereux et al., 1984).

2.8 Modelaje por computadora de la Hsp60 del alelo BP5^{F409} y de la proteína silvestre.

Las proteínas silvestre y mutante, se modelaron basándose en las coordenadas de la estructura reportada de GroEL (Xu et al., 1997). El modelo resul-

tante se minimizó con el programa Discover y las figuras se produjeron usando el programa de visualización MolMol e interpretadas con el programa PovRay v.3 (Koradi, 1996; Merritt, 1997).

2.9 Fraccionamiento subcelular.

Se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de Birnie (Birnie, 1972), homogenando embriones de 0-16h de desarrollo en un homogenizador Dounce de 2 ml en buffer de homogenización (250mM sacarosa, 50mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2mM PMSF, 5mM EDTA). El homogenado se centrifugó en tubos eppendorf a 600g por 10 min, esta pastilla contiene núcleos y células sin romper. El sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf y se centrifugó a 15,000g por 5 min, esta segunda pastilla contiene mitocondrias y lisosomas. El sobrenadante se transfirió a tubos para ultracentrífuga (Beckman ultra clear 13x51 mm) y se centrifugó a 100,000g por 60 min. El sobrenadante contiene la fracción citosólica y la pastilla es la fracción microsomal (retículo endoplásmico, ribosomas y membranas en general). Todas las fracciones se resuspendieron en 100ml y se normalizó la concentración de proteína de cada una, de acuerdo a Bradford (Bradford, 1976). Todas las fracciones se analizaron en experimentos de Western blot (Burnette, 1981).

2.10 Inmunocitoquímica.

Este es un protocolo adaptado de Ashburner (Ashburner, 1989) por Sara Bray del laboratorio de Fotis C. Kafatos. Se colectaron embriones de menos de 16h, ya que después los embriones se vuelven impermeables por la deposición de la cutícula. Los embriones se descorionaron 5 min en hipoclorito de sodio al 5% y se lavaron extensivamente con agua. Después se fijaron 20 min en "Engreiled Fix Buffer" (140mM KCl, 40mM NaCl, 4mM EGTA, 1mM espermidina, 0.2% β-mercaptoetanol, 30mM PIPES pH 6.9, formaldehído al 4%) y un

volumen igual de n-heptano en agitación suave. Para desvitelinizar a los embriones se removió la fase acuosa y se agregó un exceso de metanol, que se substituyó por más metanol fresco. El metanol se desechó y los embriones se lavaron con etanol incubándose a 20°C por 12 h como mínimo. Se removió el etanol y los embriones se hidrataron con BSS 1X ([5X] 1.6g NaCl, 1.5g KCl, 0.9g MgSO₄, 0.345g CaCl₂ dihidratado, 0.85g tricina, 1.8g glucosa, 8.5g sacarosa, se afora a 100ml con agua y se esteriliza por filtración) durante 5 min. Los embriones se lavaron 2 veces con BBT (TBS + 0.5% BSA + 0.05% triton X-100) por 10 min cada uno a temperatura ambiente y en agitación. El BBT se cambió y se incubó 10h a temperatura ambiente en agitación para permeabilizar a los embriones. Una vez permeabilizados, se agregó el anticuerpo adecuado en la dilución correcta en BBT. Los embriones se incubaron 12h en presencia del anticuerpo a 4°C en agitación. Todos los pasos siguientes se hicieron a temperatura ambiente y en agitación. Los embriones se lavaron 3 veces en BBT por 15 min cada una, y después se lavaron 3 veces en TBST (TBS + 0.05% Tween) por 10 min cada una. Después de los lavados se agregó el anticuerpo secundario a la dilución correcta en TBST y se incubó 3 h. Los embriones se lavaron 5 veces en TBST por 5 min y 3 veces en TBS por 10 min. En el caso de que los anticuerpos estén acoplados a fosfatasa alcalina, los embriones se lavan 3 veces más en buffer de fosfatasa alcalina (100mM NaCl, 100mM Tris base pH 9.5, MgCl₂ 5mM). Después de este último lavado, se substituyó con buffer de fosfatasa con substrato (Nitrobluetetrazolium 0.15mg/ml y BCIP 0.33mg/ml). El revelado se monitoreó en el microscopio de disección y la reacción se paró con TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl); los embriones se lavaron por lo menos 3 veces con TBS antes de montar y almacenar. Es posible hacer transparentes a los embriones con salicilato de metilo mediante una deshidratación con una serie de soluciones de etanol (50, 70, 80, 90 y 100%). Una vez deshidratados, se substituye el etanol al 100% con salicilato de metilo y se montan en el mismo salicilato donde hay que verlos inmediatamente.

2.11 Construcción de moscas transgénicas y rescate del fenotipo.

Para la construcción del transgen, se insertó un fragmento *Sall* de 15Kb de la clona genómica 5D (ver Fig. 1) que contiene la región codificante del gen *hsp60*, en el sitio *XhoI* del vector CaSpeR AUG b-gal, que contiene el gen *white* silvestre y los extremos del elemento P. Las moscas transgénicas fueron generadas utilizando el método de transformación de la línea germinal mediada por la transposasa del elemento P (Spradling and Rubin, 1982). Embriones mutantes para el gene *white* de 1.5h de edad se descorionaron con hipoclorito de sodio al 3% por 5 min. Los embriones fueron orientados sobre una cinta adhesiva de dos caras, deshidratados con dehidrita por un tiempo variable y cubiertos con aceite "halocarbon" Hc-4.2. A estos embriones, se les inyectó entre el 1 y 2% de su volumen de la mezcla de transformación (300mg/ml del vector de transformación, 50mg/ml del helper, que contiene a la transposasa, en 5 mM KCl; 0.1mM PO₄, pH 7.8). Las moscas macho que sobrevivieron al tratamiento (F₀) se cruzaron con hembras *white* vírgenes y se seleccionó a la progenie (F₁) que tenía ojos silvestres (rojos), producto de la complementación del gen *white*.

Para rescatar el fenotipo de los machos, se cruzaron hembras vírgenes *BP5^{F409}/FM6* o *BP5^{F437}/FM6* con machos transgénicos; para el rescate de las hembras, se cruzaron los machos rescatados en la primera cruce, con hembras vírgenes de ambos alelos.

2.12 Caracterización morfológica y molecular de los alelos de la *hsp60*.

Los alelos de la *hsp60* con los que contamos en el laboratorio son letales en la etapa embrionaria en organismos homocigos (Bgatov, 1986; Zhimulev, 1987). Ya que estos alelos están balanceados con el cromosoma *FM6*, se tienen 4

genotipos distintos: hembras heterocigas (*BP5/FM6*), hembras *FM6/FM6*, machos *FM6* y machos *BP5* (hemíctigos, con el cromosoma mutado y por lo tanto, mueren). Para determinar el efecto de estas mutaciones en la embriogénesis de *Drosophila*, se colectaron embriones de 0-24h de los diferentes alelos y se tiñeron con DAPI (4,6- diamidino-2-fenilindol), de acuerdo al protocolo de Ashburner, 1989.

Para el análisis molecular de estos alelos, se purificó DNA genómico independientemente de 3 hembras heterocigas y de una silvestre, para cada uno de los alelos (*BP5^{F409}/FM6*, *BP5^{F437}/FM6* y *BP5^{G93}/FM6*) y se utilizó como molde en reacciones de PCR con los oligos que flanquean la región codificante de la *hsp60*. Las reacciones de amplificación se hicieron en un termocilador Perkin Elmer 2400 y se utilizó la enzima Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en un volumen de 50µl y a una temperatura de alineamiento (T_m) de 58°C.

2.13 RT-PCR de hnRNA del alelo *BP5^{G93}/FM6*.

Se purificó RNA heterogéneo nuclear de aproximadamente 100 moscas heterocigas y de 100 hembras silvestres y se utilizó para sintetizar cDNA en un volumen final de reacción de 20µl en 1X de buffer de la primera cadena (50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, pH 8.3), 10mM DTT, 200 U de reverso transcriptasa M-MLV (GIBCO-BRL), 200mM dNTPs, 2mM oligo dT₁₅ y 20 U de inhibidor de RNAsa (Amersham). La mezcla se incubó primero a 65°C por 5 min antes de agregar el DTT y la enzima, después se incubó a 38°C por 1h. Se usaron 3µl de estos cDNAs en reacciones de PCR, que se hicieron en la Perkin Elmer 2400, en buffer de Taq 1X (100mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, pH 8.3), 200mM dNTPs, 0.5mM de cada oligo específico y 1.5 U de Taq polimerasa (Boehringer Mannheim). Las reacciones se incubaron a 95°C por 5 min y a 58°C por 40 seg antes de agregar la Taq y luego se incubaron a 72°C

por un min, un ciclo. Posteriormente, las reacciones se dejaron a 94°C 30 seg, 58°C 40 seg y 72°C por un min, 32 ciclos. Como control interno, se amplificó el transcrito ribosomal *rp49*. Las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 2% en buffer de boratos 1X, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron contra las clonas de cDNA BP5-3 y de *rp49* de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.*, 1989.

2.14 Análisis por Western blot de la Hsp60 de los alelos *BP5^{F409}/FM6* y *BP5^{G93}/FM6* y de OreR.

Se homogenizaron aproximadamente 100 hembras heterocigas de los alelos *BP5^{F409}/FM6* y *BP5^{G93}/FM6* y de 100 hembras OreR en presencia del buffer de homogenización, y se purificaron proteínas del extracto celular y del extracto mitocondrial de acuerdo al protocolo de Birnie (1972). Se normalizó la cantidad de proteína por Bradford y se separaron en un gel de acrilamida/SDS al 10%. Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para el análisis por western blot ECL (Amersham). Se usó una dilución 1:1000 del anti-Hsp60 (StressGen), seguido del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Amersham).

2.15 Análisis por “primer extension” para determinar el sitio de inicio de la transcripción y caracterización de la región promotora.

Se purificó RNA total de embriones de 0-4h de edad y se utilizó como molde para la síntesis del cDNA en la que se usó el oligo BP5-5'r1 quinado complementario a los nucleótidos +101 a +124 de la secuencia mostrada en la Fig. 1C

(segundo artículo), de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.*, 1987. Como control se usó el mismo RNA tratado con RNAsa antes de efectuar la reacción de extensión. La secuencia realizada con el mismo oligo se utilizó como marcador de peso molecular; los productos se resolvieron en un gel desnaturante de acrilamida al 7%.

Se secuenciaron 650 pb hacia 5' del sitio de inicio de la transcripción y se analizaron con el programa "Findpatterns" del GCG y con el programa TESS (Schug, 1997) para localizar las regiones regulatorias importantes para el control del gen.

III. Resultados

3.1 Clonación y secuencia del cDNA de la *hsp60* de *Drosophila melanogaster*.

Como se mencionó en los antecedentes, la clona de cDNA BP5-3 se aisló de un banco de cDNA de ovario hecho por "random primer", utilizando como sonda un fragmento *XhoI* de 4.5 Kb presente en la clona genómica 5D, en el cual habían varias inserciones del elemento P que afectan específicamente al gen *BP5* (que codifica para la Hsp60 de *Drosophila*). Cuando secuenciamos esta clona, nos dimos cuenta que no estaba completa en su extremo carboxilo terminal, por lo que buscamos la clona completa en un banco comercial (Stratagene) de cDNA de embriones de 2-14h de edad. Encontramos dos clonas que sobrelaparon con la clona BP5-3 y analizamos la secuencia completa con el paquete de análisis de secuencias GCG (ver Fig. 6). Como puede verse a partir del alineamiento de la Fig. 5, la Hsp60 es una proteína muy conservada a lo largo de la escala evolutiva, además, muchas de las substituciones de aminoácidos son conservativas. En particular, la DmHsp60 presenta una identidad del 53.5% con GroEL y de 74.8% con la Hsp60 mitocondrial de ratón.

Este alineamiento muestra claramente la presencia del péptido señal para la importación de la Hsp60 hacia mitocondria en las Hsp60 de los eucariontes, que no está presente en *E. coli*.

En la figura 5 se presenta de color azul la lisina 3 que es crucial para el ensamblaje de las subunidades; en rojo, los aminoácidos necesarios para la unión del polipéptido y de GroES con GroEL y en verde, el aspártico que está involucrado en la hidrólisis del ATP.

	1				50
Hsp60humano	-----MLRL	PTVFRQMRPV	SRVLAPHLTR	AYAKDVKFGA	DARALMLQGV
Hsp60raton	-----		-----APHLTR	AYAKDVKFGA	DARALMLQGV
Hsp60Droso	-----	MFRLPVSLAR	SSISRQLAMR	GYAKDVRFGP	EVRAMMLQGV
Hsp60arab	MYRFASNLAS	KARIAQNAQ	VSSRMSWSRN	YAAKEIKFGV	EARALMLKGV
Hsp60Ecoli	-----			MAAKDVKFGN	DARVKMLRGV
	51				100
Hsp60humano	DLADAVAVT	MGPKGRTVII	EQSWGSPKVT	KDGVTVAKSI	DLKDKYKNIG
Hsp60raton	DLADAVAVT	MGPKGRTVII	EQSWGSPKVT	KDGVTVAKSI	DLKDKYKNIG
Hsp60Droso	DVLADAVAVT	MGPKGRNVII	EQSWGSPKIT	KDGVTVAKSI	ELKDKFQNIQ
Hsp60arab	EDLADAVKVT	MGPKGRNVVI	EQSWGAPKVT	KDGVTVAKSI	EFKDKIKNVG
Hsp60Ecoli	NVLADAVKVT	LGPKGRNVVL	DKSFGAP'IT	KDGVSVAREI	ELEDKPFENMG
	101				150
Hsp60humano	AKLVQDVANN	TNEEAGDGTT	TATVLRASIA	KEGFEKISKG	ANPVEIRRGV
Hsp60raton	AKLVQDVANN	TNEEAGDGTT	TATVLRASIA	KEGFEKISKG	ANPVEIRRGV
Hsp60Droso	AKLVQDVANN	TNEEAGDGTT	TATVLRALIA	KEGFEKISKG	ANPVEIRRGV
Hsp60arab	ASLVKQVANA	TNDVAGDGT	CATVLT'RAIF	AEGCKSVAAG	MNAMDLRRI
Hsp60Ecoli	AQMVKEVASK	ANDAAGDGT	TATVLAQAI I	TEGLKAVAAG	MNPMDLKRG I
	151				200
Hsp60humano	MLAVDAVIAE	LKKQSKPVT	PEEIAQVATI	SANGDKEIGN	IISDAMKKVG
Hsp60raton	MLAVDAVIAE	LKKQSKPVT	PEEIAQVATI	SANGDKDIGN	IISDAMKKVG
Hsp60Droso	MLAVETVRDN	LKTRSRPVST	PEEIAQVATI	SANGDQAI'GN	LISEAMKKVG
Hsp60arab	SMAVDVV'VN	LKSKARMIST	SEEIAQVGTI	SANGEREIGE	LIKAKEMKVG
Hsp60Ecoli	DKAVTA'VEE	LKALSVP'CS	SKATAQVGTI	SANSDET'VGK	LIAEAMDKVG
	201				250
Hsp60humano	RKGVITVKDG	KTLNDELEI I	EGMKFDRGY I	SPYFINTSKG	QKCEFQDAYV
Hsp60raton	RKGVITVKDG	KTLNDELEI I	EGMKFDRGY I	SPYFINTSKG	QKCEFQDAYV
Hsp60Droso	RDGVI TVKDG	KTLTDELEVI	EGMKFDRGY I	SPYFINTSKG	AKVEFQDALL
Hsp60arab	KEGVITIQDG	KTLFNELEV'V	EGMKLDRGY T	SPYFITNQKT	QKCELDPLI
Hsp60Ecoli	KEGVITV'EDG	TGLQDEL'DVV	EGMQFDRGY L	SPYFINKPET	GAVELES'PFI
	251				300
Hsp60humano	LLSEKKISSI	QSIVPALEIA	NAHRKPLV I I	AEDVDGEALS	TLVLNRLKVG
Hsp60raton	LLSEKKFSSV	QSIVPALEIA	NAHRKPLV I I	AEDVDGEALS	TLVLNRLKVG
Hsp60Droso	LLSEKKISSV	QSI I PALELA	KSQRKPLV I I	AEDIDGEALS	TLV'VNRLKIG
Hsp60arab	LTHEKKISSI	NSIVKVLELA	LKRQRPLLIV	SEDVESDALA	TLILNKL'LAG
Hsp60Ecoli	LLADKKISNI	REMLPVLEAV	AKAGKPLLI I	AEDVEGEALA	TLV'VNTMRGI
	301				350
Hsp60humano	LQVVAVKAPG	FGDNRKNQLK	DMAIATGGAV	FGEEGLTLNL	EDVQPHDLGK
Hsp60raton	LQVVAVKAPG	FGDNRKNQLK	DMAIATGGAV	FGEEGLNLNL	EDVQAHDLGK
Hsp60Droso	LQVA'AVKAPG	FGDNRKSTLT	DMAIASGGIV	FGDDADLVKL	EDVKVSDLGQ
Hsp60arab	IKVCAIKAPG	FGENRKANLQ	DLAALTGGEV	ITDE . LGMNL	EKVDLSMLGT
Hsp60Ecoli	IKVAAV'KAPG	FCDRRKAMLQ	DIATLTGGTV	ISEE . IGMEL	EKATLEDLGQ
	351				400
Hsp60humano	VGEVITVKDD	AMLLKKGKDK	AQIEKRIQEI	IEQLDVTTSE	YEKEKLNERL
Hsp60raton	VGEVITVKDD	AMLLKKGKDK	AHIEKRIQEI	TEQLDITTSE	YEKEKLNERL
Hsp60Droso	VGEVITVKDD	TLLKKGK'GK	DDVLRANQI	RTKIEDTTSE	YEKEKLQERL
Hsp60arab	CKKVTVSKDD	TVILDGAGDK	KGIERCEQI	RSAIELSTSD	YDKEKLQERL
Hsp60Ecoli	AKRVVINKDT	TTIDGVGEE	AAIQGRVAQI	RQIIEEATSD	YDREKLQERV
	401				450
Hsp60humano	AKLSDGVAVL	KVGGTSDVEV	NEKKDRV'TDA	LNATRAAVEE	GIVLGGCCAL
Hsp60raton	AKLSDGVAVL	KVGGTSDVEV	NEKKDRV'TDA	LNATRAAVEE	GIVLGGCCAL
Hsp60Droso	ARLASGVALL	KVGGSS'VEV	NEKEDRVHDA	LNATRAAVEE	GIVPGG'CTRL
Hsp60arab	AKLGGVAVL	KVGAASEAV	GERKDRV'TDA	LNATKA'VEE	GILP'GGGVAL
Hsp60Ecoli	AKLAGGAVI	KVGAATEVEM	KEKKARVEDA	LHATRAAVEE	GVVAGG'GVAL
	451				500
Hsp60humano	LRCIPALDSL	TPANEDQKIG	IEI I KRTLKI	PAMTIAKNAG	VEGSLIVEKI
Hsp60raton	LRCIPALDSL	KPANEDQKIG	IEI I KRALKI	PAMTIAKNAG	VEGSLIVEKI
Hsp60Droso	VRLIEKLEGV	ETT'NEDQKIG	VEIVRRASRM	PCMTIAKNAG	VDGAMV'VAKV
Hsp60arab	LYAARELEKL	PTANEDQKIG	VQIIQNALKT	PVYTIASNAG	VEGAVI'VGKL
Hsp60Ecoli	IRVASKLADL	RQ'NEDQNVG	IKVALRAMEA	PLRQIVL'NCG	EEPS . VVANT
	501				550
Hsp60humano	MQSS . EVGY	DAMAGDFVNM	VERGIIDPTK	VVRTALLDAA	GVASLLTTAE
Hsp60raton	LQSS . EVGY	DAMLGDFVNM	VEKGIIDPTK	VVRTALLDAA	GVASLLTTAE
Hsp60Droso	ENQAG . DYGY	DALAGEYGNL	IEKGIIDPTK	VVRTAITDAS	GVASLLTTAE
Hsp60arab	LEQDNPD'LG	DAARKE'YVDM	VKAGIIDPLK	VIRTUALV'DAA	SVSSLLTTAE
Hsp60Ecoli	VKGGDGN'YGY	NAATEEYGNM	IDMGILDPTK	VTRSALQYAA	SVAGL'MITTE
	551			584	
Hsp60humano	VVVTEIPKEE	KDPGMGAMGG	MGGGMGGGMF	----	
Hsp60raton	AVVTEIPKEE	KDPGMGAMGG	MGGGMGGGMF	----	
Hsp60Droso	AVVTEIPKDE	GAPAMP'GMGG	MGGGMGGGMG	GGMM	
Hsp60arab	AVVVDLPKDE	SESGAAG . GG	MGGMVMDY-	----	
Hsp60Ecoli	CMVTDLPKND	AAD . LGAAGG	MGGMGGMGGM	M---	

Fig. 5. Alineamiento de la Hsp60 de diferentes organismos.

