

DETERMINACIÓN SEXUAL Y COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA EN *DROSOPHILA*, *CAENORHABDITIS* Y MAMÍFEROS: ASPECTOS COMPARATIVOS

Lucas Sánchez

Centro de Investigaciones Biológicas

La determinación sexual es un proceso de desarrollo que da lugar a hembras y machos, los cuales son distintos desde el punto de vista morfológico, fisiológico y de conducta. En los organismos cuya determinación sexual se basa en diferencias cromosómicas, un sexo siendo homomórfico y el otro heteromórfico para los cromosomas sexuales, se ha desarrollado un proceso por medio del cual los productos de los genes ligados a los cromosomas sexuales se encuentran en cantidades similares en hembras y machos, a pesar de que dichos genes se encuentran en dos dosis en el sexo homomórfico y en una dosis en el sexo heteromórfico. Este proceso recibe el nombre de compensación de dosis génica.

Estos dos procesos ocurren en los tres organismos estudiados en este trabajo: *Drosophila*, *Caenorhabditis* y Mamíferos. En *Drosophila* y en *Caenorhabditis*, la base cromosómica es la razón del número de cromosomas X a grupos de autosomas (razón X:A); de modo que las hembras son 2X; 2A y los machos XY; 2A en el caso de *Drosophila*, y en *Caenorhabditis* las hermafroditas (o hembras) son 2X; 2A y los machos son X0; 2A. En Mamíferos, la determinación sexual depende del cromosoma Y; de modo que las hembras son 2X; 2A y los machos son XY; 2A. El desarrollo sexual en *Drosophila* es un proceso autónomo celular; esto es, cada célula sigue el patrón de desarrollo dictado por su constitución cromosómica, independientemente de las demás células. En Mamíferos, por el contrario, el desarrollo sexual es un proceso carente de autonomía celular. Finalmente, en *Caenorhabditis*, el desarrollo sexual es un proceso que en parte es autónomo celular. Con respecto a la compensación de dosis génica, en *Drosophila*, este proceso ocurre por hipertranscripción del cromosoma X de los machos, mientras que en *Caenorhabditis* ocurre por hipotranscripción de los dos cromosomas X de los hermafroditas. En Mamíferos, la compensación de dosis génica ocurre por inactivación de uno de los dos cromosomas X de las hembras.

1. *Drosophila melanogaster*

En *D. melanogaster*, la razón X:A es la primera señal genética que determina el desarrollo sexual. El cromosoma Y de los machos no juega ningún papel en dicho proceso. La señal X:A actúa sobre el gen *Sex-lethal (Sxl)* determinando su estado de actividad: en hembras, *Sxl* será activado, mientras que en machos *Sxl* no será activado (Cline 1978). Una vez que el estado de actividad de *Sxl* está definido, la señal X:A no se usa nunca más, y el desarrollo sexual y la compensación de dosis génica quedan bajo el control del gen *Sxl*, cuyo estado de actividad se mantiene por autorregulación positiva. El gen *Sxl* controla la expresión de dos grupos de genes distintos (Lucchesi & Skripsky 1981). Un grupo está formado por los genes de la determinación sexual; mutaciones en estos genes afectan el desarrollo sexual pero no la compensación de dosis génica. El otro grupo de genes lo forman los llamados *male-specific lethals (msl's)*; mutaciones en estos genes afectan la compensación de dosis génica, no afectando el desarrollo sexual (Uenoyama et al 1982; Belote 1983; Bachiller & Sánchez 1989). Puesto que ambos grupos de genes están regulados por *Sxl*, mutaciones de falta de función en este gen producen letalidad específica para hembras y/o transformación sexual en las mismas; mientras que mutaciones de ganancia de función producen letalidad específica para machos y/o transformación sexual.

1.1. LA SEÑAL X:A

La identificación de un conjunto de genes involucrados en la activación inicial de *Sxl* indica que un sistema genético convencional es la base de la señal X:A. Por definición, esta señal es cigótica y es el elemento clave en la activación de *Sxl*, pues los productos maternos involucrados en esta activación se encuentran presentes tanto en los cigotos que se van a desarrollar como hembras como en los que se desarrollarán como machos. La identificación de genes ligados al cromosoma X que forman la señal X:A se llevó a cabo mediante la búsqueda de mutaciones que presentaban letalidad específica para hembras (Sánchez et al 1994). El criterio de selección se basa en las propiedades que debe exhibir un gen ligado al cromosoma X cuya función sea requerida para formar la señal X:A. Un "elemento numerador" de la señal X:A debe poseer las siguientes propiedades:

- 1) Una reducción de sus dosis cigóticas producirá letalidad específica de hembras como consecuencia de que en éstas no se activa el gen *Sxl*. Esta letalidad se suprimirá por mutaciones constitutivas de *Sxl*, como la mutación *Sxl^M*. Estas mutaciones expresan el gen *Sxl* independientemente de la señal X:A (Cline 1978).
- 2) Un incremento de las dosis cigóticas producirá letalidad específica para machos como consecuencia de que en éstos se activa el gen *Sxl*. Esta letalidad se suprimirá por mutaciones de falta de función del gen *Sxl*.
- 3) La activación de *Sxl* requiere el producto materno del gen *daughterless (da)* (Cline 1978). Por lo tanto, mutaciones en este gen y en un

"elemento numerador" de la señal X:A mostrarán efecto sinérgico letal específico para hembras. Idéntico efecto sinérgico se dará también entre mutaciones de falta de función en distintos "elementos numerador" de la señal X:A. Ambas letalidades serán suprimidas por las mutaciones constitutivas de *Sxl*.

- 4) Un variación de las dosis cigóticas de un "elemento numerador" alterará el fenotipo mosaico intersexual de los individuos 2X;3A: un incremento de las dosis producirá feminización, mientras que una reducción producirá masculinización.

Las propiedades exhibidas por un "elemento denominador" (autosómico) de la señal X:A serán las opuestas a las manifestadas por un "elemento numerador".

