

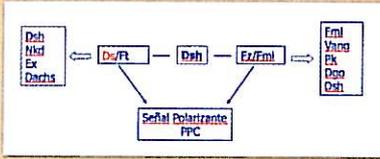
La caracterización molecular de diferentes alelos *dachsous* indica una función esencial de la región citoplasmática en todos los procesos en que participa.

Laura Varas (1), Eva Revilla (1), Javier Sierra (2) e Isabel Rodríguez (1).

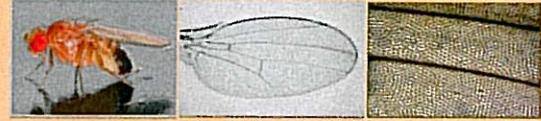
(1) Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Madrid. (2) Departamento de Biotecnología, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid.

INTRODUCCION

La Polaridad Planar Celular (PPC) es un proceso conservado evolutivamente que consiste en la polarización de los tejidos generando dominios de señal polarizante a través de dos vías independientes: Dachsous/Fat (Dv/Ft) y Fz/Fm mediante un mecanismo poco conocido hasta la fecha.



El ala de *Drosophila* es uno de los modelos de referencia para el estudio de PPC por ser un tejido altamente polarizado. La eliminación de las proteínas de PPC causa defectos observables como la orientación de los tricomas y los órganos sensoriales.



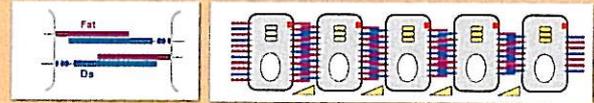
Dachsous es una cadenera atípica que se localiza en la región apical de la célula con una distribución espacial restringida. Esta constituida por un péptido señal, una región extracelular con 27 dominios cadarina y una pequeña región citoplasmática conectada por un dominio transmembrana.



Los alelos mutantes *dachsous* en combinaciones homocigóticas o en trans producen alteraciones en la proliferación celular, la orientación de los tricomas y en la formación de las estructuras en el eje próximo-distal.



El modelo de acción actual propone que Dachsous y Fat contribuyen a la polarización del tejido mediante la interacción heterofílica de la región extracelular entre proteínas situadas en células adyacentes generando un gradiente de polarización a través de unas proteínas "efectoras" desconocidas.

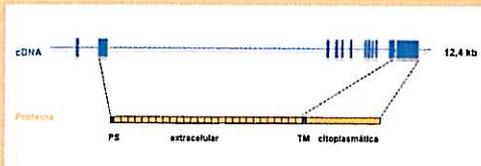


RESULTADOS

1

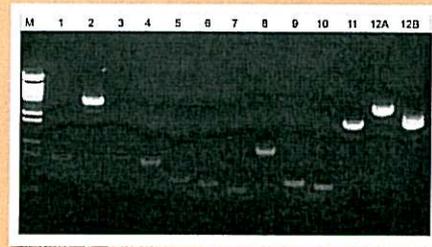
El alineamiento entre el cDNA de *dachsous* y la región genómica muestra la existencia de 12 exones distribuidos a lo largo de 75,0 Mb. El tamaño de los exones varía entre 0,3 y 4,2 kb. De los 11 intrones, 7 exones son de aproximadamente 0,2 kb, 3 intrones entre 1-6 kb y el intron 2 ocupa 48 kb.

La región citoplasmática ocupa 1,4 kb del exon 12.



2

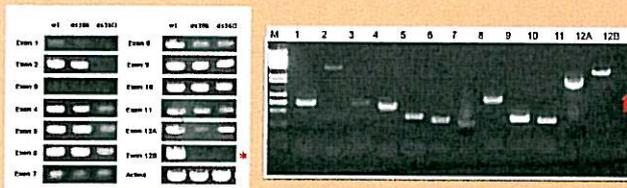
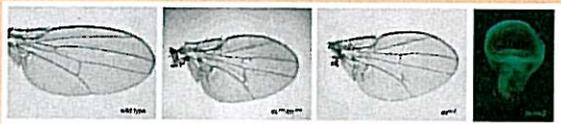
El análisis de expresión de exones mediante RT-PCR semi-cuantitativa muestra niveles de expresión variable para cada uno sugiriendo diferentes isoformas de RNA ds compuestas por diferentes combinaciones de exones. Un análisis de expresión por Northern blot confirma la existencia de hasta 6 diferentes isoformas de RNA en tejido procedente de discos imaginales y cerebro.



3

Analizamos la expresión de los exones en los tres alelos mutantes más frecuentemente utilizados en análisis genético de la función de Dachsous:

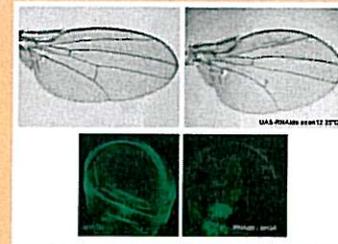
- *ds^{28k}* espontánea desconocida.
- *ds^{lacZ}* un elemento P que mapeamos en el Intron 2.
- *ds^{12D}* obtenido por excisión imprecisa del elemento P y letal.



En los 3 alelos mutantes los exones extracelulares están presentes mayoritariamente mientras que en todos los casos el exon 12 que contiene el dominio citoplasmático es eliminado

4

Para confirmar la importancia de la región citoplasmática en las 3 funciones que desempeña Dachsous durante el desarrollo sobreexpresamos un RNAi ds que elimina las isoformas que contienen la región citoplasmática y reproduce los fenotipos de los alelos *ds*.



La región citoplasmática de la proteína Dachsous es esencial para la función de Dachsous durante el desarrollo.