Con el fin de conocer cuántas copias de este gen están presentes en el genoma de *Drosophila*, se hizo un southern blot a alta y baja severidad de DNA genómico digerido con *EcoRI* y *XhoI* independientemente, usando como sonda el fragmento *EcoRI* de la clona BP5-3. En la Fig. 6 se ve una banda muy intensa que hibrida en ambas digestiones, en alta y baja severidad, por lo que concluimos que sólo existe una copia de este gen. Sin embargo, en el filtro que se hibridó a alta severidad, se alcanza a ver otra banda menos intensa, lo que sugiere que haya otra copia del gen en el genoma de la mosca.

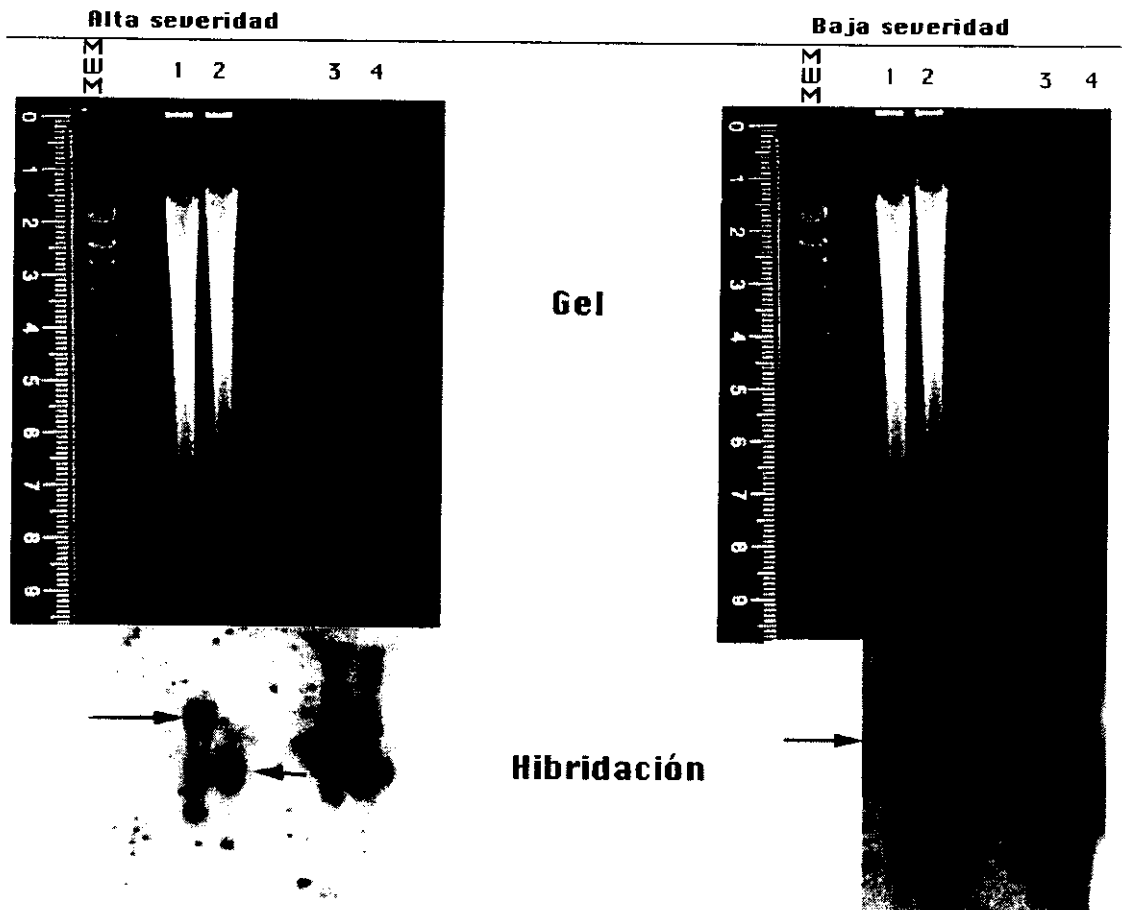


Fig. 6. Southern blot genómico a alta y baja severidad.

1.y2. DNA genómico de moscas OreR digerido con *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente.

3.y 4. CaSpeR/DmHsp60 digerido con *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente.

Las flechas en el Southern blot, señalan la banda que corresponde al gen *Dmhsp60*. La banda más tenue y de menor tamaño, que se observa en ambas digestiones, corresponde a la otra copia del gen *hsp60*.

3.2 Determinación del patrón de expresión del gen *hsp60*.

Debido al fenotipo pleiotrópico que presenta el gen de la *hsp60* (Bgatov, 1986; Zhimulev, 1987), era importante conocer en qué momento se expresa durante el desarrollo del organismo. Para esto se purificó RNA total de embriones de todas las etapas del desarrollo, larvas, pupas, hembras y machos, y se hibridó contra la clona de cDNA BP5-3. Encontramos un transcrito de aproximadamente 2.5 Kb, muy abundante en embriones de 0-4h de edad (Fig. 4, primer artículo), que es posible detectarlo en etapas tardías del desarrollo, exponiendo más tiempo el filtro. Esto resultó interesante ya que hizo evidente que había una diferencia en la cantidad del mRNA durante el desarrollo de la mosca.

Como se mencionó en la introducción, este gen no había sido descrito antes en *Drosophila* porque no se formaban "puffs" en la zona donde mapea. Sin embargo, sabíamos que hay genes *hsp60* que se inducen por calor en otros organismos (*E. coli*, levaduras y plantas) por lo que era interesante verificar si el gen de la *hsp60* era inducible en *Drosophila*. Para ello, se purificó RNA total de embriones de 0-4h y de 4-8h (este último como control, ya que sabemos que el transcrito es más abundante en las primeras 4h del desarrollo). Al cabo de las 4 y 8h correspondientes, a una parte de los embriones se les dió un choque térmico media hora a 37°C e inmediatamente después se purificó el RNA total de las 4 muestras. Estas se separaron en un gel desnaturizante con formaldehído al 37%, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con la clona BP5-3. Como se observa en la Fig. 7, no hay diferencia en la cantidad de transcrito antes y después del choque térmico en el RNA de embriones de 0-4h ni de 4-8h. Esto indica que el transcrito no es inducible con calor, lo que explica que no se haya visto la formación de puffs en la zona donde mapea este gen, en las células en cultivo sometidas a estrés térmico en *Drosophila* (Mckenzie, 1977).

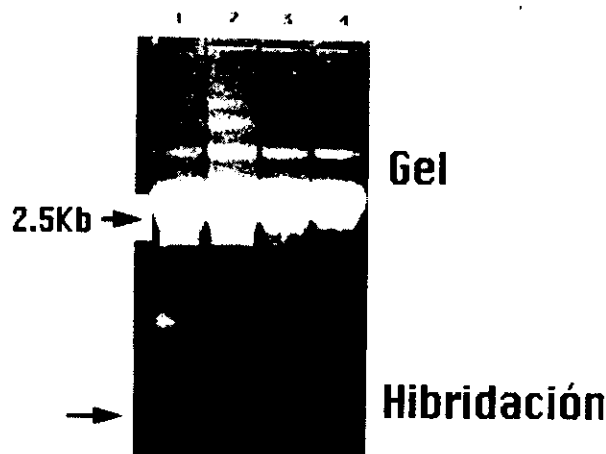


Fig. 7. Northern blot de embriones sin y con choque térmico.

1. RNA total de embriones de 0-4h sin choque térmico.
2. RNA total de embriones de 0-4h con choque térmico.
3. RNA total de embriones de 4-8h sin choque térmico.
4. RNA total de embriones de 4-8h con choque térmico.

Las bandas que se ven en el gel corresponden a precursores de RNA, RNA poly A⁺, y RNAs de alto peso molecular. La felcha en el gel señala la localización del transcrito de 2.5Kb que corresponde al gen *hsp60*.

3.3 Expresión y distribución de la proteína Hsp60 durante el desarrollo embrionario.

En eucariontes, la proteína Hsp60 se localiza en el estroma de los cloroplastos y en la matriz mitocondrial, donde ayuda a otras proteínas a adquirir su conformación nativa. El alineamiento de la DmHsp60 con las Hsp60 de diferentes organismos, mostró la mayor identidad con la Hsp60 mitocondrial de ratón. En este contexto, hicimos un fraccionamiento subcelular de embriones de 0-16h. En experimentos de Western blot, utilizamos un anticuerpo monoclonal comercial (Sigma), que reconoce un epítipo presente en muchas Hsp60 de distintos organismos, y que también está presente en la Hsp60 de *Drosophila*. Este anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 60Kda enriquecida en la fracción mitocondrial (Fig. 5A y 5B, primer artículo).

Nosotros habíamos observado que el transcrito de la *hsp60* no se inducía por calor, pero cabía la posibilidad de que la proteína sí se indujera, por lo que hicimos un Western blot de extractos mitocondriales de embriones de 0-16h de edad con y sin choque térmico, y como control, se purificaron extractos mitocondriales de levaduras con y sin choque térmico. Se cargaron 5 μ g de proteína en cada carril, normalizada mediante el ensayo de Bradford (Fig. 8).

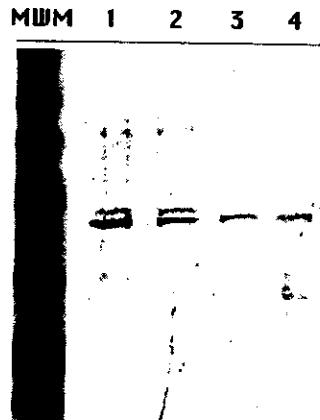


Fig. 8. Western blot sin y con choque térmico.

1 y 3. Extractos mitocondriales de levaduras y embriones, respectivamente, con choque térmico.

2 y 4. Extractos mitocondriales de levaduras y embriones respectivamente, sin choque térmico.

Como puede observarse en esta figura, hay un aumento en la cantidad de proteína inducida por calor en los extractos mitocondriales de levadura, con respecto a los no inducidos (comparar los carriles 1 y 2); esta diferencia no se observa en los extractos mitocondriales de *Drosophila*, lo cual sugiere que la DmHsp60 no es inducible por calor.

Para conocer la distribución de la proteína DmHsp60 durante el desarrollo de la mosca, utilizamos el mismo anticuerpo comercial en experimentos de inmunotinción con embriones de 0-16h de edad, ya que después de este tiempo los embriones se vuelven impermeables debido a la deposición de la cutícula (Figura 6, primer artículo).

Se pudo observar que en embriones muy tempranos (estadio 1-2, Fig. 6A), la proteína está distribuida uniformemente a todo lo largo del embrión, probablemente debido a herencia materna (en este momento aún no hay transcripción somática en el embrión). En el estadio de blastodermo celular (estadio 5, Fig. 6B), la mayor parte de la proteína se localiza en las células recién formadas y se concentra en las células polares. En el estadio 6-7 (Fig. 6C), la tinción aparece en el epitelio donde se generará el surco cefálico, en la región que generará la amnioserosa y en las células polares que en ese momento han iniciado la migración hacia la parte interior del embrión. En los siguientes estadios (11-13, Fig. 6D) la mayor tinción ocurre en la amnioserosa y en el sistema de la traquea. Estos resultados muestran que la distribución de la proteína es muy dinámica durante el desarrollo de la mosca y que aparentemente, hay células que presentan una mayor cantidad de mitocondrias y por ende, una mayor cantidad de proteína respecto a otras.

3.4 Rescate del fenotipo de letalidad mediante moscas transgénicas.

Los alelos con que contamos en el laboratorio son el resultado de una mutación puntual causada por la alimentación de las moscas con EMS (etil metano sulfonato), un agente alquilante que produce transiciones de TA a CG en el DNA (Ashburner, 1989). Zhimulev *et al.* (1987), demostraron que la letalidad para estos alelos era en la etapa embrionaria. Dado que estos alelos están balanceados con el cromosoma *FM6*, sólo un 25% de la progenie muere¹.

Para rescatar el fenotipo de letalidad embrionaria de estos alelos, se microinyectaron embriones *white* con el fragmento de aproximadamente 15Kb de la clona genómica, en la que estaba presente la región codificante de la

¹ Un cromosoma balanceador ("balancer") tiene por lo menos tres inversiones grandes, que evitan que pueda recombinar con su homólogo. Normalmente es letal cuando es homocigoto y tiene marcadores dominantes, de manera que cuando se cruza una ondicante, toda la progenie que lleva los marcadores del balancer, es heterocigota para la mutación de interés y ésta no puede ser reparada, ya que el cromosoma mutante no puede recombinar con el balancer. De la misma manera, la progenie derivada de la línea mutante balanceada, que no tenga los marcadores del balancer, es homocigota para el gen de interés (Greenspan, 1997).

DmHsp60. Por experimentos de Northern blot, sabíamos que no había ningún otro transcrito hacia 3' del gen *hsp60* que pudiera estar presente en el fragmento (ver Fig. 1). Las moscas transgénicas se cruzaron con dos de los alelos con que contamos: *BP5^{F409}/FM6* y *BP5^{F437}/FM6* y se rescataron machos y hembras homocigos para la mutación, que fueron viables y fértiles. Los marcadores fenotípicos que se utilizaron en la mutagénesis del cromosoma X: "miniature" (alas pequeñas) y "forked" (defectos en las macroquetas), fueron visibles en las moscas rescatadas. Esto demuestra que el fragmento de 15 Kb de la clona genómica es suficiente para rescatar al fenotipo letal del locus *I(1)10Ac*.

3.5 Análisis Fenotípico y molecular de los alelos *BP5^{S15}/FM6*, *BP5^{F409}/FM6*, *BP5^{F437}/FM6* y *BP5^{G93}/FM6*.

El alelo *BP5^{S15}/FM6* es debido a la inserción del elemento P en el fragmento *XhoI* de 4.5Kb de la clona genómica donde se localiza la unidad de transcripción de la *hsp60*. Se trata de un alelo letal hipomórfico² ya que la viabilidad de las hembras hemicigas (que sólo tienen una dosis del alelo mutante) está reducida y se aumenta a temperaturas por arriba de los 25°C. Los machos y las hembras homocigas para esta mutación sobreviven a todas las temperaturas, no presentan anomalías morfológicas y son fértiles, pero mueren en presencia de una deficiencia en la región (Pokholkova, 1991).

Para confirmar que la inserción del elemento P, realmente afectaba la transcripción del gen *hsp60*, se purificó DNA genómico del alelo *BP5^{S15}/FM6* y se usó como sustrato en reacciones de PCR, con los diferentes oligonucleótidos utilizados para secuenciar el cDNA de la *hsp60* y con el oligonucleótido de las secuencias repetidas invertidas del elemento P. De todos los oligonucleóti-

² Las mutaciones hipomórficas producen una pérdida parcial de la función. A nivel molecular, consisten en lesiones que reducen el nivel o la eficiencia de la proteína. Esto puede ocurrir a nivel de transcripción; las inserciones de elementos transponibles, frecuentemente reducen la transcripción al interrumpir regiones 5' no traducidas. También, como consecuencia de mutaciones sin sentido o mutaciones de pérdida de sentido, puede ocurrir una disminución en la cantidad o en la actividad de la proteína (Greenspan, 1997).

dos que se probaron, sólo 4 amplificaron un producto en combinación con el oligonucleótido P. Estos fragmentos amplificados se hibridaron con la clona de cDNA BP5-3, para corroborar que dichos productos realmente contuvieran secuencias homólogas a *hsp60*. Dado que el tamaño de las bandas amplificadas fue mayor del esperado, nos hizo suponer la presencia de un intrón de aproximadamente 3Kpb en la región 5' del gen y que la inserción del elemento P estaba localizada dentro del intrón. Secuenciamos entonces los fragmentos amplificados con el oligonucleótido específico y el oligonucleótido P y pudimos determinar que el intrón está localizado justo antes de la metionina inicial. La secuencia a partir del oligonucleótido P, es decir, la secuencia del intrón (aprox. 500 pb) no presenta ningún marco de lectura abierta en los 3 marcos posibles, lo que indica que en esa región no se encuentra ningún otro gen y que la letalidad debida a la inserción del elemento P es debida a que éste está afectando el procesamiento correcto del intrón 5' (Fig. 7, primer artículo).

Como se mencionó en el inciso anterior, los alelos *BP5^{F409}/FM6*, *BP5^{F437}/FM6* y *BP5^{G93}/FM6* son debidos a mutaciones puntuales inducidas por EMS. La tinción con DAPI de embriones de 0-24h de edad de los alelos *BP5^{F409}/FM6* y *BP5^{F437}/FM6* muestra que los embriones mueren tempranamente en el desarrollo, son amorfos, sin gastrulación y los núcleos están distribuidos al azar (Fig. 1, primer artículo). El mismo fenotipo se observa en los embriones teñidos con DAPI del alelo *BP5^{G93}/FM6* (Kozlova, comunicación personal). Este dato indica que la proteína DmHsp60 es esencial desde etapas tempranas en el desarrollo de la mosca. Este fenotipo de muerte temprana hace muy difícil trabajar con organismos homocigos; es por esta razón que la caracterización molecular de estos tres alelos fue hecha con moscas adultas heterocigas para la mutación.

Como una primera aproximación y con el propósito de relacionar el fenotipo observado con el sitio donde se localiza la mutación, se purificó DNA genómico independientemente, de 3 hembras heterocigas de cada uno de los alelos y de una hembra silvestre, y se utilizó como molde en reacciones de PCR para amplificar la región correspondiente a la proteína DmHsp60, usando

oligos que flanquean dicha región. Posteriormente, se secuenció el fragmento correspondiente.

En el caso del alelo *BP5^{F437}/FM6*, no encontramos ningún cambio en la región codificante en las hembras heterocigas con respecto a la silvestre. Este dato nos sorprendió en un principio, sin embargo, al revisar las moscas nos dimos cuenta que la población ya no tenía los marcadores del cromosoma bal-anceador y que el fenotipo era silvestre, por lo que probablemente se había se- cuenciado el cromosoma silvestre.

En el alelo *BP5^{F409}/FM6* encontramos una transición de C a T, que da como resultado el cambio de la serina 154 por una leucina en la proteína. Este es un aminoácido muy conservado, que está localizado entre las α -hélices E y F de la estructura reportada para GroEL (Xu et al., 1997). Como GroEL y la DmHsp60 presentan un 54% de identidad a lo largo de toda la proteína, se hizo un modelaje por homologamiento de la DmHsp60 silvestre y la DmHsp60^{F409}, en el laboratorio del Dr. Segovia, para determinar si este cambio podía producir una modificación en la estructura de la proteína. Sobreponiendo las estructuras de la proteína silvestre y de la mutante, observamos una distor- sión en la estructura de la mutante, con respecto a la silvestre, a partir del sitio en que se localiza la mutación, que afecta el dominio ecuatorial donde está el sitio catalítico (Fig. 2A, segundo artículo). Esta distorsión a su vez, provoca un incremento en la distancia de los enlaces entre el ADP y sus aminoácidos cer- canos (Fig. 2B, segundo artículo).