Dos genes ligados al cromosoma X han sido identificados que cumplen las propiedades de un "elemento numerador" de la señal X:A. Estos genes son *sisterless-a (sis-a)* (Cline 1986) y una región del complejo *achaete-scute* (AS-C) que ha sido denominada *sisterless-b (sis-b)* (Cline 1988), y que corresponde al gen *scute (sc)* de este complejo (Torres & Sánchez, 1989; Parkhurst et al 1990; Erickson & Cline 1991). Así pues, el gen *sc* posee una dualidad de función: la llamada función Scute, la cual está involucrada en neurogénesis (García-Bellido 1979; Campuzano et al 1985) y la función *Sisterless-b* involucrada en formar la señal X:A (Torres & Sánchez 1989). Se han identificado otros genes ligados al cromosoma X, cuya actividad es requerida para la activación inicial de *Sxl* en las hembras. Uno de estos genes es *run* (*run*) (Duffy & Gergen 1991; Torres & Sánchez 1992). Este gen interviene también en el proceso de segmentación (Gergen & Wieschaus 1986). El otro gen se localiza en las bandas citogenéticas 17A9-10; 17A12-B1 (Sánchez et al 1994). En el caso de estos dos últimos genes, aunque su función es requerida para la activación de *Sxl* en las hembras, no son "elementos numerador" propiamente hablando como lo son los genes *sis-a* y *sc*, pues duplicaciones simultáneas de *run*, o de la región 17A9-10;17A12-B1, y de *sis-a*, o *sc*, no activan *Sxl* en los machos (Sánchez et al 1994). Hasta el momento, sólo un gen autosómico, el gen *dead-pan (dpn)*, se ha identificado como "elemento denominador" de la señal X:A (Younger-Shepherd et al 1992).

La razón X:A es necesaria pero insuficiente para activar *Sxl*. Un conjunto de productos maternos actúan o como activadores o como represores de este gen. Así, por ejemplo, los productos maternos de los genes *da* (Cline 1978) y *extramacrochaete (emc)* (Younger-Shepherd et al 1992) actúan como activador y represor, respectivamente, de la activación inicial del gen *Sxl*. Ambos genes están también involucrados en neurogénesis (Ghysen & Dambly-Chaudière 1988; Campuzano & Modolell 1992). En el cromosoma X, se ha identificado un gen localizado en las bandas citogenéticas 7D10;7F12, cuya función materna se requiere para la activación inicial de *Sxl* (Sánchez et al 1994).

1.2. NATURALEZA MOLECULAR DE LA SEÑAL X:A

Los genes *sc*, *dpn* y *da* codifican proteínas básicas con dominios hélice-lazo-hélice (bHLH) (Villares & Cabrera 1987; Caudy et al 1988), mientras que el gen *emc* codifica para una proteína HLH (Ellis et al 1990). El dominio básico confiere capacidad de fijación al ADN, y el dominio HLH confiere capacidad para interaccionar con otras proteínas HLH. Así pues, las proteínas HLH tienen la capacidad de formar complejos homodímeros o heterodímeros que se pueden fijar al ADN y actuar como reguladores transcripcionales (Murre et al 1989a,b). Combinaciones particulares de diferentes proteínas HLH forman distintos complejos, los cuales varían en su afinidad por diferentes sitios de fijación al ADN (Murre et al 1989b; Benezra et al 1990; Sun & Baltimore 1991). Basándose en estas propiedades de las proteínas HLH, se ha propuesto un modelo molecular para la señal X:A (Parkhurst & Ish-Horowicz 1992). Este modelo propone que se formarán heterodímeros entre las proteínas Da y Sis ("elementos numerador") con capacidad para activar la transcripción de *Sxl*. La interacción entre proteínas Sis y proteínas autosómicas ("elemento denominador") formarán, en cambio, complejos inactivos. Esto es, los productos autosómicos actuarían como secuestradores de los productos Sis, de forma tal que una concentración efectiva de complejos Da-Sis activos solamente se conseguirían en los cigotos 2X;2A (hembras), puesto que la cantidad de productos Sis en estos cigotos es doble que la presente en los cigotos XY;2A (machos). Existe evidencia experimental demostrando la existencia de complejos entre las proteínas Sc y Da (Deshpande et al 1995; Liu & Belote 1995), así como entre las proteínas Da y Sis-a, y Dpn y Sis-a (Liu & Belote 1995).

1.3. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA SEÑAL X:A

El papel de la señal X:A puede ser visualizado de dos formas distintas. Una posibilidad es que la señal X:A se necesite continuamente durante todo el desarrollo para que las células mantengan el patrón de desarrollo sexual y el proceso de compensación de dosis génica. De acuerdo con esta hipótesis, clones X0 inducidos en hembras XX;2A durante cualquier momento de su desarrollo sobrevivirían y diferenciarían estructuras de macho. Alternativamente, la señal X:A podría ser usada por las células en un momento determinado del desarrollo. Según esta hipótesis, clones X0 inducidos en hembras XX;2A antes de ese momento sobrevivirían y diferenciarían estructuras de macho, mientras que si los clones X0 son inducidos después de ese tiempo, serían letales por alteración de la compensación de dosis génica.

Para contestar estas preguntas, se usó la estrategia del análisis clonal: se construyeron genotipos que permitían la eliminación de un cromosoma X en hembras, por medio de la recombinación mitótica inducida por Rayos-X, en cualquier momento del desarrollo, e inducir así la producción de clones X0 en hembras XX;2A. Los resultados demostraron que los clones X0 inducidos alrededor del blastodermo sobreviven y diferencian estructuras de macho, mientras que si se inducen después de este estadio del desarrollo son letales. Sin embargo, los clones X0 sobreviven y se desarrollan si su cromosoma X lleva una

mutación de falta de función del gen *Sxl*, independientemente del momento en el desarrollo en que dichos clones son inducidos (Sánchez & Nöthiger 1983; Bachiller & Sánchez 1991). Estos resultados indican que la señal X:A determina, irreversiblemente y de una forma autónoma celular, el estado de actividad del gen *Sxl* alrededor del estadio de blastodermo. Una vez que ésto ha ocurrido, la señal X:A no es usada nunca más por las células, y el desarrollo sexual y la compensación de dosis génica quedan, desde el blastodermo y durante todo el desarrollo, bajo el control del gen *Sxl*. Así pues, los clones inducidos después del blastodermo son letales porque el gen *Sxl* continúa expresándose, lo que altera el proceso de la compensación de dosis génica. Por el contrario, si los clones XO llevan una mutación de falta de función del gen *Sxl*, la hipertranscripción del cromosoma X de los clones XO tiene lugar, permitiendo así sobrevivir a esos clones, los cuales diferenciarán estructuras de macho al no tener función del gen *Sxl*. Por otro lado, los resultados del análisis clonal son compatibles con la idea de que *Sxl* es el único gen que responde a la señal X:A.

El gen *Sxl* produce dos tipos distintos de transcritos, los cuales se corresponden con la función del promotor temprano específico de hembra y del promotor constitutivo no específico de sexo (Salz et al 1989). Los transcritos tempranos se producen como respuesta de *Sxl* a la señal X:A, la cual controla dicho gen a nivel de transcripción (Torres & Sánchez 1991; Keyes et al 1992). El control de *Sxl* después del blastodermo y durante toda la vida del adulto ocurre por "splicing" alternativo de su transcrito primario: los transcritos de los machos difieren de los de las hembras por la presencia en los primeros de un exón adicional que contiene codones de terminación de la traducción, por lo que en los machos se produce una proteína *Sxl* truncada no funcional; mientras que en las hembras, este exón es eliminado y se genera una proteína completa funcional (Bell et al 1988; Bopp et al 1991). El mantenimiento de la actividad de *Sxl* durante todo el desarrollo, después del blastodermo, y la vida adulta se debe a la función de autorregulación positiva de este gen (Cline 1984), como consecuencia de que la proteína *Sxl* es necesaria para el "splicing" específico de hembra que sufre el transcrito primario de este gen (Bell et al 1991).

La especificidad temporal de la señal X:A está relacionada con la existencia de los dos promotores del gen *Sxl*. En hembras, este gen se transcribe a partir de su promotor temprano como como respuesta a la señal X:A. Consecuentemente, se produce proteína *Sxl* temprana. En machos, la expresión temprana de *Sxl* no se produce porque en ellos no se forma la señal X:A, lo que resulta en la ausencia de proteína *Sxl* temprana. Después del blastodermo, cuando entra en funcionamiento el promotor constitutivo de *Sxl*, la presencia de proteína *Sxl* temprana en la hembras determina que el pre-mRNA tardío de *Sxl* siga el "splicing" tipo hembra, lo que da lugar a la formación de proteína *Sxl* tardía, la cual actuará sobre el RNA primario constitutivo de *Sxl* produciéndose de nuevo proteína *Sxl* tardía, y cerrándose así el ciclo que mantiene activo este gen. En los machos, por el contrario, al no existir proteína *Sxl* temprana, el pre-mRNA tardío, que se produce al entrar en actividad el promotor constitutivo de *Sxl*, sigue el "splicing" tipo macho, que da lugar a proteína *Sxl* truncada no funcional, estableciéndose así en los machos el "splicing" tipo macho del pre-mRNA de *Sxl*, el cual no da lugar nunca a proteína *Sxl* funcional. Por lo tanto, la

función biológica de la señal X:A es activar el promotor temprano de *Sxl* al principio del desarrollo, lo que determina que en las hembras se produzca proteína *Sxl* temprana, la cual determinará el que se establezca el mantenimiento de la producción continua de proteína *Sxl* durante todo el desarrollo y la vida adulta, una vez que entre en funcionamiento el promotor constitutivo de *Sxl*.

La especificidad temporal de la señal X:A puede deberse a que solamente al principio del desarrollo se forme dicha señal, o a la presencia al principio del desarrollo de alguno de los productos maternos necesarios para la activación de *Sxl* por la señal X:A. Entre los genes cigóticos que forman la señal X:A, y aquellos necesarios para la activación de *Sxl*, así como los genes de efecto materno involucrados en este proceso, algunos como *sc*, *run*, *dpn*, *da* y *emc*, no solamente se expresan al principio del desarrollo, sino también durante estadios posteriores del mismo. Esta expresión tardía ocurre en grupos de células, contrario a la expresión generalizada que está involucrada en la activación inicial de *Sxl*. Los genes *sc*, *dpn*, *da* y *emc* se expresan en las regiones neurogénicas de ambos sexos (Ghysen & Dambly-Chaudière 1988; Campuzano & Modolell 1992), mientras que *run* se expresa en bandas durante la formación de los segmentos (Gergen & Wieschaus 1988; Kania et al 1990; Duffy et al 1991). La especificidad temporal de la señal X:A no se explica por la restricción espacial en la expresión temporal de estos genes, pues en los machos *Sxl* no se activa en las células en donde dichos genes se expresan. La especificidad temporal de la señal X:A es explicable por el hecho de que el gen *sis-a* se expresa exclusivamente en el momento del desarrollo en donde se forma esta señal (Erickson & Cline 1993). También, otros genes, como los identificados en las bandas citogenéticas 17A9-10; 17A12-B1 y 7D10; 7F12, pudieran tener restringida su expresión a la etapa temprana del desarrollo.

1.4. LOS GENES DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL

En *D. melanogaster*, la regulación de los genes responsables de la determinación sexual ocurre por "splicing" alternativo de sus productos. Una interacción jerarquizada existe entre estos genes: el producto de un gen controla el "splicing" específico de sexo del pre-mRNA del gen situado por debajo de él en la cascada genética (Baker 1989). El gen *Sxl* controla el "splicing" del pre-mRNA del gen *transformer* (*tra*): el transcrito primario de este gen sufre un "splicing" alternativo en hembras y machos, de modo que se produce proteína *Tra* funcional en las hembras y no en los machos (Boggs et al 1987; Inoue et al 1990). En hembras, la proteína *Tra*, junto con el producto del gen constitutivo *transformer-2* (*tra-2*) (Goralski et al 1989; Amrein et al 1990), determinan el "splicing" del pre-mRNA del gen *doublesex* (*dsx*), el último en la cascada genética, de el modo de hembra dando lugar a una proteína funcional que promueve el desarrollo sexual de las hembras. En los machos, en donde no existe proteína *Tra* funcional, el pre-mRNA del gen *dsx* sigue la ruta de "splicing" de macho, lo que genera otra proteína funcional distinta que promueve el desarrollo sexual de los machos (Burtis & Baker 1989; Hoshijima et al 1991).