Cuando se secuenció la región codificante del alelo *BP5^{G93}/FM6*, no se encontró ningún cambio en las hembras mutantes con respecto a la silvestre, sin embargo, era posible que en este caso, la mutación puntual estuviera en otra parte del gen que no fuera la codificante. Para contestar a esta pregunta, se hizo un RT-PCR de RNA Poly A⁺ de hembras heterocigas y silvestres y no observamos diferencia en la cantidad de transcrito. Esto podía deberse a que el RNA que estábamos observando, era el que se había acumulado. Cuando hicimos este mismo experimento usando hnRNA (RNA heterogéneo nuclear), vimos una reducción del 50% (por medio de una densitometría) en la mutante

respecto a la silvestre. Esta diferencia no se vió con *rp49*, el control interno (Fig. 3A, segundo artículo).

Aún cuando nosotros observamos una disminución del 50% en la cantidad del transcrito, era importante saber si esto mismo sucedía a nivel de proteína en esta mutante. Por ello, se hizo un Western blot de extractos totales y mitocondriales de hembras *BP5^{G93}/FM6*, hembras *BP5^{F409}/FM6* y de hembras silvestres. En este experimento tampoco vimos una diferencia significativa en la cantidad de proteína entre las tres distintas muestras, lo que concuerda con lo observado en el RT-PCR de RNA Poly A⁺ (Fig. 3B, segundo artículo). Este resultado indica que aún cuando un defecto en el procesamiento, en la estabilidad o en la síntesis del mRNA de la *hsp60* (que son las posibles causas de que observemos la mitad del transcrito) parece ser la causa de la muerte temprana en organismos homócigos, las moscas heterócigas compensan de alguna manera la falta de la mitad de transcrito, acumulándolo para tener la cantidad necesaria de proteína para sobrevivir.

3.6 Organización genómica del gen *Dmhsp60* y caracterización de la región promotora.

Cuando amplificamos la región codificante de los alelos por PCR, analizamos los productos amplificados en un gel de agarosa al 1% y secuenciamos la banda correspondiente. Encontramos un intrón en el extremo 3' de 63 pb, 116 codones antes del codón de stop, de manera que el gen *Dmhsp60* está formado por tres exones y 2 intrones. El primer exon contiene la región 5' no traducida (5' UTR), después se encuentra el intrón de aproximadamente 3Kb, el segundo exon (que contiene la mayor parte de la secuencia codificante del gen), que a su vez está interrumpido por el intrón de 63 pb y el tercer exon que contiene el resto de la región codificante, así como la región 3' no traducida (3' UTR) (Fig. 1A, segundo artículo).

Para caracterizar la región promotora del gen, usamos como templado el fragmento genómico de 15Kpb clonado en el vector CaSpeR (que se usó para el rescate del fenotipo de letalidad de los alelos, por lo que la región de control debía de estar completa) para secuenciar la zona de control 5'. Así mismo, para determinar el sitio exacto de inicio de la transcripción del gen, se hizo un experimento de "primer extension", usando un oligonucleótido localizado en +102 de la secuencia mostrada en la Fig. 1C (segundo artículo), que produjo un producto de 102 nucleótidos (el sitio de inicio está marcado como +1 en la misma figura e indicado con una flecha). Las 625 pb que se secuenciaron arriba del sitio de inicio de la transcripción, se analizaron con el programa "findpatterns" del GCG y con el programa TESS para localizar las zonas regulatorias del gen. Así, la caja TATA se localizó a -37pb, la putativa caja CAAT en -139 pb y un sitio putativo de Oct-1 en -225 del sitio de inicio de la transcripción. Con estos programas no fue posible encontrar ninguna secuencia de respuesta a choque térmico en la región de control del gen *Dmhsp60*, lo que concuerda con nuestros datos acerca de que ni el transcrito, ni la proteína, son inducibles por calor.

IV. Discusión

En este trabajo, se presenta la caracterización genética y molecular del gen *Dmhsp60*. Cuando iniciamos este proyecto, contábamos con una clona genómica (clona 5D), una clona de cDNA (clona BP5-3), dos alelos por EMS letales en embriogénesis (*BP5^{F409}/FM6* y *BP5^{F437}/FM6*), y un alelo resultante de la inserción de un elemento P (*BP5^{S15}/FM6*), y por supuesto que no sabíamos para qué codificaba dicho gen. Por experimentos de genética (Bgatov, 1986; Pokholkova, 1991; Zhimulev, 1987), sabíamos que este gen estaba localizado en el cromosoma X de *Drosophila*, en la región 10A4-5 (Fig. 2, primer artículo) y que presentaba un fenotipo muy pleiotrópico ya que mutaciones en esa región causaban letalidad en diferentes momentos durante el desarrollo y habían alelos termosensibles. En 1994, Kozlova y colaboradores, aislaron la clona genómica mediante una caminata cromosómica, y posteriormente, la clona de cDNA con la que comenzamos la caracterización molecular del gen.

Como ya se mencionó, desde las primeras 300 bases secuenciadas, encontramos una alta homología con *hsp60* de diferentes organismos.

Las Hsps en *Drosophila* se descubrieron porque choques térmicos inducen la formación de puffs en algunas regiones (cromosomas 2 y 3) de los cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas de tercer instar (Ashburner, 1970; Ritossa, 1962). Esto mismo se observó con células en cultivo (Echalier, 1997; McKenzie, 1977). Sin embargo, estos puffs no se forman en la región donde mapea el gen de la *Dmhsp60* (cromosoma X) y por lo tanto, este es el primer reporte sobre la caracterización molecular de la DmHsp60.

Dada su función como chaperonas moleculares, los genes de las Hsps en *Drosophila* son constitutivos, muchos de ellos se inducen por calor a diferentes niveles (Ashburner and Bonner, 1979; Echalié, 1997), y algunos participan durante el desarrollo embrionario (Haas, 1990). Una característica común de estos genes en *Drosophila* es que no poseen intrones, con excepción de la *hsp83* (Echalié, 1997), lo que es importante para responder rápidamente ante situaciones de estrés térmico.

La secuencia de la DmHsp60 presenta un 53.5% de identidad a lo largo de la proteína con GroEL, y de entre el 55 y el 75% con otras Hsp60 de eucariontes. La máxima identidad (74.86%) es con la Hsp60 mitocondrial de ratón (Fig. 5). Todas las Hsp60 mitocondriales en eucariontes están codificadas en el núcleo y presentan un péptido señal rico en aminoácidos básicos e hidroxilados en el extremo amino terminal, que sirve para su importación hacia el organelo. Este péptido señal también está presente en las Hsp60 de cloroplastos (aunque no está tan conservado), pero no se sabe si su función es también para la importación hacia el organelo (Gupta, 1995).

En el Southern blot genómico, nosotros observamos una banda intensa a baja y alta severidad, al hibridar con la clona BP5-3, también vimos una banda más tenue y de menor tamaño, más evidente en la membrana que se hibridó a alta severidad (ver Fig. 6), que pensamos que podía ser algo inespecífico, por lo que concluimos que sólo había una copia del gen de la *hsp60* en el genoma de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, a principios de este año, al hacer una comparación de la secuencia de la región codificante de la DmHsp60 ("blast") contra todo el genoma de *Drosophila*, encontramos que había otro posible gen *hsp60* localizado en el cromosoma 2L, que tiene una homología del 77% a nivel de nucleótidos con el gen *Dmhsp60* y una identidad a lo largo de toda la proteína de 80%. En la Figura 9 se muestra un alineamiento entre estas dos proteínas.

	1				50
Hsp60Dm	-----	-----	---MFR	LPVSL ARSS. ISRQL	AMRGYA. .KD
Hsp60P1	-----	-----	MRMFR	YTNL QRTAK	ISHVL WARNYA. .KD
	51				100
Hsp60Dm	VRFGPEVRAM	MLQGV	DVLAD AVAVT	MGPKG RNVIE	EQSWG SPKI
Hsp60P1	VRFGPEVRAM	MLQGV	DVLAD AVAVT	MGPKG RNVIE	EQSWG SPKI
	101				150
Hsp60Dm	VAKSIELKDK	FQNI	GAKLVQ DVANN	TNEEA GDGTT	TATVL ARAL
Hsp60P1	VAKSIALKDK	FQNI	GAKLVQ DVANN	TNEEA GDGTT	TATVL ARAL
	151				200
Hsp60Dm	KISKGANPVE	IRRGV	MLAVE TVKDN	LKTMS RPVST	PEEIA QVAT
Hsp60P1	KISRGASPVE	IRRGV	MLAIE TVKDN	LRRLS RPVNT	PEEIC QVAT
	201				250
Hsp60Dm	QALGNLISEA	MKKVG	RDGVI TVKDG	KTLTD ELEVI	EGMKF DRGY
Hsp60P1	KSVGNLISEA	IKKVG	RDGVI TVKDG	KTLCD ELEVI	EGMKF DRGY
	251				300
Hsp60Dm	NSSKGAKVEF	QDALL	LLSEK KISSV	QSIIP ALEIA	KSORK PLVIA
Hsp60P1	NFSKGAKVEF	QDALL	LFCEK KIKSA	PISIV ALEIA	NAQRK PLVIA
	301				350
Hsp60Dm	GEALSTLVVN	RLKIG	LQVAA VKAPG	FGDNR KSTLT	DMAIA SGGIV
Hsp60P1	AEALSTLVVN	RLKVG	LQVCA VKAPG	FGDNR KENLM	DMAVA TGGIV
	351				400
Hsp60Dm	ELVYLEDVKV	SDIGQ	VGEV ITRDD	TLLK GKGK	KDDVLR RANQ
Hsp60P1	ELVYLEDIKM	SDIGR	VGEV VSKDD	TMLK GKGQ	KAEVEK RVEGL
	401				450
Hsp60Dm	D. TTSEYEKE	KIQER	LARLA SGVALL	RVGG SSEVE	VNEKE DRVH
Hsp60P1	E. STSSYEKE	KMQER	LARLS SGVALL	RVGG SSDVE	VSEKK DRVI
	451				500
Hsp60Dm	RAAVEEGIVP	GGGTR	LVRLI EKLEG	VETT N EDQK	LGVETV RRAS
Hsp60P1	RAAVEEGIVP	GGGTAL	LRCI QKLN	DLKGAN EDQN	MGLEI I RRAL
	501				550
Hsp60Dm	IAKNAGVDGA	MVVA	KVENQA GD. .	YGIDA LKGEY	GNLIE FGIID
Hsp60P1	IAKNAGVDGA	MVVA	KVEILD GD. .	YGIDA LKGEY	GNMIE FGIID
	551				600
Hsp60Dm	RTAITDASGV	ASLIT	TAEAV VTEI	PKEDGA P. .	AMPGMGG MGGM
Hsp60P1	RTAISDAAGV	ASLIT	TAEAV VTEI	PLKEEA AAGA	AAGLGA LGCM
	601				
Hsp60Dm	GGMS				
Hsp60P1	GMMS				

Fig. 9. Alineamiento entre la DmHsp60 y la Hsp60P1.

En esta figura, se indican con color azul los aminoácidos que difieren solamente entre la proteína DmHsp60 y la que denominamos Hsp60P1 de *Drosophila melanogaster* y en color magenta, los aminoácidos que están presentes en el epítipo que reconoce el anticuerpo utilizado en los experimentos de Western blot y de inmunocitoquímica.

Sabemos que un grupo en Inglaterra tiene una mutante debida a la inserción de un elemento P que mapea en la zona donde está el otro gen de la *hsp60*, que causa esterilidad en machos. Estos datos indican que ciertamente en el genoma de *Drosophila* hay dos copias del gen *hsp60* (esta segunda

copia correspondería a la otra banda que se observó en el Southern blot genómico) y que el gen que está localizado en el cromosoma 2L (25E6) también se expresa, ya que la mutación da un fenotipo (ver adelante). Este gen no contiene ninguno de los dos intrones presentes en el gen *Dmhsp60*, pero no sabemos si tenga algún intrón en otro lado. Es posible que en la evolución de *Drosophila* el gen *hsp60* sin intrones, se haya duplicado y que después de esta duplicación la copia que denominamos *Dmhsp60* haya adquirido los intrones (como sabemos, este es un gen de herencia bacteriana y por lo tanto, no debiera tener intrones).

Como se observó en la figura 9, las dos Hsp60 presentes en *Drosophila*, tienen una identidad de 80% a lo largo de toda la proteína, sin embargo, a partir de los datos representados en la Tabla I, es claro que la proteína que tiene mayor identidad con las Hsp60 de otros organismos, es la que se caracterizó en este trabajo (aunque las diferencias en algunos casos son muy pequeñas). Este dato parece ser contradictorio ya que se podría decir que el gen *Dmhsp60* no es una chaperonina típica, debido a la presencia de intrones y a que no es inducible por calor. Hasta el momento, no sabemos si la otra copia tiene intrones ni si es inducible por calor (aunque por lo datos de Ashburner, 1970, tampoco hay formación de puffs en la zona donde mapea este otro gen cuando se dá un choque térmico).

Tabla I

Porcentaje de identidad del producto de cada una de las copias del gen de la Hsp60 presentes en el genoma de *D. melanogaster* con Hsp60 de otros organismos.

	DmHsp60	Hsp60P1
GroEL <i>E.coli</i>	53.5%	52.6%
Hsp60 levadura	57.4%	55.9%
Hsp60 <i>Arabidopsis</i>	57.86%	57.65%
Hsp60 ratón	74.86%	74.7%

Como se pudo ver en el alineamiento de la figura 9, el epítipo que está presente en el anticuerpo que utilizamos en el Western blot y en la inmunocitoquímica, está igualmente presente en esta otra proteína, por lo que en nuestros experimentos, es posible que se estén reconociendo ambas proteínas. Esto, sin embargo, puede ocurrir aún usando anticuerpos generados específicamente contra un antígeno determinado.

A pesar de haber otra copia del gen de la *hsp60* en el genoma de *Drosophila*, nuestro experimento del rescate del fenotipo de letalidad de los alelos *BP5^{F409}/FM6* y *BP5^{F437}/FM6*, con el fragmento genómico de 15Kpb (que contiene a la región codificante del gen), confirman que el locus *l(1)10Ac* codifica para la *Dmhsp60*. Así mismo, el análisis molecular del alelo *BP5^{S15}/FM6*, cuyo letalidad es debida a la inserción del elemento P en el intrón 5' del gen *hsp60*, apoya este dato.

Todos estos resultados y observaciones apuntan a que el gen *hsp60* (aparentemente ninguna de las dos copias) no es inducible por calor en *Drosophila*. Es de llamar la atención que la otra copia del gen *hsp60* no rescate el fenotipo de letalidad embrionaria de los alelos que se caracterizaron en

este trabajo, dado el alto porcentaje de identidad con la DmHsp60. Es probable que ambas proteínas tengan funciones diferentes o que participen en momentos distintos durante el desarrollo de la mosca (lo que podría explicar el por qué la otra copia no rescata el fenotipo de letalidad en nuestros alelos), puesto que presentan fenotipos diferentes: la Hsp60P1 provoca esterilidad en machos, mientras que la DmHsp60 tiene un fenotipo pleiotrópico ya que hay mutaciones que afectan diversas etapas del desarrollo embrionario (Zhimulev et al., 1987; Bgatov et al., 1986).

Como ya se dijo, en este trabajo se describió la organización genómica del gen *Dmhsp60*. Está formado por 2 intrones y por 3 exones. El primer exon contiene la región 5'UTR, después está el intrón 5' de ~3Kpb, el segundo exon que contiene la metionina inicial y que está interrumpido por el segundo intrón de 63pb, y el tercer exon que contiene los 116 codones restantes y el 3'UTR.

El mRNA del gen es mucho más abundante en embriones de 0-4h de edad. En estadios posteriores, el transcrito es detectable exponiendo más tiempo la membrana, al igual que en hembras y machos adultos. Esto indica que los niveles del mRNA están regulados durante el desarrollo del organismo. También quiere decir que la mayor parte de este transcrito es debida a la transcripción cigótica que inicia a los 80 min de desarrollo, después de la formación de las células polares, más que por contribución materna. Todo esto sugiere que la proteína que se produce en las primeras etapas del desarrollo es muy estable y que se mantiene en los siguientes estadios. Estos datos concuerdan con la letalidad temprana de los organismos homocigos de los alelos descritos, ya que los embriones provienen de madres heterocigas.

En el caso del alelo *BP5^{F409}/FM6*, la letalidad es probablemente debida a que la mutación cambia una serina por una leucina (más voluminosa), lo que distorsiona el dominio ecuatorial de la proteína. En este dominio está ubicado el sitio catalítico, así como el extremo amino terminal, que es esencial para el ensamblaje de las subunidades. Entonces, es probable que en los homocí-

gos, la proteína ni siquiera se llegue a ensamblar, pero los heterócigos pueden sobrevivir con el 50% del producto, esto indica que la proteína mutante no es tóxica para el funcionamiento adecuado de la DmHsp60. En cuanto al alelo *BP5^{G93}/FM6*, no encontramos la mutación puntual en la región codificante, pero el RT-PCR con hnRNA mostró una reducción del 50% en la cantidad de transcrito en la mutante con respecto a la silvestre, que no se vió cuando se hizo el mismo experimento con RNA Poly A⁺. Así, los embriones homócigos mueren por la falta de transcrito y por tanto de la proteína, antes de la gastrulación (lo que coincide con el tiempo en que el transcrito es más abundante). En cambio, los heterócigos pueden sobrevivir porque acumulan el transcrito, lo que se comprobó mediante el RT-PCR con RNA Poly A⁺ y con el Western blot de las mutantes (Fig 3, segundo artículo). Ambas mutaciones pueden considerarse nulas, ya que una afecta la producción o la estabilidad del mRNA y en la otra se produce una proteína no funcional.

Hay dos posibilidades para explicar la reducción en la cantidad de transcrito que se observa en los heterócigos del alelo *BP5^{G93}/FM6*: a) que la mutación esté en la región 5' regulatoria y que por tanto esté afectando la producción del transcrito. En este sentido, se sabe que sustituciones de una sola base en la caja TATA disminuyen la cantidad de transcrito; la caja CAAT también juega un papel muy importante en determinar la eficiencia del promotor (Lewin, 1994). b) que la mutación esté en el 3'UTR, en particular en la señal de poliadenilación (AAUAAA), que se localiza entre 11 y 30 nucleótidos arriba del sitio donde se agrega el poly A⁺. Una mutación o deleción de esta secuencia, que está muy conservada, evita que se genere el poly A⁺ y por lo tanto, afecta la estabilidad del mRNA (Lewin, 1994).

Para contestar esta pregunta, secuenciamos la región promotora de las mutantes, aprovechando que ya conocíamos la secuencia de esta región en la silvestre. Para ello, se purificó DNA genómico de 3 hembras heterócigas independientemente, de los alelos *BP5^{G93}/FM6* y *BP5^{F409}/FM6* y de una hembra silvestre y se usó como molde en un PCR para amplificar aproximada-

mente 430 pb que incluyen el sitio de inicio de la transcripción, la caja TATA, la caja CAAT y el sitio Oct-1. Amplificamos la región en ambas mutantes para corroborar que si encontrábamos alguna diferencia, ésta fuera debida a la mutación y no a un polimorfismo del cromosoma en el que se hizo la mutagénesis. Cuando secuenciamos los fragmentos amplificados, no encontramos ningún cambio en las cajas de regulación ni en ningún sitio de esta región, por lo que la mutación puede estar en un enhancer o en la señal de poliadetilación que no secuenciamos.