1.5 LOS GENES DE LA COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA

En *D. melanogaster*, los genes *male-specific lethals* (*msl's*) son los responsables de la hipertranscripción del cromosoma X de los machos (Belote & Lucchesi 1980a,b; Uchida et al 1981). Estos genes han sido clonados y sus productos caracterizados. El gen *mle* codifica una proteína que contiene los dominios característicos de las helicasas (Kuroda et al 1991). El gen *msh-1* codifica una proteína que contiene una región amino terminal característica de proteínas involucradas en transcripción y conformación de la cromatina (Palmer et al 1993). El gen *msh-3* codifica una proteína nueva que no presenta homología con proteínas descritas hasta el momento (Gorman et al 1995). Finalmente, el gen *msh-2* codifica una proteína que contiene un dominio de dedo de anillo ("RING finger") y un dominio similar a las metalocianinas, además de poseer residuos de aminoácidos cargados positiva y negativamente y un dominio espiral-espiral ("coil-coil") que pueden estar implicados en interacciones proteína-proteína (Zhou et al 1995; Kelley et al 1995). Mediante la técnica de inmunofluorescencia, se ha demostrado que las proteínas de estos genes se localizan preferentemente asociadas a lo largo de todo el cromosoma X de los machos, pero no a los cromosomas X de las hembras (Gorman et al 1993, 1995; Palmer et al 1994; Kelley et al 1995; Zhou et al 1995), al igual que ocurre con la histona H4 acetilada en la lisina 16 (H4Ac16) (Turner et al 1992). Esta distribución de las proteínas Msl, así como de la histona H4Ac16, es dependiente de la presencia simultánea de todas las proteínas Msl. Estos resultados, junto con el hecho de que las mutaciones *msh's* no muestren efectos aditivos (Bachiller & Sánchez 1989; Gorman et al 1993), han dado lugar a la hipótesis de que las proteínas Msl formarían un complejo multimérico que específicamente interaccionaría con el cromosoma X de los machos. Consecuentemente, este cromosoma X adquiriría una estructura cromatínica que permitiría una mejor accesibilidad de la maquinaria de transcripción, originando así una hipertranscripción del cromosoma X de los machos en relación con los autosomas y los dos cromosomas X de las hembras.

Las proteínas Mle y Msh-3 están presentes tanto en hembras como en machos, pero sólo en estos últimos ejercen su función en la compensación de dosis génica. El gen *msh-2* se transcribe también en ambos sexos, pero sólo en los machos existe proteína Msh-2. En los machos se produce un transcrito Msh-2 de menor tamaño que en las hembras, debido a la eliminación de un intrón en la región 5' no traducida (Zhou et al 1995). Dos modelos no excluyentes entre sí explicarían el que la proteína Msh-2 estuviese exclusivamente presente en los machos. Una posibilidad es que existiese una secuencia represora de la traducción en el intrón eliminado en los machos. Alternativamente, la presencia de secuencias poli-U, que fijan la proteína Sxl, presentes en las regiones 5' y 3' del mRNA de *msh-2* podrían servir como sitios de fijación para la proteína Sxl, la cual bloquearía la traducción de este mRNA en las hembras, pues sólo en ellas existe proteína Sxl. Por tanto, el gen *msh-2* parece desempeñar el papel clave en la especificidad de sexo de la compensación de dosis génica dependiente de los genes *msh's*.

El gen *msh-1* se transcribe en ambos sexos, pero su proteína está presente en machos, mientras que en hembras se encuentra en bajos niveles (Palmer et al 1994, Kelley et al 1995). Así pues, *msh-1* se controla a nivel de traducción. El gen *Sxl* juega un papel importante en esta regulación, pues en hembras mutantes para este gen la proteína Msh-1 se acumula y se encuentra asociada a los cromosomas X. Parte de esta regulación traduccional de *msh-1* se debe a que el mRNA de este gen es inestable en ausencia de la proteína Msh-2 (Kelley et al 1995). El gen *msh-1* da tres transcritos. Los dos transcritos mayores poseen una región 3' no traducida muy larga, rica en secuencias poli-U, muy similares a las encontradas en el mRNA de *msh-2*, mientras que el transcrito más pequeño carece de estas secuencias poli-U (Palmer et al 1993). Estos resultados han dado lugar a la proposición de que la proteína Sxl se fija a esas secuencias poli-U de todos los mRNAs de *msh-2* y a un grupo de mRNAs de *msh-1* impidiendo su traducción en las hembras (Palmer et al 1994; Kelley et al 1995).

Basándose en este modelo de regulación de *msh-1* y *msh-2* por la proteína Sxl, se ha propuesto una hipótesis sobre el mecanismo de la compensación de dosis génica temprana, la cual es dependiente de función *Sxl* e independiente de la función de los genes *msh*'s (Gergen 1987). Se ha propuesto que la proteína Sxl, al principio del desarrollo, regularía directamente la compensación de dosis génica de los genes ligados al cromosoma X que se expresarían en esos momentos tempranos del desarrollo, por fijación a las secuencias poli-U presentes en los extremos 5' y/o 3' de sus transcritos, disminuyendo la traducción de dichos mensajeros. Según esta hipótesis, la compensación de dosis génica temprana dependiente de *Sxl* e independiente de los *msh*'s tendría lugar en las hembras, y ocurriría por disminución de la traducción de los transcritos de los genes ligados al cromosoma X (Kelley et al 1995).

2. *Caenorhabditis elegans*

El nematodo *C. elegans* posee normalmente dos tipos sexuales: el hermafrodita (2X;2A) y el macho (X0;2A). Sin embargo, existen mutaciones que transforman los hermafroditas en hembras. Las hembras son somáticamente idénticas a los hermafroditas, excepto que éstas sintetizan esperma, además de oocitos. En otras especies próximas de nematodos, normalmente existen hembras (2X;2A).

En *C. elegans*, la razón X:A es la primera señal genética que determina el desarrollo sexual y la compensación de dosis génica. La señal X:A actúa sobre el gen *xol-1*, el primer gen en la cascada genética; de modo que en el hermafrodita este gen está inactivo, mientras que en el macho está activo. Los siguientes genes en la jerarquía genética son los genes *sdm*'s (*sdm-1*, *sdm-2* y *sdm-3*). Estos genes están negativamente regulados por *xol-1*. Después, la cascada genética se bifurca en dos grupos de genes distintos; los genes que controlan el desarrollo sexual y los genes que controlan la compensación de dosis génica.

2.1. LA SEÑAL X:A

La base genética y molecular de esta señal se desconoce por el momento. Sin embargo, hay evidencias de que "elementos" discretos, como los encontrados en *D. melanogaster*, pudieran existir también en *C. elegans*. Una región en el extremo izquierdo del cromosoma X parece contener "elementos numerador", puesto que dos copias de esta región causa letalidad específica de machos, y una copia afecta la viabilidad de los hermafroditas (Akerib & Meyer 1994). Ambos fenotipos parecen ser consecuencia de un desajuste en el proceso de la compensación de dosis génica.

2.2. LOS GENES DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL

Los genes *sdc* reprimen al gen *her-1*, el primer gen en la cascada genética que controla el desarrollo sexual. Este gen, a su vez, reprime los genes *tra-2* y *tra-3*, los cuales regulan negativamente a los genes *fem* (*fem-1*, *fem-2* y *fem-3*). Estos genes *fem* reprimen el gen *tra-1*, el último gen en la jerarquía genética.

Análisis de mosaicos genéticos han puesto de manifiesto que el gen *her-1* carece de autonomía celular (Hunter & Wood 1992). El transcrito mayor de este gen codifica para una proteína que contiene la secuencia señal de las proteínas excretadas en su extremo amino terminal, que es esencial para su función y es responsable del efecto masculinizante de este gen (Perry et al 1993), sugiriendo que el producto Her-1 actuase como un ligando que es secretado fuera de la célula. El posible receptor de Her-1 podría ser el producto del gen *tra-2*, el cual codifica para una proteína grande (Tra-2) con múltiples dominios transmembranales (Kuwabara & Kimble 1992; Kuwabara et al 1992). El producto Tra-2, a través de los genes *fem*, controlaría la actividad del gen *tra-1*. Este gen codifica dos proteínas con dominios de dedos de zinc (Zarkower et al 1994), sugiriendo que los productos Tra-1 sean factores de transcripción. La regulación de *tra-1* probablemente es post-transcripcional, pues ambos sexos poseen niveles similares de ambos mRNAs de *tra-1* (Zarkower et al 1994). De las 30 mutaciones de ganancia de función del gen *tra-1* que han sido aisladas, 29 de ellas tienen afectado el mismo tramo de aminoácidos del extremo amino terminal, sugiriendo que este tramo sea el sitio de regulación negativa ejercido por los productos Fem (Zarkover et al 1994). Se ha visto que el gen *fem-1* codifica una proteína (Fem-1) que posee seis dominios "ankyrin", que se encuentran en otras proteínas que están involucradas en interacciones proteína-proteína. La actividad del gen *tra-1* es necesaria y suficiente para el desarrollo sexual del hermafrodita (Hodgkin 1980), y presenta autonomía celular (Hunter & Wood 1990). Basándose en estos resultados, se ha propuesto un modelo para el desarrollo sexual de *C. elegans* (Kuwabara & Kimble 1992). El producto Tra-2 estaría integrado en la membrana celular y actuaría como el receptor de Her-1, el cual sería el componente no autónomo celular del desarrollo sexual. Los productos Fem formarían un complejo el cual interaccionaría con el receptor Tra-2, o con los productos Tra-1. Según este modelo, en el hermafrodita, debido a la ausencia de Her-1, el complejo Fem interaccionaría con el receptor Tra-2, de modo que los productos Tra-1 estarían libres y entrarían en el núcleo para,

directa o indirectamente, controlar los genes responsables del desarrollo sexual del hermafrodita. En los machos, el producto Her-1 que está presente interaccionaría con el receptor Tra-2, impidiendo que este receptor secuestre el complejo Fem, el cual interaccionaría con los productos Tra-1, bloqueando así su entrada en el núcleo y consecuentemente se seguirá el desarrollo sexual de macho.

2.3. LOS GENES DE LA COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA

En *C. elegans*, la compensación de dosis génica ocurre por hipotranscripción de los dos cromosomas X de los hermafroditas. Los genes responsables de este proceso son los genes *dumpy* (*dpy*) (*dpy-21*, *dpy-26*, *dpy-27*, *dpy-28* y *dpy-30*). Estos genes están positivamente regulados por los genes *sdc*. Ninguno de los genes *dpy* se requiere en los machos, excepto el gen *dpy-30*, y todos, excepto el gen *dpy-21*, tienen un efecto materno en el desarrollo del hermafrodita.

El gen *dpy-27* se ha clonado y su producto se ha caracterizado (Chuang et al 1994). El producto Dpy-27 pertenece a la familia SMC de proteínas, las cuales están involucradas en condensación cromosómica. Anticuerpos contra la proteína Dpy-27 muestran que dicha proteína se localiza difusamente en el núcleo de cigotos XX y X0, así como en embriones tempranos. Sin embargo, la localización preferencial son los cromosomas X del hermafrodita en el estadio de 30 células, así como en embriones X0 que activan el proceso de compensación de dosis génica. La localización cromosómica de la proteína Dpy-27 requiere la actividad de los genes *sdc-2*, *sdc-3* y *dpy-30*. Dado que el gen *sdc-2* se requiere cigoticamente y se expresa específicamente en el hermafrodita, el producto de este gen podría ser el factor específico de sexo que determina la localización cromosómica de la proteína Dyp-27. Además, los productos de los genes *dpy-26* y *dpy-28* podrían ser requeridos para la producción o estabilidad de Dyp-27, porque dicha proteína está severamente reducida en mutantes *dpy-26* y *dpy-28*. El gen *sdc-3* codifica para una proteína con dos dominios, uno responsable de su función en el desarrollo sexual y el otro responsable de su función en la compensación de dosis génica (Klein & Meyer 1993).