Nuestros experimentos de inmunocitoquímica demuestran que la cantidad y la distribución de la proteína DmHsp60 es muy dinámica durante el desarrollo de la mosca. En algunos casos, coincide que hay una gran cantidad de proteína en células que están migrando, como las células polares o las del surco cefálico, aunque hay casos en los que esto no coincide y entonces puede deberse a que esas células que presentan una mayor tinción para la Hsp60, están más activas metabólicamente, o presentan una mayor cantidad de mitocondrias. Esto es muy factible, ya que la Hsp60 participa en el ensamblaje de muchas proteínas que son importantes para la función mitocondrial, así como de sí misma. En este sentido, se ha reportado que un defecto en la importación de la Hsp60 hacia la mitocondria o una deficiencia en su función, causan en humanos el síndrome de la encefalomiopatía asociada a una acidosis láctica (Agsteribbe et al., 1993; Huckriede and Agsteribbe, 1994). En este síndrome, se afectan sobre todo el cerebro, los pulmones, el corazón y el hígado, lo que indica que hay tejidos que son más sensibles a una falta o defecto de la Hsp60 y que por lo tanto, los requerimientos de esta proteína no son los mismos para todas las células.

Como se mencionó más arriba, en los experimentos de choque térmico de células en cultivo o de glándulas salivales de larvas de tercer instar, no se observó la formación de puffs en la región donde mapea el gen *Dmhsp60* (Ashburner, 1970; Echalié, 1997). Nosotros purificamos RNA total de embriones de 0-4h de edad (en donde el transcrito es más abundante) sometidos o no

a un choque térmico y no observamos ninguna diferencia. De la misma manera, probamos si la inducción era a nivel de la proteína y comparamos con extractos mitocondriales de levaduras. En este caso, la inducción por calor de la proteína en levaduras fue muy clara con respecto a la que no se le había dado el choque térmico. Esta diferencia no fue observada en el caso de los extractos mitocondriales de *Drosophila*. Este dato lo corroboramos, cuando secuenciamos la región promotora del gen *Dmhsp60* presente en el fragmento de 15Kpb clonado en CaSpeR. Cuando analizamos la secuencia con distintos programas que identifican las regiones regulatorias de los genes, no encontramos ningún sitio funcional de unión para el factor de choque térmico (HSF) en las 650 pb de bases secuenciadas arriba del sitio de inicio de la transcripción que determinamos mediante el ensayo de "primer extension". En conjunto, nuestros datos explican por qué no se había detectado la formación de puffs al momento de dar un choque térmico en el cromosoma X (en particular, en la región 10A4-5) y demuestran que ni el transcrito, ni la proteína son inducibles por calor. En este sentido, la DmHsp60 no es una Hsp60 típica ya que no se induce por calor, y porque presenta intrones.

Y. Conclusiones

A partir de nuestros datos podemos concluir que:

1. Dado el grado tan alto de identidad a todo lo largo de la proteína con la Hsp60 mitocondrial de ratón y con Hsp60 de otros organismos, el gen localizado en la región 10A4-5 del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* corresponde a la Hsp60. Esta proteína presenta un péptido señal para su importación hacia la mitocondria.
2. El gen está formado por 3 exones y dos intrones: el primer exon contiene el 5'UTR, después se encuentra el intrón 5' de aproximadamente 3Kpb, el segundo exon comienza con la metionina inicial y contiene la mayor parte de la región codificante del gen y está interrumpido por el intrón 3' de 63pb, por último, el tercer exon que contiene los 116 codones restantes y el 3'UTR.
3. Los experimentos de rescate del fenotipo de letalidad embrionaria, así como el análisis molecular del alelo *BP5^{S15}/FM6*, confirman que el gen *Dmhsp60* está codificado en el locus *l(1)10Ac*.
4. El transcrito es más abundante en embriones de 0-4h que en cualquier otra etapa del desarrollo y es poco abundante en moscas adultas. Esto indica que hay una expresión diferencial del mRNA durante el desarrollo de la mosca y que la mayor parte de este mRNA resulta de la transcripción cigótica, más que de una contribución materna. Es posible entonces que la proteína que se produce en las primeras horas del desarrollo embrionario sea estable y se distribuya diferencialmente en los siguientes estadios.
5. La letalidad de los alelos que analizamos a nivel molecular, se da en las primeras horas del desarrollo embrionario, antes de la gastrulación, lo que

coincide con la etapa en que el transcrito es más abundante. Ambos alelos pueden considerarse nulos: en un caso, la producción, procesamiento o estabilidad del mRNA está afectada y en otro, se produce una proteína no funcional.

6. La proteína presenta una distribución muy dinámica durante el desarrollo, que en muchos casos coincide con células que están migrando activamente, o con células que tienen una tasa metabólica más alta.

7. La DmHsp60 no es una chaperonina típica, ya que ni el transcrito, ni la proteína se inducen por calor, y el gen presenta intrones.

Bibliografía

Agsteribbe, E., Huckriede, A., Veenhuis, M., Ruiters, M. H., Niezen-Koning, K. E., Skjeldal, O. H., Skullerud, K., Gupta, R. S., Hallberg, R., van Diggelen, O. P., and al, e. (1993). A fatal, systemic mitochondrial disease with decreased mitochondrial enzyme activities, abnormal ultrastructure of the mitochondria and deficiency of heat shock protein 60. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 193, 146-54.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila*. A laboratory manual. (Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Ashburner, M. (1970). Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatment. *Chromosoma* 31, 356-376.

Ashburner, M., and Bonner, J. J. (1979). The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17, 241-54.

Bgatov, A. V., Pokholkova, G.V. and Zhimulev, I.F. (1986). Fine cytogenetical analysis of the band 10A1-2 and the adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* X-chromosome. IV. Phenotypic expression of mutations located in the region 9F12-10A7. *Biol. Zentralbl.* 105, 389-405.

Birnie, G. D. (1972). *Subcellular components: preparation and fractionation*. (Baltimore, MD.: University Park Press).

Born, W., Hall, L., Dallas, A., Boymel, J., Shinnick, T., Young, D., Brennan, P., and O'Brien, R. (1990). Recognition of a peptide antigen by heat shock--reactive gamma delta T lymphocytes. *Science* 249, 67-9.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.

Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-66.

Burnette, W. N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112, 195-203.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-9.

de Graeff-Meeder, E. R., van Eden, W., Rijkers, G. T., Prakken, B. J., Kuis, W., Voorhorst-Ogink, M. M., van der Zee, R., Schuurman, H. J., Helders, P. J., and Zegers, B. J. (1995). Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *Journal Of Clinical Investigation* 95, 934-40.

Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research* 12, 387-95.

Dobson, C. M., and Ellis, R. J. (1998). Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *Embo Journal* 17, 5251-4.

Echalier, G. (1997). Experimental models in gene regulation: 1. Heat shock response of *Drosophila* cells. In *Drosophila* cells in culture. (New York, USA: Academic Press), pp. 335-391.

Ellis, R. J. a. H., F.U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 102-110.

Gao, Y., Thomas, J. O., Chow, R. L., Lee, G. H., and Cowan, N. J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell* 69, 1043-50.

Gupta, R. S. (1995). Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells [see comments]. *Molecular Microbiology* 15, 1-11.

Haas, C., Kein, U, Kloetzel, P.M. (1990). Developmental expression of *Drosophila melanogaster* small heat-shock proteins. *J. Cell. Sci.* 96, 413-418.

Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T., Mihara, K. (1994). MSF a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.* 13, 5146-5154.

Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G, Lithgow, T. (1995). Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature (London)* 376, 705-709.

Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-9.

Hartl, F. U., Hlodan, R., and Langer, T. (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends In Biochemical Sciences* 19, 20-5.

Horovitz, A., Bochkareva, E. S., and Girshovich, A. S. (1993). The N terminus of the molecular chaperonin GroEL is a crucial structural element for its assembly. *Journal Of Biological Chemistry* 268, 9957-9.

Huckriede, A., and Agsteribbe, E. (1994). Decreased synthesis and inefficient mitochondrial import of hsp60 in a patient with a mitochondrial encephalomyopathy. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1227, 200-6.

Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graphics*. 14, 51-55.

Kozlova, T. Y., Semeshin, V. F., Tretyakova, I. V., Kokoza, E. B., Pirrotta, V., Grafodatskaya, V. E., Belyaeva, E. S., and Zhimulev, I. F. (1994). Molecular and cytogenetical characterization of the 10A1-2 band and adjoining region in the *Drosophila melanogaster* polytene X chromosome. *Genetics* 136, 1063-73.

Lee, H., Kraus, K. W., Wolfner, M. F., and Lis, J. T. (1992). DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. *Genes And Development* 6, 284-95.

Lewin, B. (1994). *Genes V* (New York, USA: Oxford University Press, Inc.).

Lewis, M., Helmsing, P. J., and Ashburner, M. (1975). Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 72, 3604-8.

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

- Lithgow, T., Ryan, M., Anderson, R., Hoj, P.B., Hoogenraad, N.J. (1993). A constitutive form of heat-shock protein 70 is located in the outer membranes of mitochondria from rat liver. *FEBS lett.* 332, 277-281.
- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells.* (New Haven, CT: Yale University Press).
- Mckenzie, S. L., Meselson, M. (1977). Translation in vitro of *Drosophila* heat-shock messages. *J.Mol.Biol.* 117, 279-283.
- McMullin, T. W., and Hallberg, R. L. (1987). A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular And Cellular Biology* 7, 4414-23.
- Merritt, E. A. a. B., David J. (1997). Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Methods in Enzymology* 505-524. 227, 505-524.
- Nielsen, K. L., and Cowan, N. J. (1998). A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding in vivo. *Mol Cell* 2, 93-9.
- O'Brien, R. L., Fu, Y. X., Cranfill, R., Dallas, A., Ellis, C., Reardon, C., Lang, J., Carding, S. R., Kubo, R., and Born, W. (1992). Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89, 4348-52.
- Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review Of Genetics* 27, 437-96.

- Pokholkova, G. V., Solovjeva, I.V., Belyaeva, E.S. (1991). Lethal mutations of the X chromosome 9F12-10A7 region, induced by P-M hybrid dysgenesis. In *Drosophila Inform. Serv.*, pp. 179-180.
- Prabhakar, S., Kurien, E., Gupta, R. S., Zielinski, S., and Freedman, M. S. (1994). Heat shock protein immunoreactivity in CSF: correlation with oligoclonal banding and demyelinating disease. *Neurology* 44, 1644-8.
- Res, P. C., Schaar, C. G., Breedveld, F. C., van Eden, W., van Embden, J. D., Cohen, I. R., and de Vries, R. R. (1988). Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet* 2, 478-80.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.
- Ryan, M. T., Naylor, D. J., Høj, P. B., Clark, M. S., and Hoogenraad, N. J. (1997). The role of molecular chaperones in mitochondrial protein import and folding. *International Review Of Cytology* 174, 127-93.
- Rye, H. S., Roseman, A.M., Chen, S., Furtak, K., Fenton, W.A., Saibil, H.R. and Horwich, A.L. (1999). GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell* 97, 325-338.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schug, J., and Overton, G.C. (1997). TESS: transcription element search software on the www. (Pennsylvania: Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania.).

Selmaj, K., Brosnan, C. F., and Raine, C. S. (1991). Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 88, 6452-6.

Sigler, P. B., Xu, Z., Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annual Review Of Biochemistry* 67, 581-608.

Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-7.

Tissiers, A., Herschel, K.M., TRacy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389-398.

Viale, A. M., and Arakaki, A. K. (1994). The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *Febs Letters* 341, 146-51.

Viitanen, P. V., Lorimer, G. H., Seetharam, R., Gupta, R. S., Oppenheim, J., Thomas, J. O., and Cowan, N. J. (1992). Mammalian mitochondrial chaperonin 60 functions as a single toroidal ring. *Journal Of Biological Chemistry* 267, 695-8.

Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex [see comments]. *Nature* 388, 741-50.

Yaffe, M. B., Farr, G. W., Miklos, D., Horwich, A. L., Sternlicht, M. L., and Sternlicht, H. (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis [see comments]. *Nature* 358, 245-8.

Zhimulev, I. F., Pokholkova, G.V., Bgatov, A.B., Umbetova, G.H., Solovjeva, I.V., Khudyakov, Yu. E. and Belyaeva, E.S. (1987). Fine cytogenetical analysis of the band 10A1-2 and adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* X-chromosome. V. Genetic characteristics of the loci in the 9E-10B region. *Biol. Zentralbl.* 106, 699-720.

Apéndice

1) Kozlova, T., Perezgasga, L., Reynaud, E. Zurita, M.

The *Drosophila melanogaster* homologue of the *hsp60* gene is encoded by the essential locus *I(1)10Ac* and is differentially expressed during fly development.

Dev. Genes Evol (1997) 207:253-263.

2) Perezgasga, L., Segovia, L., Zurita, M.

Molecular characterization of the 5' control region and of two lethal alleles affecting *hsp60* gene in *Drosophila melanogaster*.

FEBS letters (1999) 456:269-273.

Tatyana Kozlova · Lucia Perezgasga
 Enrique Reynaud · Mario Zurita

The *Drosophila melanogaster* homologue of the *hsp60* gene is encoded by the essential locus *I(1)10Ac* and is differentially expressed during fly development

Received: 24 March 1997 / Accepted: 16 June 1997

Abstract The *hsp60* (heat-shock protein 60) gene family of molecular chaperones has been a subject of study in numerous systems due to its important role in the correct folding of non-native proteins in development as well as after heat-shock treatment. Here we present the characterization of the first *Drosophila hsp60* homologue. *Drosophila* HSP60 is most closely related (72% identity across the entire protein sequence) to the mouse mitochondrial HSP60. Western blot experiments indicate that *Drosophila* HSP60 is enriched in the mitochondrial fraction. The distribution of HSP60 protein is dynamic during fly embryogenesis, suggesting that various cell types might have different HSP60 requirements. The molecular analysis of a P-element-induced mutation that affects the *I(1)10Ac* locus shows that the transposon is inserted in a 3-kb intron present in the *hsp60* gene. By genetic rescue experiments we prove that *Drosophila* HSP60 is encoded by the essential locus *I(1)10Ac* opening the possibility for detailed genetic analysis of HSP60 functions in the fly.

Key words *Drosophila* · *I(1)10Ac* locus · Development · *hsp60* gene

Introduction

The HSP60/GroEL (heat-shock protein 60/Large gene of the GroE operon) family of molecular chaperones has an important role in mediating folding of non-native proteins to their native state (Parsell and Lindquist 1993; Ellis 1994). These ring-shaped oligomeric complexes are composed of 14 subunits with a molecular mass of 60 kDa. Subunits are arranged in two stacked heptameric rings, forming a barrel-like structure (Hutchinson et al. 1989). The function of HSP60/GroEL is distinct from that of the HSP70 class of chaperones. HSP70 maintains proteins unfolded and in a relatively extended conformation.

HSP60 proteins are found in the cytosol of bacteria, in the matrix compartment of mitochondria and in the stromal compartment of chloroplasts (Cheng et al. 1990; Horwich and Wilson 1993). The TCP1 (t-complex polypeptide-1) complex, a chaperonin located in the cytosol of some eukaryotic cells, is a related protein to the HSP60/GroEL family and has been demonstrated to have a role in the folding of some cytoskeleton proteins (Gao et al. 1992; Yaffe et al. 1992).

HSP60 functions are strongly dependent on HSP10/GroES (heat-shock protein 10/Small gene of the GroE operon) chaperonin. Like HSP60 proteins HSP10 proteins are found across all evolutionary lineages. HSP10 binds to the HSP60 complex and modulates ATPase activity as well as substrate binding (Saibil et al. 1993). The HSP60 protein is required at normal temperatures. It has been proposed that HSP60 catalyses the folding of proteins, but more precisely it modulates the correct folding of proteins (Martin et al. 1991; Ishi et al. 1994; Weissman et al. 1994). A combined model based on the crystal structures of the proteins GroEL and GroES has been proposed (Mande et al. 1996), and a three-dimensional reconstitution map of the domain movements in GroEL in the presence of nucleotides has been reported recently (Roseman et al. 1996). These two studies suggest relevant mechanisms for the high efficiency of this protein complex in mediating protein folding.

Edited by D. Tautz

T. Kozlova¹
 Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

L. Perezgasga · E. Reynaud · M. Zurita
 Departamento de Genética y Fisiología Molecular,
 Instituto de Biotecnología, UNAM, APDO-Postal 510-3,
 Cuernavaca, Morelos 62250, México

M. Zurita (✉)
 Departamento de Genética y Fisiología Molecular,
 Instituto de Biotecnología, UNAM, APDO-Postal 510-3,
 Cuernavaca, Morelos 62250, México

Present address:

¹ European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1,
 69012, Heidelberg, Germany

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

Mitochondrial HSP60 modulates folding of a large number of nuclear-encoded proteins after mitochondrial membrane translocation. A number of proteins have been characterized whose functions are required for the assembly of specific protein complexes in the mitochondrial inner membrane (Langer and Newpert 1994). Mutants that affect the mitochondrial *hsp60* gene have been described in yeast (Cheng et al. 1989; Cheng et al. 1990). These mutants lack the enzymatic activities of some imported mitochondrial proteins (Cheng et al. 1990). It has also been demonstrated that the HSP60 protein is required for its own assembly as well as for the assembly of some mitochondria-encoded proteins. Like many other HSP proteins, HSP60 has a role in the heat-shock response by apparently facilitating the correct folding of a large number of preexisting mitochondrial proteins after being denatured by heat treatment (Mendoza et al. 1991; Parsell and Lindquist 1993).

Heat-shock proteins were originally described in *Drosophila melanogaster* by the identification of the de novo synthesis of proteins produced after heat shock (Tissiers et al. 1974; Lewis et al. 1975; McKenzie et al. 1975; McKenzie and Meselson 1977; Lindquist 1980; Lindquist and DiDomenico 1985). Surprisingly, a protein that may correspond to HSP60 was not identified in these experiments. In agreement with this observation it has been reported that the mitochondrial HSP60 protein is only induced two- to threefold by heat shock in *Tetrahymena* (McMullin and Hallberg 1987). The heat-shock response in *Drosophila* is associated with the appearance of specific puffs in salivary gland polytene chromosomes (reviewed in Ashburner and Bonner 1979). The in vivo induction of the puffs by heat shock is very rapid; it occurs within a few minutes of the increase in temperature. Various *hsp* genes that are associated with these specific puffs have been cloned and a significant amount of information about gene regulation after heat shock has been accumulated (Ashburner and Bonner 1979; Fernandes et al. 1994; Wu et al. 1994). In spite of this, a gene corresponding to any HSP60 in *D. melanogaster* has not been described thus far. Santaren et al. (1993) reported the identification of wing imaginal disc proteins by using two-dimensional gels and determining the partial amino acid sequence for some of the protein spots found. In this work, the sequence of an 11-amino acid polypeptide potentially included in a putative *Drosophila* HSP60 protein is determined. The presence of a TCP1 like protein in flies is also documented (Ursic and Ganetzky 1988).

Recently, Kozlova et al. (1994) have reported the physical map of the 10A1-2 band as well as the adjacent regions present in the X chromosome of *D. melanogaster*. In this work, several P-element-induced alleles that correspond to the *l(1)10Ac* locus (position 10A4-5) were mapped and several corresponding cDNA clones were isolated. Different alleles that result in embryonic and larval lethality have been described for the *l(1)10Ac* locus (Bgatov et al. 1986; Zhimulev et al. 1987; Lindsley and Zimm 1992).

In the present work, we have characterized different cDNA clones that correspond to the *l(1)10Ac* locus; from

its sequence analysis we suggest that they code for a *Drosophila* homologue of the *hsp60* gene. Interestingly, our results show that the *hsp60* gene is differentially expressed during fly development. HSP60 protein distribution is very dynamic during fly embryogenesis; the protein preferentially accumulates in specific cell types. Moreover, the molecular analysis of a P-element-induced mutation and the genetic rescue experiments have confirmed that the *l(1)10Ac* locus encodes for a *D. melanogaster* HSP60 homologue.