Basándose en estos resultados, se ha propuesto un modelo para explicar la compensación de dosis génica en *C. elegans*. En los hermafroditas, los productos Dyp formarían un complejo que específicamente interaccionaría con los dos cromosomas X de los hermafroditas, confiriendo a estos cromosomas una estructura que determina una hipotranscripción de sus genes.

3. MAMÍFEROS

En los Mamíferos, el desarrollo sexual se divide en dos procesos secuenciales: el desarrollo de la gónada indiferenciada en ovario o testículo (sexo gonadal, o determinación sexual primaria), y la diferenciación interna y externa de la genitalia y de los demás caracteres sexuales secundarios de acuerdo

con el sexo gonadal (sexo fenotípico, o determinación sexual secundaria). El sexo fenotípico está determinado por las hormonas secretadas por las gónadas.

3.1. DETERMINACIÓN SEXUAL PRIMARIA

La determinación sexual primaria implica la formación de las gónadas, ovarios en las hembras y testículos en los machos, a partir de una gónada indiferenciada, que no muestra características de ningún sexo. La señal que determina el sexo de la gónada es independiente del número de cromosomas y es dependiente del cromosoma Y, el cual contiene un gen que codifica para el factor Determinante del Testículo (TDF).

El gen que codifica el factor TDF es el gen SRY en humanos (Sinclair et al 1990) y su homólogo Sry en ratón (Gubbay et al 1990; Koopman et al 1990). Este gen codifica para una proteína que posee tres dominios: los dominios amino y carboxilo terminales no comparten homología con proteínas conocidas, y el dominio central posee homología con las proteínas HMG, las cuales actúan como factores de transcripción, lo que hace suponer que el factor TDF actúa regulando la expresión de otros genes. Koopman et al (1991) microinyectaron un fragmento de 14 kb conteniendo el gen Sry de ratón en el pronúcleo de cigotos de ratón y, en varios casos, los cigotos hembra XX desarrollaron testículos y otros órganos masculinos, demostrando el papel del gen Sry en la determinación sexual.

El hecho de que individuos XY con un alelo SRY aparentemente normal se desarrollen como hembras cuando llevan una duplicación de una región del cromosoma X (región Xp21), indica que hay otros genes, aparte del gen SRY, implicados en la determinación sexual. Se ha identificado un gen, dosage-sensitive sex reversal (DSS), localizado en la región Xp21, que cuando está presente en dos copias induce el desarrollo femenino de un individuo XY (Bardoni et al 1994). Este gen estaría sometido a la inactivación génica, pues individuos con el síndrome de Klinefelter (XXY) se desarrollan esencialmente como machos. Si bien el gen DSS cuando está duplicado interfiere con la determinación del testículo, su función no es necesaria para la formación del mismo, pues individuos con la constitución cromosómica 46,XY deficientes para el gen DSS desarrollan genitalia normal de macho, por lo que el gen DSS podría estar involucrado en el desarrollo del ovario. Estudios de la expresión del gen Dss en ratón han puesto de manifiesto que este gen comienza a transcribirse a los 11.5 dpc (días *post coitum*) en la cresta genital de embriones hembras y machos, coincidente con la expresión del gen Sry en machos (Swain et al 1996). A los 12.5 dpc, el gen Dss deja de expresarse en el testículo, pero permanece en el ovario. Dado que los transcritos de los genes Sry y Dss se encuentran en niveles similares en ambos sexos, parece probable que Sry regule la actividad del gen Dss a nivel postranscripcional.

Durante la vida fetal, la diferenciación del testículo precede a la diferenciación del ovario. Esto implicaría que los genes específicos del desarrollo masculino (MPGs) tendrán que ser reprimidos para el desarrollo normal de una hembra. A este respecto, se ha propuesto un modelo para explicar

la determinación del sexo gonadal (Jiménez et al 1996). Dicho modelo asume dos proposiciones: que el gen DSS reprimiría los genes MPGs, necesitándose una única dosis de DSS, y que el gen SRY inactivaría la funcionalidad del producto DSS. Según este modelo, en un macho normal XY la expresión del gen SRY prevendría la actividad del producto DSS, con lo que los genes MPGs se activarían, y consecuentemente la gónada indiferenciada se desarrollaría como testículo. Estos producirían una substancia (se ha propuesto la hormona antimülleriana) que mantendría reprimidos a los genes específicos del desarrollo femenino (FPGs). En una hembra normal, la cual carece del gen SRY, el gen DSS reprimiría la expresión de los genes MPGs, con lo que más tarde en el desarrollo se expresarían los FPGs, y consecuentemente la gónada indiferenciada se desarrollaría como ovario. Puesto que el gen DSS permanece activo en el ovario, este gen mantendría reprimidos los genes MPGs.

El gen SRY se expresa en la gónada indiferenciada en las células que serán las células de Sertoli. Estas células promueven la diferenciación de las células de Leydig, formándose así el testículo.

3.2. DETERMINACIÓN SEXUAL SECUNDARIA

En los machos, las células de Sertoli secretan la hormona antimülleriana, la cual previene el desarrollo del conducto mülleriano; mientras que las células de Leydig secretan testosterona la cual induce el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios del macho. En las hembras, el ovario secreta estrógenos que inducen el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de la hembra.

3.3. INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X

En Mamíferos, la compensación de dosis génica ocurre en las hembras por inactivación de uno de sus cromosomas X. Una vez que el cromosoma X se inactiva, este estado es estable y heredable a lo largo del desarrollo. En humanos, un grupo de genes localizados en la región pseudoautosómica del cromosoma X escapan a la inactivación, al contrario de lo que ocurre en el ratón en donde el cromosoma X completo se inactiva.

Durante el desarrollo temprano del ratón, los dos cromosomas X de las hembras son activos (Epstein et al 1978). La inactivación del cromosoma X ocurre primeramente en el trofotodermo y después en el endodermo primitivo, los dos tejidos extraembrionarios. En ambos casos, el cromosoma X que se inactiva es el proveniente del padre (Takagi & Sasaki 1975; West et al 1977; Takagi et al 1978). Así pues, existe un proceso de impronta genómica que determina el cromosoma que se inactiva al principio del desarrollo. Más tarde en el desarrollo tiene lugar la inactivación del cromosoma X en el embrión propiamente dicho, pero en este caso la inactivación afecta al cromosoma X derivado de la madre o del padre, siendo un proceso al azar, de modo que en unas células se inactiva el cromosoma materno y en otras células del mismo embrión se inactiva el cromosoma paterno, siendo esta inactivación establemente heredada por las células descendientes. Aunque la inactivación del cromosoma

X se mantiene en las células somáticas durante todo el desarrollo y la vida adulta de las hembras, en la línea germinal dicha inactivación se revierte, de modo que durante la oogénesis los dos cromosomas X están activos (Chapman 1986).

La inactivación del cromosoma X depende de un centro de inactivación (Xic) (Mattei et al 1981; Brown & Willard 1989; Rastan & Brown 1990; Brown et al 1991). Este proceso puede ser dividido en tres etapas: iniciación, propagación y mantenimiento. El proceso de iniciación depende de la señal X:A, siguiendo la regla de que permanece activo un cromosoma X por cada dos juegos haploides de autosomas. Así pues, en una célula con un complemento autosómico diploide y varios cromosomas X, solamente un único cromosoma X permanece activo inactivándose el resto de cromosomas X; mientras que en el caso de un embrión tetraploide (4n), dos cromosomas permanecen activos; y en el caso de un embrión triploide (3n), algunas células inactivan uno y otras inactivan dos cromosomas X (Endo et al 1982). Por lo tanto, en Mamíferos existe también una señal X:A, que en este caso está relacionada con la inactivación del cromosoma X.

En humanos, el gen XIST, el cual se localiza en el centro de inactivación XIC (Brown et al 1991), parece ser el responsable de la inactivación del cromosoma X (Brown et al 1991). En el ratón, el gen homólogo Xist se localiza también en el centro de inactivación Xic, y solamente lo expresa el cromosoma X que se inactiva (Brockdorf et al 1991; Borsani et al 1991). Los genes XIST y Xist codifican para un RNA de 17 kb (Brown et al 1992) y de 15 kb (Brockdorf et al 1991), respectivamente. Estos RNAs no codifican para proteínas, a pesar de poseer un alto grado de conservación en sus secuencias. Hasta el momento, no se ha identificado ningún gen autosómico que intervenga en la señal X:A.

El proceso de propagación del estado inactivado parece ocurrir por fijación del RNA XIST a lo largo del cromosoma X. La hibridización *in situ* ha detectado RNA XIST asociado al corpúsculo de Barr (Brown et al 1992), el cual es una manifestación citológica del cromosoma X inactivado. Otra posibilidad es que el RNA del gen XIST sea irrelevante y que sea la transcripción de este gen la que determine el cambio conformacional del centro de inactivación Xic, lo que desencadene el proceso de inactivación del cromosoma X (Brockdorf et al 1991).

Una vez que el proceso de inactivación del cromosoma X ocurre, este estado es establemente heredado por las células descendientes durante todo el desarrollo. Parece ser que el gen XIST no se requiere para el mantenimiento del estado de inactivación (Brown & Willard 1994). El tratamiento de líneas celulares de fibroblastos humanos con 5-aza-citidina, una droga que produce demetilación del ADN, revierte el estado inactivado del cromosoma X (Wolf et al 1984), indicando que la metilación podría estar involucrada en el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X. Un análisis cuantitativo del grado de metilación del gen HPRT reveló que dicha metilación ocurre progresivamente y comienza después del inicio de la inactivación (Lock et al 1987). Así pues, la metilación parece estar asociada al mantenimiento, no a la iniciación, de la inactivación del cromosoma X. Además, el cromosoma inactivado posee una estructura heterocromatinizada que previene la

transcripción. Así, por ejemplo, el cromosoma X inactivado carece de la histona H4Ac16 (Jeppesen & Turner 1993), que se encuentra presente en el cromosoma X de los machos de *D. melanogaster*, el cual se hipertranscribe.

En los tejidos extraembrionarios se inactiva siempre el cromosoma X paterno. En este caso, se ha observado que el alelo XIST está siempre poco metilado, como consecuencia de una demetilación regulada durante la espermatogénesis, mientras que el alelo XIST de origen materno está metilado (Norris et al 1994). Se ha propuesto un modelo para explicar la inactivación del cromosoma X durante los primeros estadios del desarrollo (Kay et al 1993; Norris et al 1994). La idea central es que en los embriones hembra el alelo XIST proveniente de la madre muestra una impronta causada por su metilación, que previene su transcripción en los tejidos extraembrionarios, en los cuales se expresa el alelo XIST derivado del padre, dado su falta de metilación, y consecuentemente el cromosoma paterno es inactivado. Más tarde en el desarrollo, la impronta del alelo materno XIST es eliminada, y consecuentemente en el embrión se expresa o el alelo XIST paterno o el alelo XIST materno, dando lugar, respectivamente, a la inactivación del cromosoma X paterno o materno. En este último caso, la transcripción de un único alelo XIST, el paterno o el materno, se debería a la presencia limitante de un factor de transcripción específico.

4. DETERMINACIÓN SEXUAL EN LA LINEA GERMINAL

La línea germinal muestra dimorfismo sexual al igual que la línea somática. Células con la constitución cromosómica 2X;2A se desarrollan como oocitos, y células X;2A se desarrollan como espermatozoides. El análisis de la línea germinal se ha desarrollado preferentemente en *D. melanogaster* y en *C. elegans*.