Materials and methods

Fly strains

The wild-type stock was Oregon R. The *l(1)10Ac* mutants, and alleles *l(1)10Ac^{F409m}f* and *l(1)10Ac^{F437}m f* were maintained in the presence of the *FM6* balancer (Zhimulev et al. 1987; Lindsley and Zimm 1992). Flies were reared on standard yeast-dextrose medium at 25°C. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of embryos was performed following the protocol described by Robbins and Pimpinelli (1994).

Cloning and DNA manipulations

A 4.5-kb *Xho*I restriction fragment present in the clone 5D was used in the first screening of an ovarian cDNA library (10⁵ pfu; Kozlova et al. 1994). The cDNA clone BP5-3 isolated in the first screening was used as a probe to identify new cDNA clones in a commercial embryonic cDNA library (0- to 24-h embryos; Stratagene) and two cDNA clones were identified. The hybridization conditions were performed as reported in Sambrook et al. (1989). cDNA clones were excised from the phage vector using the zapping procedure as recommended by the supplier and either directly sequenced or subcloned into M13 vectors. DNA sequencing was performed according to the dideoxy chain termination procedure (Sanger et al. 1977). DNA and protein analysis was performed using the GCG Wisconsin program. RNA blot hybridizations were performed after RNA separation by electrophoresis in formaldehyde-agarose gels as described (Seed 1982). Low stringency DNA hybridizations and other standard DNA manipulations were performed according to protocols of Sambrook et al. (1989).

Immunocytochemistry

Whole-mount embryos were immunostained for the HSP60 protein using a commercial monoclonal antibody (dilutions 1:100 or 1:200; Sigma) that recognizes an epitope present in all HSP60 chaperones. The immunostaining conditions were essentially as described (Lee et al. 1993) except that the fixation step was carried out in "engrailed" fixing buffer (140 mM KCl, 40 mM NaCl, 4 mM Na₂EGTA, 1 mM spermidine, 30 mM Pipes pH 6.9, 0.2% 2-mercaptoethanol) containing 4% formaldehyde. Staining was visualized using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse secondary antibody and analysed in a confocal microscope.

Cell fractionation and immunoblot analysis

Embryos (0–12 h) were gently homogenized with 20 strokes in a dounce homogenator in the presence of homogenization buffer (Birnie 1972). This extract was centrifuged at slow speed (600 g) for 10 min. The pellet contained nuclei and unbroken cells. The supernatant was recovered and centrifuged for 30 min at 10,000 g. The second pellet had the mitochondrial and lysosomal fractions. The supernatant was ultracentrifuged at 100,000 g in order to separate the microsomal fractions (pellet) from the cytosolic fraction (supernatant; Birnie 1972). The protein concentrations of the frac-

tions were normalized with the Bradford assay. Proteins from different cell fractions were separated on 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels (Laemmli 1970), and the gel was blotted onto a nitrocellulose membrane for immunostaining (Burnette 1981) in a 1:100 dilution of the anti-HSP60 antibody, followed by alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Gibco). The different cellular fractions were verified by specific antibodies.

Fly transformation and rescue experiments

A genomic *Sall-Sall* DNA fragment of about 15 kb that contains the *Drosophila hsp60* transcription unit was cloned in the *XhoI* site present in the Casper AUG transformation vector (Thummel et al. 1988; Ashburner 1989). This DNA was microinjected in *w¹¹¹⁸* embryos and stocks with the insertion of $[Pw^+hsp60]$ were established and genetically mapped. Heterozygous $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}$ females balanced with *FM6* chromosome mated with *FM6*/Δ males produce homozygous $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}/\Delta$ which die during embryonic development. The initial cross $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}/FM6$ with transgenic males $yw/\Delta; P[w^+hsp60]/P[w^+hsp60]$ (line 512 transgene on the second chromosome) or $yw/\Delta; P[w^+hsp60]/+$ (line 561 transgene on the third chromosome) produced non *FM6* males $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}/\Delta; P[w^+hsp60]/+$ which were viable and fertile indicating the rescue of the lethal phenotype in the males. Rescued females were obtained by crossing $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}/FM6$ females with $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}/\Delta; P[w^+hsp60]/+$ males; the resultant homozygous females $l(1)10Ac^{F409}/l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}/l(1)10Ac^{F437}; P[w^+hsp60]/+$ were also viable and fertile.

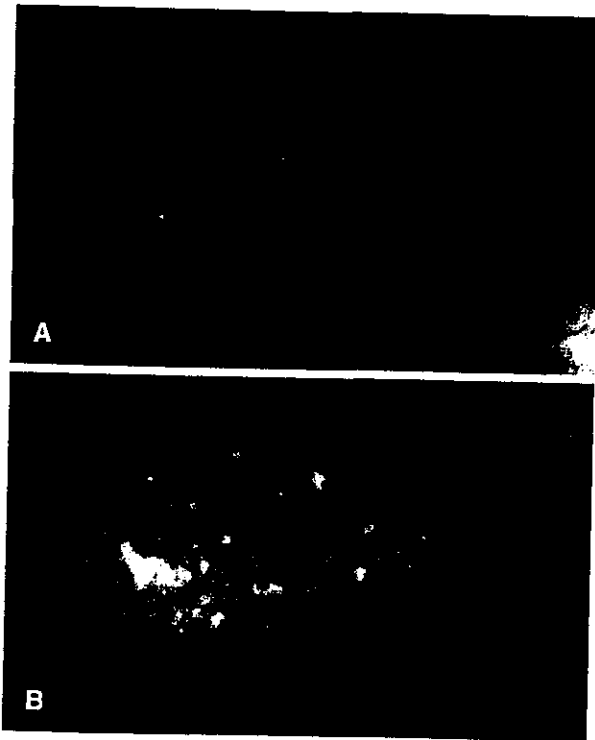


Fig. 1A, B Embryonic phenotypes of the lethal alleles affecting the $l(1)10Ac$ locus. Embryos of the $l(1)10Ac^{F409}$ or $l(1)10Ac^{F437}$ alleles were stained with DAPI. A Wild-type (Wt) embryo at stage 8. B $l(1)10Ac^{F409}/Y$ embryo. Note the amorphous shape of the embryo just before gastrulation. No other lethal mutations are present on the X chromosome (see Results).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and molecular analysis of the *S15* lethal allele

Oligonucleotide sequencing primers for *hsp60* were used in combination with P-element-specific primer in typical PCR reactions. Briefly, the template DNA was purified from heterozygous adult flies using proteinase K/phenol extractions and ethanol precipitation (Sambrook et al. 1989). Amplification reactions were carried out in a Perkin Elmer 2400 thermal cycler in 50 μ l volume containing 50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl (pH 8.3), 2 mM $MgCl_2$, 25 pmol each primer, 200 μ M dNTPs and 2.5 U Taq polymerase. Samples were held at 95°C for 50 s, 60°C for 90 s and 72°C for

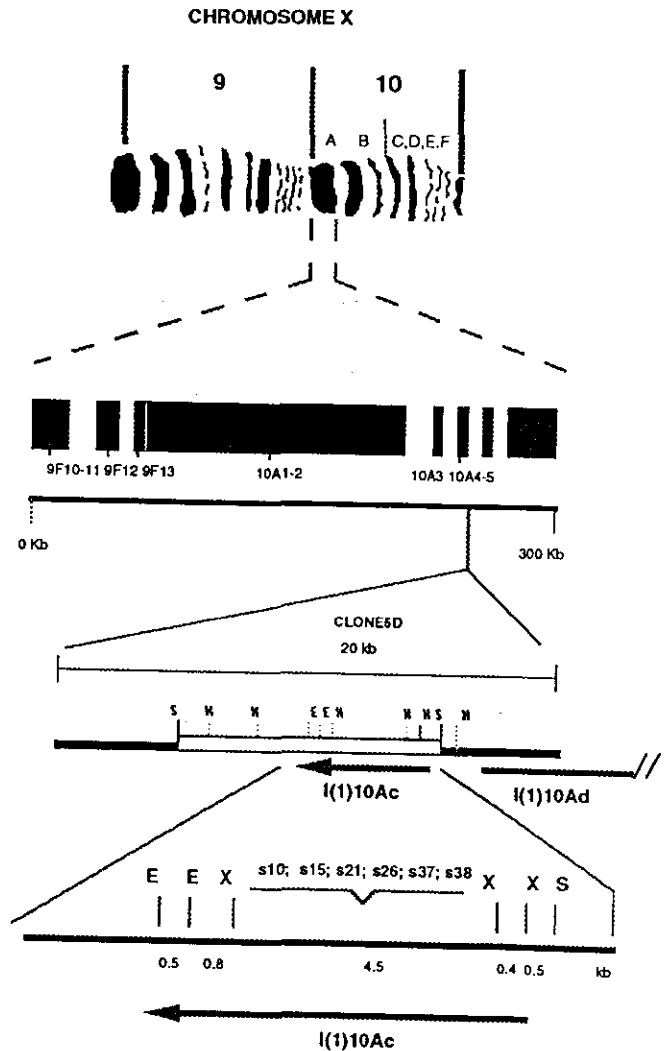


Fig. 2 Schematic representation of the localization and physical map of the *hsp60* transcript. The 10A1-2 band and adjacent regions were mapped by Kozlova et al. (1994). The genomic clone 5D (about 20 kb) containing the $l(1)10Ac$ locus is indicated. A 4.5-kb *XhoI* restriction fragment was identified as the region where six P-element-induced mutations (indicated as *S10*, *S15*, *S21*, *S26*, *S37* and *S38*) affect the $l(1)10Ac$ locus (Kozlova et al. 1994). Two overlapping cDNA clones that encode for the HSP60 (clone BP5-3, 1.8 kb in length and BP5-31 2.0 kb in length) hybridize with 4.5-kb *XhoI* restriction fragment, as well as with the adjacent *XhoI* and *EcoRI* fragments. The transcription unit and the direction of the HSP60 gene transcription are represented by an arrow indicated as $l(1)10Ac$. The 15-kb *Sall* fragment used in the rescue experiments is indicated in the figure as a white box (*EcoRI*, *XhoI*, *S Sall*).

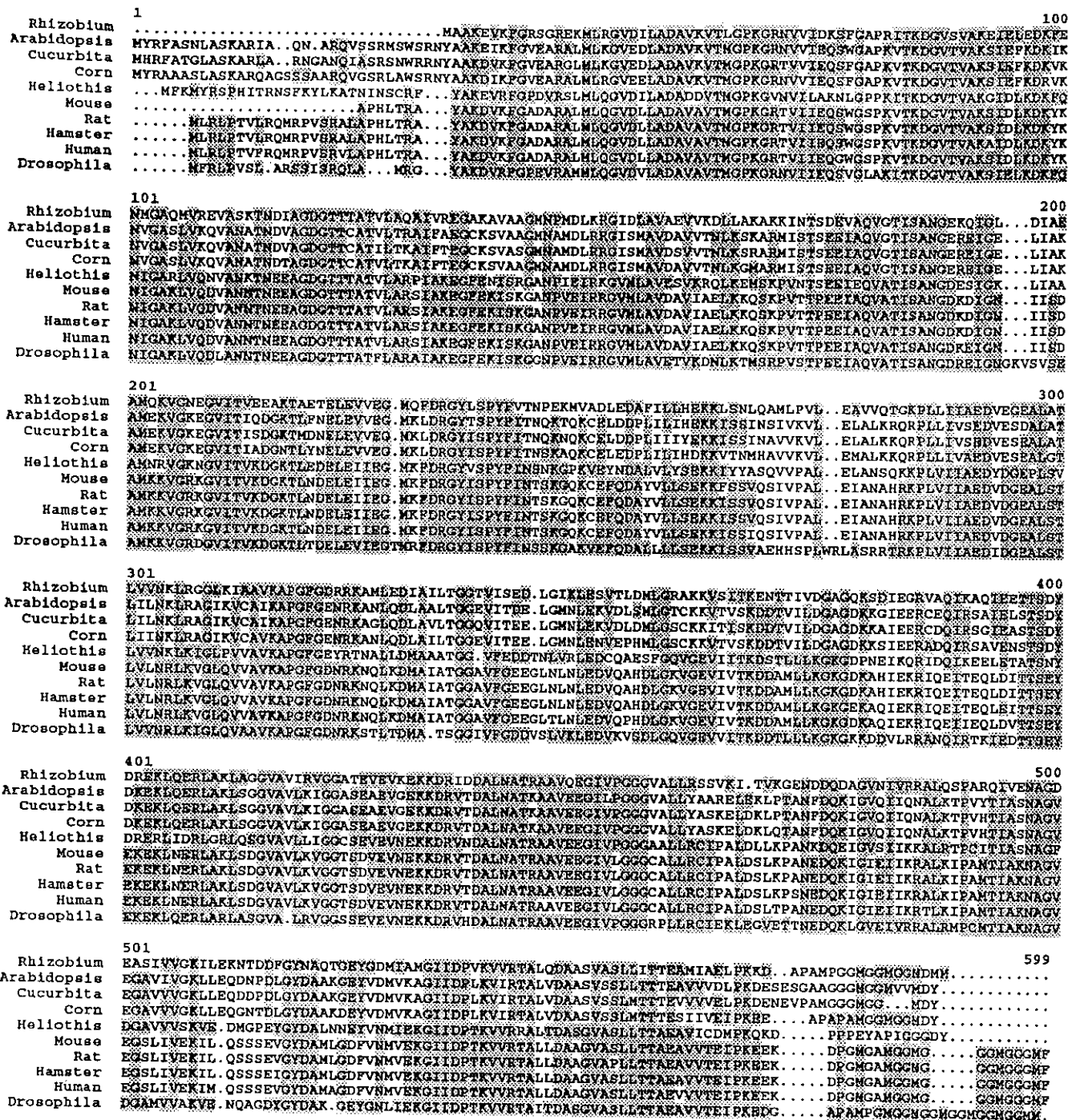


Fig. 3 Alignment of amino acid sequences for the *Drosophila* HSP60 protein and HSP60 proteins from other organisms. Only the representative HSP60 proteins from different species are shown in the figure. *Rhizobium* (Accession No: M94192; Rusanuanwa and Gupta 1993); *Arabidopsis* (Accession No: Z11547; Prasad and Stewart 1992); *Cucurbita*; (Accession No: X70867; Tsukeyi et al. 1992); *Heliothis* (Accession No: X56034; Miller et al. 1990); Corn (Accession No: L21006; Unpublished); mouse (Accession No: X53584; Venner and Gupta 1990); rat (Accession No: X54793; Peralta et al. 1990); hamster (Accession No: M22383; Picketts et al. 1989); human (Accession No: M34664; Venner and Gupta 1990). The nucleotide sequence of the cDNA clones BP5 3 and BP5 31 is deposited with the EMBL data bank, accession number X99311

120 s for 30 cycles. Reaction products were resolved in 1% agarose gel in TRIS-acetate running buffer (Sambrook et al. 1989).

Results

Phenotypic analysis of the embryonic lethal alleles of the *(1)10Ac* locus

Several lethal alleles of the *(1)10Ac* locus have been described (Bगतoy et al. 1986; Zhimulev et al. 1987; Lindley and Zimm 1992), however, no detailed phenotypic analysis of these mutants has been reported. Our initial

experiments showed that *l(1)10Ac^{F409}* and *l(1)10Ac^{F437}* homozygous mutant animals die during embryogenesis. We proved by genetic rescue that no other lethal mutations are present on the corresponding X chromosome (see below). In order to determine the effect of these mutations in *Drosophila* embryogenesis, DAPI staining of 0- to 24 h embryos of these alleles was performed. In both cases the same phenotype was observed (Fig. 1). The embryos die very early in development without any signs of gastrulation, they are very amorphous and the nuclei are distributed randomly in the embryo. This result shows that the product of the *l(1)10Ac* locus is essential from the early stages of fly embryogenesis.

Cloning and characterization of the *l(1)10Ac* locus in *D. melanogaster*

In previous work, several P-element-induced mutations in the *l(1)10Ac* locus have been mapped. These mutations are all localized in a 4.5-kb *XhoI* restriction fragment within a genomic clone 5D at position 270–274.5 of the reported physical map (Kozlova et al. 1994; T. Kozlova, unpublished work). This *XhoI* restriction fragment was used as a probe to isolate cDNA clones that may correspond to the *l(1)10Ac* locus. Several clones were identified from an ovarian cDNA library (Kozlova et al. 1994) and further characterized in this report. Figure 2 shows the physical map of the region that contains the *l(1)10Ac* locus in the genomic clone 5D. Several overlapping cDNA clones that were isolated encode for the same protein product. Many clones also hybridize to a 6.5-kb zone that includes the complete *XhoI* 4.5-kb fragment and the adjacent restriction bands (Fig. 2). The cDNA library used was made with random primers; the largest clone (BP5-3) is about 1.8 kb long. Sequence data analysis revealed that a region expected to be in the 3' end of the message was not present, indicating that the BP5-3 clone was not full length. In order to isolate new cDNAs containing the missing region, an embryonic cDNA library (0–24 h) was screened using the BP5-3 clone as a probe. A clone of about 2.0 kb that contains a complete coding sequence was isolated (clone BP5-31). The cDNA clones were sequenced and an open reading frame (ORF) of 576 amino acids was identified starting with a methionine at position 112 and ending with stop codon at the position 1840 (data not shown).

Computer analysis showed that the ORF present in the cDNA clones is homologous to chaperonin 60 from many different organisms (Fig. 3). The most closely related sequence is mouse mitochondrial HSP60 (72% of identity with the fly protein). The predicted protein product contains a putative signal peptide typical for proteins that are translocated to the mitochondrial matrix (Fig. 3), thus supporting the idea that it encodes the *D. melanogaster* mitochondrial HSP60 protein form. This signal peptide is clearly conserved between HSP60 proteins from animals (including *D. melanogaster*); it is divergent in plants and is not present in bacterial forms (Fig. 3).

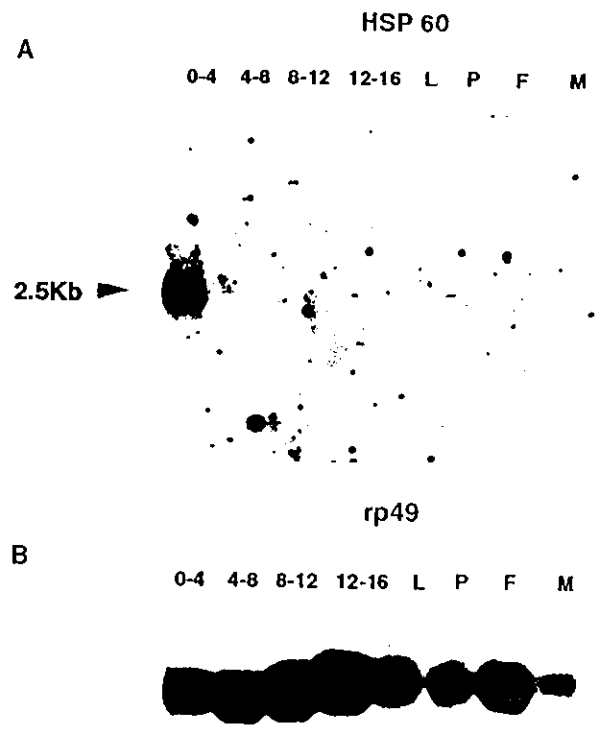


Fig. 4A, B Northern blot analysis of the *hsp60* transcript during fly development. **A** A single transcript of around 2.5 kb is detected in 0- to 4-h embryos. Each lane contains 15 μ g total RNA. The blots were hybridized with 1.8-kb *EcoRI* restriction fragment representing the complete insert in the BP5-3 cDNA clone. **B** The same blot was hybridized with *rp49* probe (O'Connell and Rosbash 1984) as a control. Total RNA was purified from embryos 0–4, 4–8, 8–12 and 12–16 h after egg-laying, as well as larvae (L), pupae (P), adult females (F) and males (M).

This is the first characterization of the *hsp60* homologous gene in *D. melanogaster* (localizing the *hsp60* gene in the position 10A4-5 on the X chromosome). Southern blot analysis using low stringency hybridizations indicates that there is only one copy of the *hsp60* gene in the fly genome (data not shown).

Distribution of the *hsp60* mRNA and protein during *D. melanogaster* development

Heat-shock response in *D. melanogaster* is manifested by the synthesis of a specific set of proteins and the appearance of heat-inducible puffs in salivary gland polytene chromosomes. Cytogenetically heat-shock-inducible puffs correspond to the positions 33B, 63C, 64F, 67B, 70A, 87A, 87C, 93D and 95D (reviewed in Ashburner and Bonner 1979). Since no heat-shock-inducible puffs have been identified in the 10A4-5 region of the X chromosome, and no clear induction of HSP60 is observed after heat shock in *Drosophila* culture cells (McKenzie and

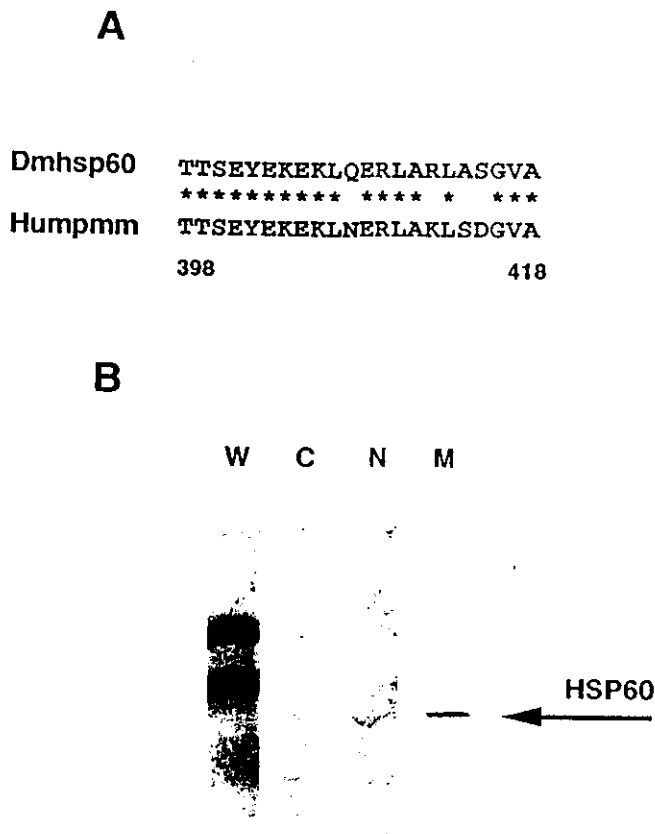


Fig. 5A, B Western blot analysis of HSP60 distribution in different subcellular fractions from *Drosophila* embryos. **A** A commercial monoclonal antibody was produced against a human HSP60 protein and recognizes an epitope present in HSP60 proteins from bacteria to humans. The equivalent sequence in the *D. melanogaster* HSP60 protein is shown. **B** Subcellular fractions were tested for the presence of the *Drosophila* HSP60 protein using this monoclonal antibody. The antibody recognizes a band of around 60 kDa enriched in the mitochondrial fraction. As positive control the same antibody was tested with the yeast HSP60 (not shown). (*W* molecular weight markers, *C* cytosolic fraction, *N* nuclear fraction and unbroken cells, *M* mitochondrial fraction)

Meselson 1977; Lindquist 1980; Lindquist and DiDomenico 1985), we thought it would be interesting to determine whether the *Drosophila hsp60* gene is expressed during fly development in normal conditions and whether it is induced by heat treatment. Developmental northern blot experiments were performed using total RNA prepared from different embryonic stages as well as third instar larvae, pupae and adults. A single message of around 2.5 kb was detected using an insert from BP5-3 cDNA clone as a probe. Unexpectedly, a difference in the amount of *hsp60* mRNA during development was found (Fig. 4). In 0- to 4 h embryos the amount of *hsp60* transcript is much more abundant (about thirty times) than in all other stages. In fact, only after long exposure is the transcript evident in other stages (data not shown). This result clearly shows a significant difference in the amount of *hsp60* mRNA during fly development. It also opens the question as to whether the differences in the amount of mRNA are relevant at the protein level and if there is a

differential distribution of the protein in various cell types. To address this problem, we took advantage of the existence of a commercial monoclonal antibody that recognizes an epitope present in many mitochondrial HSP60 proteins from different organisms. This epitope is also conserved in the *Drosophila* HSP60 protein (Fig. 5A). This antibody was tested against different embryonic (0–12 h) subcellular protein fractions in a western blot experiment. It specifically recognizes a band of around 60 kDa which is enriched in the mitochondrial fraction (Fig. 5B). Some signal is also detected in the nuclear fraction. At this point we do not know whether some HSP60 protein is localized in the nucleus or whether it is just the result of mitochondrial contamination in the nuclear fraction. It is clear, however, that the antibody specifically recognizes a *Drosophila* protein of the correct molecular weight that is located in the mitochondria.

This antibody was used in immunostaining experiments in whole-mount embryos and visualized in optical sections in a confocal microscope. Figure 6 shows a summary of the staining results. During fly embryogenesis many cell types are positively stained. However, it is clear that some cells contain greater amounts of HSP60 protein than others. In early embryos at the syncytial blastoderm stage there is a significant amount of staining all around the embryo (Fig. 6A). At the cellular blastoderm stage, the staining in the embryo has been dramatically reduced. No signal is detected in the yolk and cells are preferentially stained in the basal region. The amount of HSP60 in the pole cells, however, is higher than in the rest of the embryo (Fig. 6B). The high amount of HSP60 protein in the posterior part of the embryo could be either of maternal origin or due to de novo expression. At the beginning of germ band elongation (Fig. 6C), the staining is more homogeneous but some cells in the embryo have a stronger signal (cells of the cephalic furrow and mesodermal cells). In stages 11–14 (Fig. 6D) the amnioserosa cells are particularly rich in HSP60 protein.

Although the HSP60 protein is present in many cell types during fly embryogenesis, our results show that some cells have more HSP60 protein than others and that the quantity and distribution of DmHSP60 protein during fly embryogenesis is dynamic.

The levels of *hsp60* mRNA and protein were not significantly increased after heat treatment of embryos, when assayed by northern and western blot experiments (data not shown). This result may explain why no heat-shock-inducible puffs are observed in the 10A4-5 region on the X chromosome and why the HSP60 protein is not observed in *Drosophila* culture cells after heat shock (McKenzie and Meselson 1977).

A genomic DNA fragment containing the *hsp60* transcription unit rescues the lethal phenotype of mutants in the *l(1)10Ac* locus

Molecular characterization of the *l(1)10Ac* locus in the 10A4-5 region on the X chromosome allowed us to identify a gene homologous to *hsp60* from other organisms.

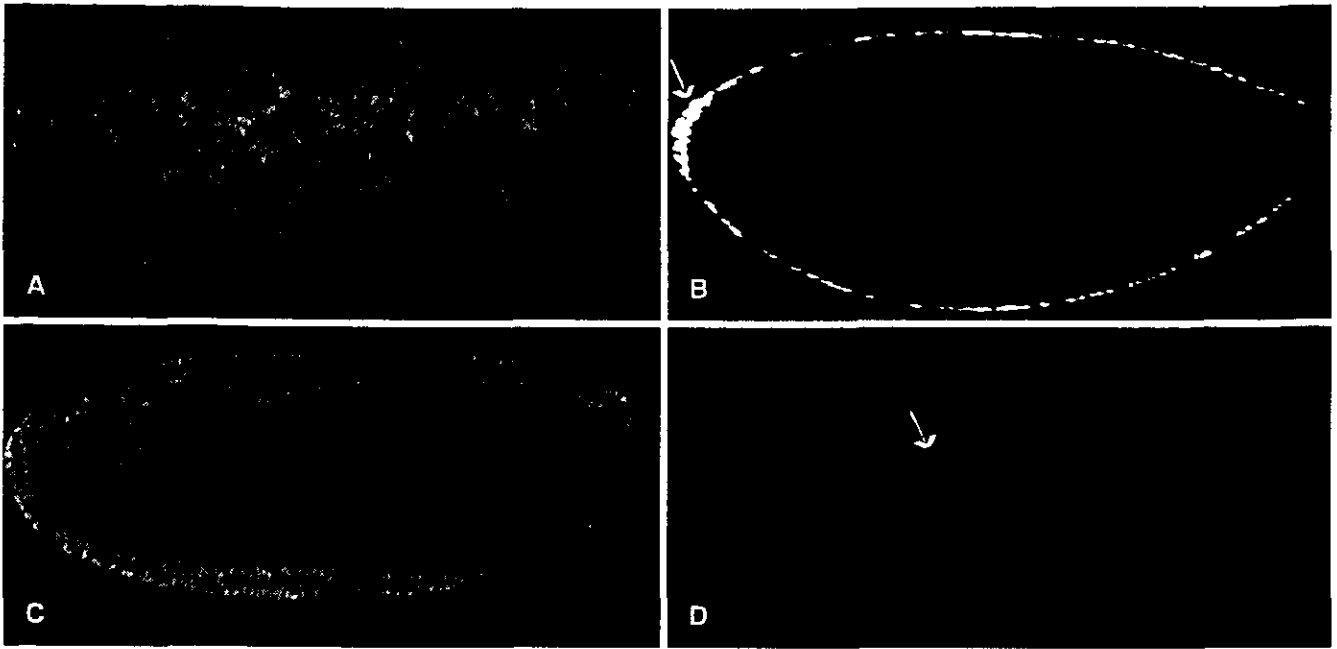


Fig. 6A–D HSP60 protein distribution in *Drosophila* embryos. **A** Syncytial blastoderm embryo; **B** cellular blastoderm embryo, stage 5; **C** stage 6 embryo; **D** stage 11 embryo. The *arrows* indicate the regions where the HSP60 protein is enriched (see the text for details)

However, it was important to demonstrate that this particular locus indeed encodes for the protein described in this work. Many alleles reported for the *l(1)10Ac* locus are lethal when homozygous, some during embryogenesis and others during larval and pupal development. Conditional and hypomorphic mutations have also been reported (Zhimulev et al. 1987; Lindsley and Zimm 1992). In order to determine if the genomic region containing the *Drosophila* *hsp60* transcription unit is able to rescue alleles of *l(1)10Ac* locus, transgenic lines that contain a 15-kb *SalI-SalI* fragment in which the entire *hsp60* coding region is present were generated. The position of the transcriptional unit for the *hsp60* gene in the *SalI-SalI* fragment is indicated in Fig. 2. It is important to mention that no other transcripts were detected in northern blot experiments downstream of *hsp60* that could be present in this construct (unpublished data). The *l(1)10Ad* locus is the closest gene mapped proximally to *l(1)10Ac* (Kozlova et al. 1994). We have cloned cDNAs that correspond to this gene and we know that it is not present in the rescue construct (unpublished data).

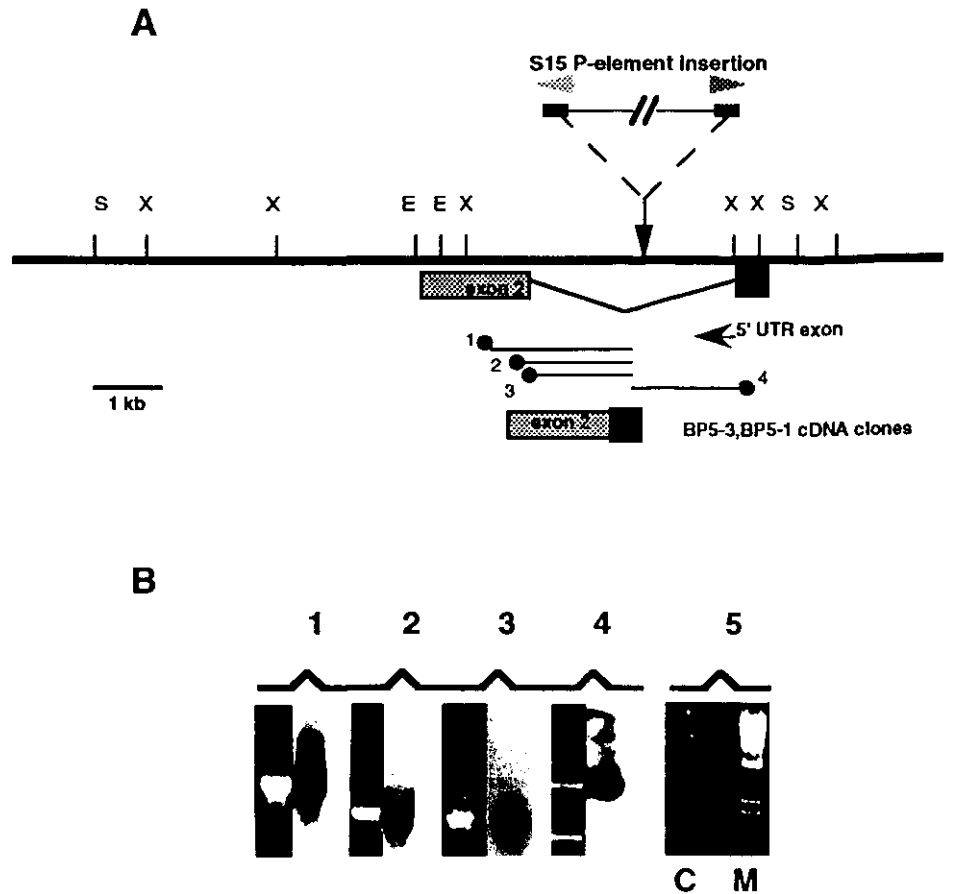
Transgenic flies *P[w+Dm_{hsp60}]* were crossed with two different embryonic-lethal alleles analysed phenotypically in this report (see Materials and methods for the description of rescue crosses). Genetic rescue has been achieved for both males and females homozygous for the lethal alleles of *l(1)10Ac* locus and heterozygous for the transgene construct. Homozygous *l(1)10Ac* flies in these crosses were recovered at expected numbers (Table 1). The rescued flies are viable and fertile; the *miniature* (small wings) and *forked* (defects in macrochaete) pheno-

Table 1 Rescue of the *l(1)10Ac* phenotype by a *hsp60* transgene.

The miniature (small wings) and forked (defects in macrochaete) phenotypes are used as markers in mutated X chromosome (Zhimulev et al. 1987). Similar results were obtained with the *l(1)10Ac l(1)437* allele

Males rescue	
♀	♂
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}{FM6}$	$\times \frac{w\ -; [P\ hsp60]}{[P\ hsp60]}$
Genotype	number of adults
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}{FM6} ; [P\ hsp60]$	50
$\frac{+}{FM6} ; [P\ hsp60]$	50
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}{FM6} ; [P\ hsp60]$	31
$\frac{+}{FM6} ; [P\ hsp60]$	39
Females rescue	
♀	♂
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}{FM6}$	$\times \frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f ; [P\ hsp60]}{[P\ hsp60]}$
Genotype	number of adults
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f ; [P\ hsp60]}{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}$	18
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}{FM6} ; [P\ hsp60] / \pm$	78
$\frac{l(1)10Ac\ l(1)409\ m\ f}{FM6} ; [P\ hsp60]$	17
$\frac{+}{FM6} ; [P\ hsp60] / \pm$	46

Fig. 7A, B Molecular analysis of the *S15* P-element-induced lethal allele and genomic organization of the *Drosophila Hsp60* gene. **A** Oligonucleotide primers deduced from the sequence of the BP5-3 and BP5-31 cDNA clones (shown as grey dots in the figure) used in combination with an inverted repeat primer from the P-element-produced specific PCR DNA fragments represented as 1, 2, 3 and 4. The position of the *S15* P-element insertion almost in the middle of the intron is indicated. **B** The PCR-generated fragments hybridized with the BP5-3 cDNA clone are shown. Panels 1, 2, 3 and 4 correspond to the extended DNA indicated in Fig. 7A. Panel 5 shows the control genomic DNA from wild-type flies and molecular weight markers



types used as markers on mutated X chromosome (Zhimulev et al. 1987) were evident in the rescued flies (data not shown). Therefore, it is clear that the 15-kb *SalI-SalI* genomic fragment containing the *hsp60* transcription unit is sufficient to rescue the lethality in *l(1)10Ac* locus.

Molecular analysis of the *l(1)10Ac S15* allele and genomic organization of the *hsp60* gene

Molecular analysis of one of the P-element-induced alleles was performed to confirm that mutations in the *l(1)10Ac* locus affect the *hsp60* transcription unit. Genomic DNA from the *S15* allele was the substrate in PCR reactions with different primers used to sequence the *hsp60* cDNA clones in combination with an inverted repeat P-element primer. Four of the *hsp60* primers produced specific PCR products in combination with the P-element primer (Fig. 7A). Similar reactions with control DNA did not produce any PCR product (Fig. 7B). The amplified DNA fragments were hybridized with the BP5-3 cDNA clone to prove that they contain sequences homologous to *Drosophila hsp60* (Fig. 7B). The size of the obtained PCR bands indicated the presence of an intron in the 5' region of the *Drosophila hsp60* gene and that the P-element is inserted in this intervening sequence. The amplified PCR products were sequenced around the P-element insertion site and intron/exon

boundaries were defined as well. From this analysis we determined the exact position of an intron of about 3 kb located just before the initiation codon (data not shown). These results as well as additional PCR mapping and sequencing (data not shown) indicate that the *hsp60* gene consists of two exons, one containing the 5' untranslated region (5'UTR) and a second containing the HSP60 coding sequence separated by a 3 kb intron (Fig. 7A). The analysis of the sequence of the intron DNA (600 bp around P-element insertion site) showed that no large ORF in the six possible frames is present (data not shown), confirming that the lethality of the *S15* allele is due to the lesion in the *hsp60* transcription unit.

Discussion

While characterizing the *l(1)10Ac* locus at the molecular level we have found that it encodes for a member of the HSP60 family of molecular chaperones. In spite of the fact that the chaperonin family has been the subject of particular attention due to the essential role of these proteins in mediating the folding of non-native proteins to their native state, this is the first report about a member of this family in *D. melanogaster*.

The HSP60 protein described in this work is unequivocally homologous to the mitochondrial HSP60 chaperones found in different organisms. The highest identity is

with mouse chaperonin. This protein also contains a signal peptide sequence that is required for the transport of proteins to the mitochondria that are synthesized in the cytoplasm, and is only present in HSP60 proteins from animal origin (reviewed in Gupta 1995). The *Drosophila hsp60* gene is located in the 10A4-5 division on the X chromosome. It is apparently a single copy gene since no other copies have been identified in genomic southern blot experiments.

No heat-shock-inducible puffs have been described previously in the 10A region in the X chromosome (reviewed in Ashburner and Bonner 1979). HSP60 protein is not detectable in *Drosophila* in vitro culture cells stimulated with heat shock (Lewis et al. 1975; McKenzie and Meselson 1977; Lindquist 1980). These results, combined with our own observations, suggest that the *Drosophila hsp60* gene is not heat-shock inducible or induced at low levels. This result is not uncommon, however, since there are more examples of *hsp60* genes that are only activated 2–3 times or less by heat shock (Parsell and Lindquist 1993).

The *hsp60* mRNA is much more abundant in total RNA preparations from 0- to 4-h embryos compared with all other stages analysed. In fact, the *hsp60* transcript can be detected only after a long exposure in other RNA preparations besides the 0- to 4-h embryonic sample. This indicates that the level of *hsp60* mRNA is differentially regulated during fly development. Zygotic gene transcription in *D. melanogaster* embryos starts after 80 min of development, just before the pole cells are formed (Foe et al. 1993). Since very few transcripts are observed in total female RNA preparations, it is plausible that the amount of RNA observed in northern blots is the result of zygotic transcription that occurs in the first hours of development rather than from maternal contribution. It is important to note that after 4 h development the amount of *hsp60* mRNA decreases dramatically. This suggests that after this time the requirements of the *Drosophila hsp60* function might be less than in early development. Alternatively it is feasible as well as in agreement with our findings that the protein produced during early embryogenesis is maintained and distributed differentially throughout the next embryonic stages. It has been shown that other HSPs are expressed in *Drosophila* embryogenesis suggesting that they function in normal development in addition to their participation in the classical heat-shock response (Hass et al. 1990). The dramatic effect of *l(1)10Ac* lethal alleles on early embryonic development presented in this work shows that zygotic expression of the *hsp60* gene is fundamental since the embryos are derived from heterozygous mothers. Unfortunately this phenotype makes the analysis of the *hsp60* gene expression in the homozygous mutant alleles difficult.

The amount of HSP60 protein is dynamic throughout fly embryogenesis. At this point we do not have a straightforward explanation for the different amount of HSP60 protein in various cell types. Some of the cells that have higher amounts of this protein (eg. pole cells, cells of the cephalic furrow; Fig. 6) are migrating or in

the process of movement. Not all the cells in movement, however, are particularly rich in HSP60 and therefore it is difficult to relate the abundance of HSP60 protein to developmental cell migration. It has been previously demonstrated that mitochondrial HSP60 is an essential protein for the correct function of some mitochondrial proteins (Cheng et al. 1990). It is possible that the functional mitochondrial requirements are not the same during development and that the different amounts of HSP60 in different cells are related to a particular metabolic stage of each cell type. Interestingly, it has been reported that a decrease in the synthesis of human mitochondrial HSP60 is the primary defect in mitochondrial encephalomyopathy syndrome (Huckriede and Agsteribbe 1994). This shows that defects in the function of this protein have a more dramatic effect in some tissues than others and furthermore, it suggests that HSP60 requirements are not the same for all cell types in humans. Clonal analysis of *hsp60* function in *Drosophila* development can be used to address this point in flies.

In the present work we established that the *l(1)10Ac* locus encodes for the *D. melanogaster* HSP60 protein. We performed genetic rescue experiments in which the embryonic-lethal phenotype associated with two *l(1)10Ac* alleles was rescued with a genomic fragment containing the *hsp60* transcription unit. Moreover, the reported P-element insertions that affect this locus were all localized in a 4.5-kb fragment which contains most of the *hsp60* transcription unit (Kozlova et al. 1994; T. Kozlova, unpublished work). One of these mutants (*S15*) was characterized in detail confirming that the P-element is inserted in an intron located in the 5' region of the *hsp60* gene. Our molecular analysis also shows that *Drosophila hsp60* gene consist of two exons and a large intron. The first exon contains the 5'UTR and the second exon contains the complete HSP60 coding region beginning with the translation initiation codon. *hsp60* functional gene in humans is intronless (there are many pseudo-genes in humans) and it is one of a few genes of this kind in vertebrates which might be related to its possible prokaryotic origin (Venner and Gupta 1990). In the case of *D. melanogaster*, however, the 5' untranslated region is separated from the rest of the gene by a 3-kb intron.

The genetic rescue experiments as well as *S15* allele molecular analysis confirm that *D. melanogaster hsp60* gene is encoded by the essential locus *l(1)10Ac*. The use of mutants that affect the *hsp60* gene in yeast has been relevant to the study of the function of this protein under varying physiological conditions. The genetics of the *l(1)10Ac* locus is very complex including interallelic complementation and the existence of both cold- and heat-sensitive alleles (Zhimulev et al. 1987; Lindsley and Zimm 1992; Pokholkova et al. 1991). The availability of various mutations in *Drosophila hsp60* gene might greatly facilitate genetic screens for interacting proteins such as putative HSP10 and opens the possibility for a detailed genetic analysis of the HSP60 functions in vivo.

Acknowledgements We thank Dr. Xavier Soberon, Dr. Paul Lizardi, Dr. Hilda Lomeli and Dr. Alejandra Covarrubias for critical comments on the manuscript. We are grateful to Virginia Barajas for her technical assistance and A.-M. Voie for the DNA injections. The authors are indebted to Dr. Martha Vazquez for discussions and advice and to I. Zhimulev's laboratory for the fly stocks. T.K. is grateful to Prof. F.C. Kafatos for the opportunity to perform some of the experiments in his laboratory. This work was funded by grants from PAPIIT/UNAM, CONACyT-2237P-N and a PEW Foundation fellow program to M. Zurita.

References

- Ashburner M (1989) *Drosophila* laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Ashburner M, Bonner JJ (1979) The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17: 241–254
- Bgatov AV, Pokholkova GV, Zhimulev IF (1986) Fine cytogenetical analysis of the band 10A1-2 and adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* X-chromosome IV: phenotypic expression of mutations located in the region 9F12-10A7. *Biol Zentralbl* 105: 384–405
- Birnie GD (1972) Subcellular components: Preparation and fractionation, 2a. University Park Press, Baltimore, MD
- Burnette WN (1981) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal Biochem* 112: 195–203
- Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Newport W, Hallber EM, Hallber RL, Horwich AL (1989) Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential in assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 337: 620–625
- Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL (1990) The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 348: 455–458
- Ellis JR (1994) Roles of molecular chaperones in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 4: 117–122
- Fernandes M, O'Brien T, Lis JT (1994) Structure and regulation of heat shock gene promoters. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp 375–393
- Foe VE, Odell GM, Edgar A (1993) Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In: Bate M, Martinez Arias A (eds) *The development of Drosophila melanogaster*, vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 149–300
- Gao Y, Thomas JO, Chow RL, Lee GH, Cown NJ (1992) A cytoplasmic chaperonin that catalyzes B-actin folding. *Cell* 69: 1043–1050
- Gupta RS (1995) Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of the eukaryotic cells. *Mol Biol Evol* 12:1063–1073
- Hass C, Klein U, Klotzel PM (1990) Developmental expression of *Drosophila melanogaster* small heat-shock proteins. *J Cell Sci* 96: 413–418
- Horwich AL, Willson KR (1993) Protein folding in the cell functions of two families of molecular chaperones hsp60 and TF55-TCP1. *Philos Trans R Soc London Ser B* 339: 313–325
- Huckriede A, Agsteribbe E (1994) Decreased synthesis and inefficient mitochondrial import of hsp60 in a patient with a mitochondrial encephalomyopathy. *Biochem Biophys Acta* 1227: 200–206
- Hutchinson EG, Tichelaar W, Hofhaus G, Weiss H, Leonard KR (1989) Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa*. *EMBO J* 8: 1485–1490
- Ishii N, Taguchi H, Sasabe H, Yoshida M (1994) Folding intermediate binds to the bottom of the bullet-shaped holo-chaperonin and is readily accessible to antibody. *J Mol Biol* 236: 691–696
- Kozlova T, Semeshin SV, Tretyakova IV, Kokoza EB, Pirrotta V, Grafodatskaya VE, Belyaeva ES, Zhimulev IF (1994) Molecular and cytogenetical characterization of the 10A1-2 band and adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* polytene X chromosome. *Genetics* 136: 1063–1073
- Laemmli EK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
- Langer T, Newport W (1994) Chaperonin mitochondrial biogenesis. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 53–83
- Lee JK, Coyne RS, Dubreuil RR, Branton D, Goldstein LSB (1993) Cell shape defects in a-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 123:1797–1809
- Lewis M, Helmsing PJ, Ashburner M (1975) Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3604–3608
- Lindquist S (1980) Translational efficiency of heat induced messages in *Drosophila melanogaster* cells. *J Mol Biol* 137: 151–158
- Lindquist S, DiDomenico A (1985) Coordinate and non coordinate gene expression during heat shock. A model for regulation in changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. In: Atkinson BG, Walder DB (eds) *Orlando Academic*, FL, pp 71–89
- Lindsley DL, Zimm GG (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego CA, USA
- Mande SC, Mehra V, Boom BR, Hol WGJ (1996) Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. *Science* 271: 203–207
- Martin J, Langer T, Botera R, Schramel A, Horwich AC (1991) Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a molten globule-like intermediate. *Nature* 352: 36–42
- McKenzie SL, Meselson M (1977) Translation in vitro of *Drosophila* heat-shock messages. *J Mol Biol* 117: 279–283
- McKenzie SL, Henikoff S, Meselson M (1975) Localization of RNA from heat induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1117–1121
- McMullin TW, Hallberg RC (1987) A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 7: 4414–4423
- Mendoza JA, Rogers E, Lonner GH, Horowitz DM (1991) Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanase. *J Biol Chem* 266: 13044–13049
- Miller SG, Leclerc RF, Erdos GW (1990) Identification and characterization of a testis-specific isoform of a chaperonin in a moth *Heliothis virescens*. *J Mol Biol* 214: 407–422
- O'Connell P, Rosbash M (1984) Sequence, structure, and codon preference of the *Drosophila* ribosomal protein 49 gene. *Nucleic Acids Res* 12: 5495–5513
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437–496
- Peralta D, Hartman DJ, McIntosh AM, Hoogenraad NJ, Hoj PB (1990) cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver prehsp60 (chaperonin-60). *Nucleic Acids Res* 18: 7162
- Picketts D, Mayanil CSK, Gupta RS (1989) Molecular cloning of a Chinese hamster mitochondrial protein related to the "chaperonin" family of bacterial and plant proteins. *J Biol Chem* 264: 12001–12008
- Pokholkova GV, Solovjeva IV, Belyaeva ES (1991) Lethal mutations of the X chromosome 9F12-10A7 region, induced by P-M hybrid disgenesis. *Drosophila Inf Serv* 70: 179–180
- Prasad TK, Stewart CR (1992) cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Mol Biol* 18: 873–885
- Robbins LG, Pimpinelli S (1994) Chromosome damage and early developmental arrest caused by the Rex element of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 138: 401–404

- Roseman AM, Chen S, White H, Braig K, Saibil HR (1996) The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* 87: 241-251
- Rusanguanwa E, Gupta RS (1993) Cloning and characterization of multiple groEL-chaperonin encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene* 126: 67-75
- Saibil HR, Zheng D, Roseman AM, Hunter AS, Watson GMF, Chen H, Ander SH, Maner SH, O'Har BP, Wood SP, Mann NH, Barnett LK, Ellis RJ (1993) ATP induces large quaternary rearrangements in a cage-like chaperonin structure. *Curr Biol* 3: 265-273
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5463-5467
- Santaren JF, VanDamme J, Puype M, Vandererckhove J, Garcia-Bellido A (1993) Identification of *Drosophila* wing imaginal discs proteins by two-dimensional gel analysis and microsequencing. *Exp Cell Res* 206: 220-226
- Seed B (1982) Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and diazonium-substituted supports. In: Setlow JK, Hollaender A (eds) *Genetic engineering: Principles and methods*, vol 4. Plenum Publishing, New York, p 91
- Thummel CS, Boulet AM, Lipshitz HD (1988) Vectors for *Drosophila* P element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* 74:445-456
- Tissiers A, Herschel KM, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398
- Tsukeyi R, Mori H, Nishimura M (1992) Purification, cDNA cloning and Northern blot analysis of mitochondrial chaperonin 60 from pumpkin cotyledons. *Eur J Biochem* 209: 453-458
- Ursic D, Ganetzky B (1988) A *Drosophila melanogaster* gene encodes a protein homologous to the mouse t complex polypeptide 1. *Gene* 68: 267-274
- Venner TJ, Gupta RS (1990) Nucleotide sequence of mouse HSP60 (chaperonin, GroEL homologue) cDNA. *Biochem Biophys Acta* 1087: 336-338
- Weissman JS, Kashi Y, Fanton W, Horwich AL (1994) GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding release of non-native forms. *Cell* 78: 693-702
- Wu C, Clos J, Giorgi G, Haroum RI, Kim S, Rabindran SK, Westwood JT, Wisniewski J, Yim G (1994) Structure and regulation of heat shock transcription factor. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 395-416
- Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H (1992) TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* 358: 245-248
- Zhimulev IF, Pokhokova GV, Bgatov AB, Umbetova GH, Solovjeva IV, Khudyakov Syu Balyaeva ES (1987) Fine cytogenetical analysis of the band 10A1-2 and adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* X chromosome V: Genetic characterization of loci in the 9E-10B region. *Biol Zentralbl* 106: 699-672

Molecular characterization of the 5' control region and of two lethal alleles affecting the *hsp60* gene in *Drosophila melanogaster*

L. Perezgasga^a, L. Segovia^b, M. Zurita^{a,*}

^aDepartamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^bDepartamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Received 11 June 1999

Abstract The chaperonins are evolutionarily conserved essential cellular proteins that help folding newly synthesized or translocated proteins, spending ATP. We present here the molecular analysis of the *hsp60* gene promoter region and of two *Drosophila hsp60* ethyl methane sulfonate embryonic lethal alleles that have an identical phenotype. No heat shock element sequences were found in the 5' region, supporting previous data (Kozlova, T. et al., 1997) which suggests that mitochondrial *Drosophila melanogaster* HSP60.1 is not heat inducible. By sequencing the lethal allele's entire open reading frame (ORF), we found a C-T transition in the *hsp60*^{F409} allele that produces a serine to leucine change, apparently distorting the protein equatorial domain structure. No changes were found in the *hsp60*^{G93} ORF. However, an analysis of the heterogeneous nuclear RNA levels showed a reduction of the *hsp60* transcript in *hsp60*^{G93} flies as compared to the wild-type. These data suggest that although the defects in the *hsp60* gene produced by these alleles are at different levels, both behave as null mutations.

© 1999 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Ethyl methane sulfonate embryonic lethal allele; *hsp60* gene; Chaperonin; *Drosophila melanogaster*

1. Introduction

The chaperonins exist in two distinct evolutionary versions [1,2]. The first family includes the bacterial and organelle chaperonins (mitochondria and chloroplasts), 60 kDa heat shock proteins. The second family, referred to as t-complex polypeptide 1 (Tc-1), includes the archaeal and eukaryotic chaperonins [3]. The chaperonins of the first family are cellular proteins composed of back to back rings (the *cis* and *trans* rings) of seven rotationally symmetric identical or closely related subunits (~60 kDa) which assist the folding of newly synthesized and newly translocated proteins and promote the refolding of denatured ones in an ATP-dependent reaction [4]. Each of the 14 subunits is formed by three domains: the apical domain, which interacts with the co-chaperonin, the intermediate or hinge domain and the equatorial domain which is a relatively fixed base housing the ATP binding site [5]. The typical representative of this group is *Escherichia coli*

GroEL which forms a complex with GroES and is thought to promote productive folding in two major states. In the binding active state, the central cavity of each GroEL ring is open at the end of the cylinder for the ingress of the non-native polypeptides in the *cis* ring [6,7], exposing a hydrophobic lining that seems to bind non-native species through exposed hydrophobic surfaces [8,9]. In the active folding state, binding of the co-chaperonin GroES to the *cis* ring of GroEL in the presence of ATP provokes conformational changes, triggering the folding of the substrate protein in the central channel which is now hydrophilic in character, thus favoring the burial of hydrophobic surfaces in the substrate protein [5]. The hydrolysis of ATP in the *cis* ring weakens GroEL-GroES interaction, priming GroES release while polypeptide folding continues. Binding of ATP to the *trans* ring evicts GroES and the polypeptide from the *cis* ring ($t = \sim 15$ s). This negative allosteric mechanism suggests a model for an ATP-driven folding cycle that requires a double toroid [4,5,10].

In contrast to GroEL, the mammalian mitochondrial HSP60 exists as a single ring [11,12]. This HSP60 with its cognate co-chaperonin HSP10 shows productive folding *in vivo* due to the low affinity of HSP60₇:ADP₇ for HSP10, that eliminates the requirement for ATP binding to a *trans* ring in order to release the co-chaperonin [12].

In a recent work [13], we characterized the first *Drosophila hsp60* homologue. *Drosophila melanogaster* HSP60.1 (DmHSP60) is enriched in the mitochondrial fraction and is most closely related to the mouse mitochondrial HSP60 (72% identity across the entire protein sequence).

We analyze here the *hsp60* promoter region and determine the exact transcription start site, as well as the TATA box, a putative CAAT box and an Oct-1 site. Nevertheless, we do not find functional binding sites for heat shock factor, confirming our previous data [13] that neither the transcript nor the protein are heat inducible. We also present the molecular characterization of two ethyl methane sulfonate embryonic lethal alleles of the *hsp60* gene that have been described previously [14,15]. The molecular analysis of the *hsp60*^{F409} allele shows a C to T transition that produces an evolutionarily conserved serine change to leucine in amino acid 154. The modelling of this mutation suggests that it distorts the equatorial domain structure where the catalytic site is located and, by consequence, affects the folding of the protein substrate. In the case of the *hsp60*^{G93}, we do not find any change in the open reading frame (ORF). Nevertheless, in heterozygous *hsp60*^{G93} flies, we observe a reduction of the *hsp60* heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) transcript in comparison with wild-type flies. This suggests that this mutation produces a defect in the transcription or early processing of the mRNA.

*Corresponding author. Fax: (527) (3) 17-23-88.
E-mail: marioz@ibt.unam.mx

Abbreviations: PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; hnRNA, heterogeneous nuclear RNA; ORF, open reading frame; DmHSP60, *Drosophila melanogaster* HSP60.1

2. Materials and methods

2.1. Fly strains

The wild-type stock was OreR. The *hsp60*^{F409} and *hsp60*^{G93} alleles were maintained in the presence of the FM6 balancer [15,16]. Flies were reared on standard yeast dextrose medium at 25°C.

2.2. DNA manipulations and polymerase chain reaction (PCR) of the *hsp60*^{F409} and *hsp60*^{G93} alleles

Genomic DNA was independently purified from three different heterozygous females of both alleles and a wild-type female [17] and used as a template in PCR reactions with primers that flank the *hsp60* ORF. Amplification reactions were carried out in a Perkin Elmer 2400 thermal cycler with the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim), according to the manufacturer's protocol in a 50 µl volume at an annealing temperature of 58°C.

2.3. DNA sequencing

DNA sequencing reactions of the amplified fragment of both alleles or of the 15 kb *Sall* genomic DNA fragment cloned in the CaSpeR AUG transformation vector [13] were performed using the Thermo Sequenase radiolabelled terminator cycle sequencing kit (Amersham Life Science) in a Perkin Elmer 2400 thermal cycler according to the supplier's instructions for 45 cycles with primers used to sequence the *hsp60* cDNA clones [13].

2.4. High resolution of the transcription start point

Primer extension analysis was done according to Sambrook [18]. End-labelled BP5-5'r1, complementary to nucleotides +102–+124 on the sequence shown in Fig. 1C, was used as primer in the extension reaction. The extension reactions were performed using total cellular RNA from 0–4 h fly embryos and the products were resolved on a 7% denaturing polyacrylamide gel using the corresponding sequencing ladder as a size marker. We used the same RNA treated with RNase A before the extension reaction as a control (data not shown).

2.5. Computer modeling of the *hsp60*^{F409} allele and wild-type *Drosophila* HSP60 proteins

The DmHSP60 wild-type and mutant sequences were modeled on top of the *E. coli* GroEL structure [5]. The resulting models were minimized with the cvff force field using the Discover program. Figures were produced using the MolMol visualization program and rendered with PovRay 3.0 (tm) [19,20].

2.6. hnRNA reverse transcriptase (RT-) PCR analysis of the *hsp60*^{G93} allele

hnRNA was purified from *hsp60*^{G93}/FM6 and wild-type females' nuclei and used to synthesize cDNA in a 20 µl reaction containing 1× first strand buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, pH 8.3), 10 mM DTT, 200 U of M-MLV reverse transcriptase (GIBCO-BRL), 200 µM dNTPs, 2 mM oligo dT₁₅ and 20 U RNase inhibitor (Amersham Life Science). The mix was initially incubated at 65°C for 5 min before adding the DTT and the enzyme. It was then further incubated at 38°C for 1 h. 3 µl was used for the PCR reaction in 1×Taq buffer (100 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 200 µM dNTPs, 0.5 mM of each specific oligo and 1.5 U Taq polymerase (Boehringer Mannheim). All PCR reactions were done in a Perkin Elmer 2400 thermal cycler machine. Reactions were incubated at 95°C for 5 min, 58°C for 40 s before adding Taq polymerase and the reactions were then incubated at 72°C for 1 min for one cycle. Afterwards, samples were held at 94°C for 30 s, 58°C for 40 s and 72°C for 1 min, for 32 cycles. As an internal control, we amplified *rp49* transcript. Reaction products were resolved in a 2% agarose gel in Tris-borate running buffer. After transferring to a nylon membrane, the PCR products were hybridized against BP5-3 and *rp49* cDNA clones [18,13].

2.7. Protein analysis

hsp60^{F409}/FM6 and *hsp60*^{G93}/FM6 and wild-type females were gently homogenized with 20 strokes in a dounce homogenator in the presence of homogenization buffer [21]. The protein concentration of the whole extracts was normalized with the Bradford assay. Proteins were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel [22] and then blotted onto a nitrocellulose membrane for immunostaining [23] with the ECL Western blotting

protocols (Amersham Life Science) with a 1:1000 dilution of the anti-HSP60 antibody (StressGen), followed by anti-rabbit Ig horseradish peroxidase secondary antibody (Amersham Life Science).

3. Results

3.1. Genomic organization of the *Dm**hsp60* gene and characterization of the promoter region

From the analysis of the *hsp60* S15 allele, we found an intron of about 3 kb located just before the initiation codon [13]. By sequencing genomic DNA from *hsp60*^{F409}/FM6 and *hsp60*^{G93}/FM6 alleles with primers used to sequence cDNA clones, we found another small intron of 64 bp in the 3' region of the ORF. These results show that the *hsp60* gene consists of three exons, the first contains the 5' untranslated region (5' UTR) separated from the second exon (which has most of the *hsp60* coding sequence) by a 3 kb intron and the last exon that contains the rest of the *hsp60* coding sequence, interrupted by the 64 bp intron, as well as the 3' UTR (Fig. 1A).

In order to characterize the 5' control region of the *Dm**hsp60* gene, we used the 15 kb *Sall* genomic DNA fragment cloned in the CaSpeR vector as a template to sequence the *hsp60* promoter region [13]. High resolution primer extension experiments were carried out to define the exact *hsp60* gene transcription start site. The RNA *hsp60* start site (Fig. 1B) was identified using a primer located at nucleotide +102, indicated in Fig. 1C, that produces an extension product of 102 nucleotides. The 5' control region was then analyzed with the Findpatterns program of the GCG Wisconsin software and the TESS program [24]. We identified a TATA box at -37 bp, a putative CAAT box at -139 bp and a putative Oct-1 site at -225 bp from the transcription start site (Fig. 1C). We did not find any heat shock elements with either of these programs. This supports our previous data [13] that showed that the *hsp60* transcript nor the protein are heat inducible.

3.2. Molecular analysis of the *hsp60*^{F409} and *hsp60*^{G93} alleles

Homozygous *hsp60*^{F409} flies die very early during embryogenesis with no signs of gastrulation. This indicates that the product of the *hsp60* gene is essential for the early stages of fly embryogenesis [13] (Fig. 2). Unfortunately, this phenotype makes working with homozygous embryos very difficult, so all the analyses reported in this work were carried out with heterozygous adult females. We sequenced the entire ORF of three different heterozygous and wild-type females. We found a C to T transition that produces a serine to leucine change in amino acid 154 of the mutant DmHSP60 protein. Serine-154 is a highly conserved amino acid located between α -helices E and F of the reported GroEL structure [5]. We performed a homology modelling of the DmHSP60 wild-type and DmHSP60^{F409} putative structure proteins on the *E. coli* structure to determine if the serine to leucine change produces an important modification in the protein structure (Fig. 2A). In the model, we could see that the equatorial domain of the mutated protein (where the catalytic site is located) is distorted with respect to the wild-type DmHSP60. This distortion would increase the modelled AMP bonding distances with its nearest amino acids (Fig. 2B).

As in the *hsp60*^{F409} flies, *hsp60*^{G93} homozygous mutant animals die early in embryogenesis [15], embryos are amorphous

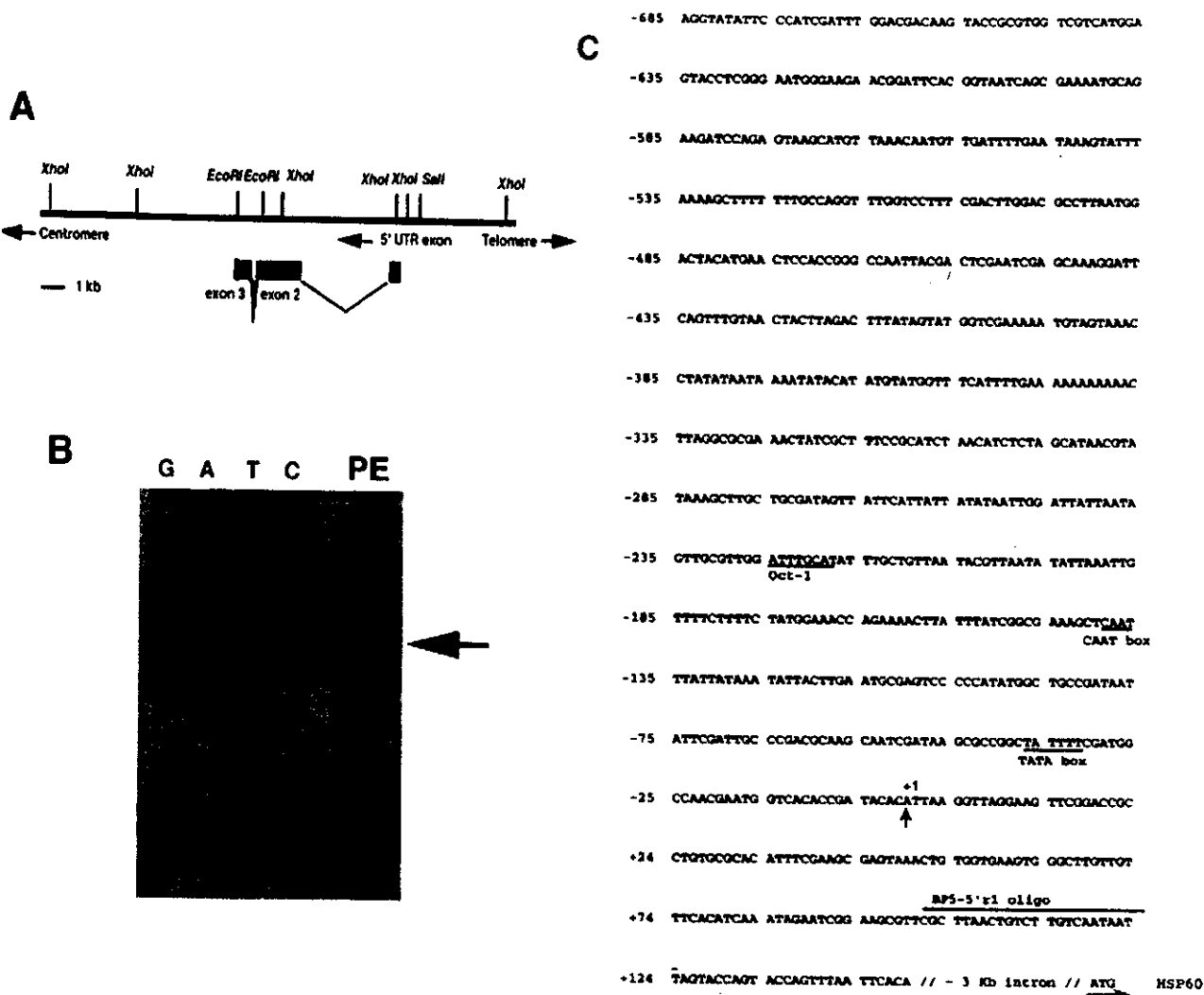


Fig. 1. Genomic organization of the *D. melanogaster hsp60* gene and characterization of its 5' control region. (A) Oligonucleotide primers deduced from the sequence of the *hsp60* cDNA clones were used to sequence genomic DNA from *hsp60*FM6 females. Black boxes represent the 5' and 3' UTRs, while shaded areas correspond to the *hsp60* coding region. (B) Primer extension analysis. Total RNA from 0–4 h embryos was hybridized with 32 P-labelled oligonucleotide BP5-5'r1 and incubated with reverse transcriptase to produce cDNA extensions. The products were separated on a 7% polyacrylamide sequencing gel using a sequence reaction of the 15 kb *SalI* genomic DNA fragment cloned in the CaSpeR AUG transformation vector [13], primed with the same oligonucleotide as the molecular mass marker. Lane PE shows the cDNA extension product. (C) Sequence of the *hsp60* promoter region. Using the 15 kb *SalI* genomic DNA cloned in the CaSpeR vector as template, we used specific oligonucleotides to sequence the promoter region of the *Dm**hsp60* gene and using the Findpatterns program of the GCG Wisconsin software and the TESS program [22], we identified a TATA box at –37 bp of the transcription start site (indicated in the figure with an arrow), as well as a putative CAAT box at –129 bp and a putative Oct-1 site at –215 bp from the transcription start site. We did not find any heat shock element sequence with neither of these programs.

and their nuclei are distributed randomly (data not shown). The *hsp60*^{G93} sequence did not show any change in the ORF. Therefore, this mutation should not be affecting the protein itself but either the mRNA production or its stability. In order to answer this question, we performed a RT-PCR of poly A⁺ RNA from heterozygous and wild-type females. We did not observe an input difference between the heterozygous and wild-type flies. However, if we used hnRNA in a similar experiment, a clear reduction of the *hsp60* transcript in the mutant *hsp60*^{G93}/FM6 females is found, compared to the wild-type ones. This difference was not seen in the *rp49* transcript, used as internal control. In agreement with the poly A⁺ RNA RT-PCR experiment performed with the *hsp60*^{G93}/FM6 allele,

we detected no difference in the protein quantity between both alleles and the wild-type strain in Western blot experiments (Fig. 3). This result indicates that, although a defect in the transcription or early processing of the *hsp60* mRNA seems to be the cause of the early death of *hsp60*^{G93} homozygous animals, heterozygous females can compensate for the lack of part of the *hsp60* transcript, accumulating the processed transcript to accomplish the required level of protein.

4. Discussion

We have previously described the *Drosophila hsp60* homologue [13]. During this characterization, we found that both

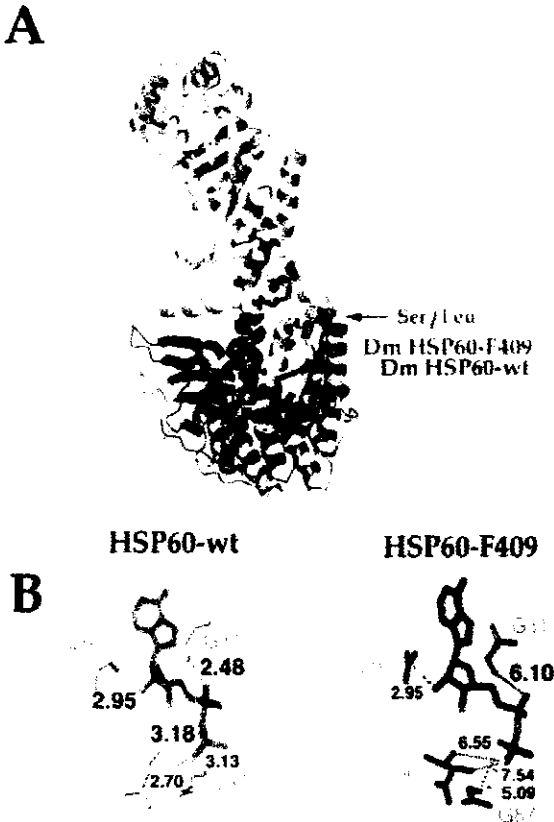


Fig. 2. Computer model of the HSP60 protein from the *hsp60*^{F409} allele. (A) The DmHSP60 wild-type and mutant sequences were modeled on top of the *E. coli* GroEL structure. The resulting model was minimized with the *cvff* force field using the Discover program. The figure was prepared with MolMol and Povray. DmHSP60 wild-type = red; DmHSP60^{F409} = blue. The arrow indicates the position of the amino acid change. The yellow color shows the increased volume of the leucine compared to serine. (B) Wild-type and mutant DmHSP60 structures were superposed on top of an *E. coli* GroEL subunit to model Mg-ADP binding. Mg-ADP hydrogen bonding was calculated using Ligplot. Figures were prepared with MolMol and Povray. Note the differences between the wild-type (A) and the mutant (B) active site, in the hydrogen bonding distances of the AMP molecule and the amino acids directly joined to it.

of embryonic lethal alleles from *D. melanogaster* is different (one probably affecting the protein structure and the other the amount of mRNA), the homozygous embryos of both alleles have identical phenotypes.

The *hsp60*^{F409} allele presents a C to T transition that changes serine-154 to leucine that could promote a distortion in the equatorial domain structure. Heterozygous flies can survive and look like wild-type, suggesting that the *hsp60*^{F409} mutant protein would not be toxic for the HSP60 function.

We did not observe any point mutation in the *hsp60* gene sequence of the *hsp60*^{G93} allele. We did not sequence the 5' or 3' UTRs, looking for mutations that could cause the lethality of this allele, due to the fact that these regions tend to be polymorphic.

The hnRNA RT-PCR analysis of the *hsp60*^{G93}/FM6 flies showed a clear reduction in the levels of the *hsp60* transcript compared to the wild-type flies. This difference was not observed in the *rp49* transcript. However, the poly A⁺ RT-PCR and Western blot experiments showed no differences between heterozygous and wild-type flies. This suggests that in heterozygous flies, *hsp60* RNA accumulates, which alleviates the lack of some of the *hsp60* transcript. Together, these results indicate that the lethality of homozygous *hsp60*^{G93} animals could be in the lack of the *hsp60* transcript and, by conse-

the gene and the protein are not heat shock inducible (unpublished results). By the analysis of the *hsp60* promoter region, we did not find any functional binding sites for heat shock factor in the 685 bp sequence upstream of the transcription initiation point, which confirms our previous data. Nevertheless, we could identify the TATA box at -37 bp, a putative CAAT box at -139 bp and a putative Oct-1 site at -225 bp from the transcription start site. Even if the molecular nature

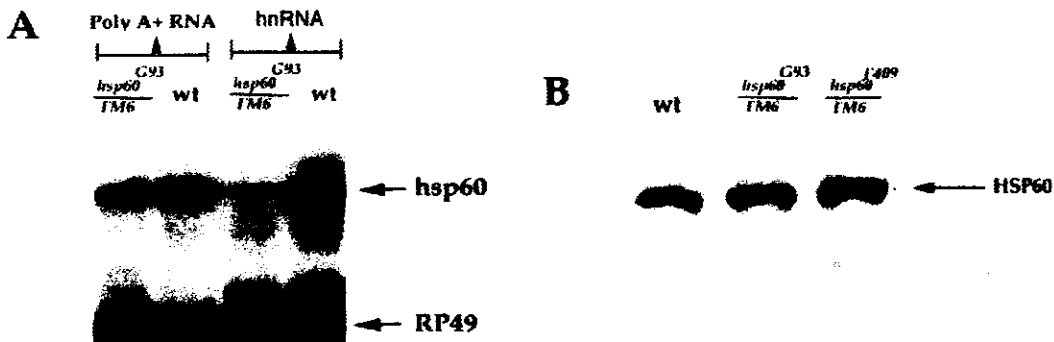


Fig. 3. Molecular analysis of the *hsp60*^{G93} allele. (A) Southern blot of the RT-PCR of poly A⁺ RNA and hnRNA from heterozygous and wild-type females was performed using specific *hsp60* primers. The blot was hybridized with a 1.8 kb *EcoRI* restriction fragment representing the complete insert of the BP5-3 cDNA clone and with a 650 bp *EcoRI*-*HindIII* restriction fragment of the *rp49* cDNA. Lanes indicated as poly A⁺ RNA are the amplification products of the *hsp60* and *rp49* transcripts using poly A⁺ RNA from mutants and wild-type flies, respectively. Lanes indicated as hnRNA represent the same amplification products with hnRNA from *hsp60*^{G93} and wild-type flies. There is no difference in the poly A⁺ RNA level between wild-type and mutant females in the *hsp60* nor *rp49* transcripts. Nevertheless, there is a clear reduction in the hnRNA levels of the mutant *hsp60* transcript and the wild-type one. (B) Western blot analysis of whole extracts from wild-type (lane 1), *hsp60*^{F409}/FM6 (lane 2) and *hsp60*^{G93}/FM6 (lane 3) flies immunostained with an anti-HSP60 antibody (StressGen) showed no important differences in the HSP60 levels between the heterozygous and wild-type flies.

quence, of the HSP60 protein. In summary, both mutations can be considered null, one affecting the *hsp60* RNA production and the other producing a non-functional protein.

Acknowledgements: The authors are indebted to Martha Vázquez for discussions and advice. The present work was supported by PADEP-UNAM number 005343 and PAPIIT/UNAM program. Grant number IN200696.

References

- [1] Hartl, F.U., Hlodan, R. and Langer, T. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 20–25.
- [2] Hartl, F.U. (1996) *Nature* 381, 571–580.
- [3] Gupta, R.S. (1995) *Mol. Microbiol.* 15, 1–11.
- [4] Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) *Cell* 92, 351–366.
- [5] Xu, Z., Horwich, A.L. and Sigler, P.B. (1997) *Nature* 388, 741–750.
- [6] Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. and Hartl, F.U. (1992) *EMBO J.* 11, 4757–4765.
- [7] Braig, K., Simon, M., Furuya, F., Hainfeld, J.F. and Horwich, A.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3978–3982.
- [8] Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. and Sigler, P.B. (1994) *Nature* 371, 578–586.
- [9] Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K. and Horwich, A.L. (1994) *Nature* 371, 614–619.
- [10] Sigler, P.B., Xu, Z., Rye, H.S., Burston, S.G., Fenton, W.A. and Horwich, A.L. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 581–608.
- [11] Viitanen, P.V., Lorimer, G.H., Seetharam, R., Gupta, R.S., Oppenheim, J., Thomas, J.O. and Cowan, N.J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 695–698.
- [12] Nielsen, K.L. and Cowan, N.J. (1988) *Mol. Cell* 2, 93–99.
- [13] Kozlova, T., Perezgasga, L., Reynaud, E. and Zurita, M. (1997) *Dev. Genes Evol.* 207, 253–263.
- [14] Bgatov, A.V., Pokholkova, G.V. and Zhimulev, I.F. (1986) *Biol. Zent.bl.* 105, 384–405.
- [15] Zhimulev, I.F., Pokholkova, G.V., Bgatov, A.V., Umbetova, G.H., Solovjeva, I.V., Khudyakov, Yu.E. and Belyaeva, E.S. (1987) *Biol. Zent.bl.* 106, 699–720.
- [16] Lindsley, D.L. and Zimm, G.G. (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego, CA.
- [17] Ashburner, M. (1989) *Drosophila. A Laboratory Manual*, pp. 108–109. Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- [18] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- [19] Merritt, Ethan A. and Bacon, David J. (1997) *Methods Enzymol.* 277, 505–524.
- [20] Koradi, R., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.* 14, 51–55.
- [21] Birnie, G.D. (1972) *Subcellular Components: Preparation and Fractionation*, University park press, Baltimore, MD.
- [22] Laemmli, E.K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- [23] Burnette, W.N. (1981) *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- [24] Schug, J. and Overton, G.C. (1997) Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v 0.0 of the Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania, PA.