En *D. melanogaster*, el sexo de las células germinales está determinado por un mecanismo diferente al de la línea somática. Células XX inician espermatogénesis cuando están presentes en un testículo, y células XY inician la espermatogénesis cuando están presentes en un ovario. Por lo tanto, el sexo de la línea germinal está determinado por señales autónomas celulares (señal X:A) y señales somáticas inductoras (Steinmann-Zwicky et al 1989; Nöthiger et al 1989). Ambas señales regularían el estado de actividad del gen *Sxl*, cuya actividad es requerida para el desarrollo normal de las células XX en oocitos (Cline 1983; Schüpbach 1985; Steinmann-Zwicky et al 1989). Los genes que forman la señal genética X:A en la línea germinal son distintos de los que la forman en la línea somática (Cline 1986; Steinmann-Zwicky 1993; Granadino et al 1993). Con respecto a los genes de la determinación sexual de la línea somática *tra*, *tra-2*, *ix* y *dsx*, ninguno de ellos se necesita para el desarrollo sexual de la línea germinal, pues células germinales XX mutantes para estos genes forman oocitos normales cuando se transplantan a embriones hembra silvestres (Marsh & Wieschaus 1978; Schüpbach 1982; 1985).

En *C. elegans*, los hermafroditas se diferencian de las hembras normales en que aquellos producen esperma durante el estadio larvario L4 (Hirsh et al 1976). Durante este estadio del desarrollo, los hermafroditas producen espermatozoides que son almacenados en la espermateca; y después sólo producen oocitos. Se han identificado un conjunto de genes, *fog* y *mog*, cuya función es requerida para la producción de esperma por el hermafrodita (Schedl & Kimble 1988; Graham & Kimble 1993). Específicamente, el gen *fog-2* actuaría como un represor transitorio, durante el estadio L4, de los genes *tra-2* y *tra-3* en las células germinales, de modo que los genes *fem* se activan transitoriamente en estas células, lo que determina que éstas desarrollen esperma. Las mutaciones de falta de función del gen *tra-1* feminizan la línea germinal mientras que masculinizan la línea somática (Schedl et al 1989), lo que sugiere que al menos para este gen existen diferencias genéticas en el desarrollo sexual de las líneas germinal y somática, al igual que ocurre en *D. melanogaster*.

5. COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA EN LA LÍNEA GERMINAL

Sabemos de la existencia de compensación de dosis génica en la línea somática ¿Existe compensación de dosis génica en la línea germinal? Esta cuestión ha sido solamente explorada en *D. melanogaster*.

No se ha demostrado de una forma directa la existencia de compensación de dosis génica en la línea germinal. Como se ha mencionado anteriormente, los genes *msl's* son los responsables de la compensación de dosis génica en la línea somática. Se ha llevado a cabo el análisis de estos genes en la línea germinal, mediante la técnica de transplantación de células polares, los precursores de la línea germinal. Células germinales XY mutantes para *msl-1* y *msl-2* son capaces de formar esperma funcional cuando se transplantan a embriones macho silvestres, mientras que células germinales XY mutantes para *mle* no forman esperma funcional (Bachiller & Sánchez 1986). Por lo tanto, si existe compensación de dosis génica en la línea germinal, ésta está controlada, al menos en parte, por genes distintos de los que controlan la compensación de dosis génica en la línea somática. Alternativamente, el gen *mle* pudiera ser requerido para un proceso que afecta específicamente al cromosoma X y que tiene lugar durante la espermatogénesis. A este respecto, se ha propuesto la hipótesis de que el requerimiento del gen *mle* durante la espermatogénesis pudiera ser debido a que estuviese involucrado en el proceso de la inactivación precoz del cromosoma X en los espermatoцитos primarios (Bachiller & Sánchez 1986).

¿Es necesaria la existencia de compensación de dosis génica en la línea germinal? El desarrollo de las líneas somática y germinal es distinto. Pudiera no ser necesario que exista compensación de dosis génica en la línea germinal. El desarrollo somático de hembras y machos es el mismo, aparte del fenotipo sexual. Así, por ejemplo, no hay diferencias básicas entre el desarrollo del disco imaginal del ala de una hembra y de un macho, y los mismos genes se emplean en el desarrollo del ala en ambos sexos. Por lo tanto, un proceso de regulación de

la expresión génica tiene que haber surgido durante la evolución, para compensar las diferencias en las dosis de los genes ligados al cromosoma X, de modo que las células del disco imaginal del ala de ambos sexos posean niveles similares de productos codificados por esos genes, que son requeridos para su desarrollo. En el caso de la línea germinal, la oogénesis y la espermatogénesis son diferentes, no sólo en cuanto al proceso de desarrollo como tal, sino también en cuanto a requerimiento de genes. Pudiera ocurrir que la compensación de dosis génica fuese un proceso específico de la línea somática.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido llevado a cabo con la ayuda del proyecto PB92-0006 de la D.G.I.C.Y.T.

6. REFERENCIAS

- Akerib, Ch.C. & B.J. Meyer (1994) Identification of X chromosome regions in *Caenorhabditis elegans* that contain sex-determination signal elements. *Genetics*, 138: 1105-1125.
- Amrein, H.; T. Maniatis & R. Nöthiger (1990) Alternatively spliced transcripts of the sex determining gene *tra-2* of *Drosophila* encode functional proteins of different size. *EMBO J.*, 9: 3619-3629.
- Bachiller, D. & L. Sánchez (1986). Mutations affecting dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: effects in the germline. *Dev. Biol.*, 118: 379-384.
- Bachiller, D. & L. Sánchez (1989). Further analysis on the *male-specific lethal* mutations that affect dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 198: 34-38.
- Bachiller, D. & L. Sánchez (1991). Production of XO clones in XX females of *Drosophila*. *Genetical Research*, 57: 23-28.
- Baker, B.S. (1989). Sex in flies: The splice of life. *Nature*, 340: 521-524.
- Bardoni, B., E Zanaria, S. Guioli, G. floridia *et al* (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. genet.*, 7: 497-501.
- Bell, L.R.; E.M. Maine, P. Schedl, & T.W. Cline (1988). *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similar to RNA binding proteins. *Cell*, 55: 1037-1046.
- Bell, L.R.; J.I. Horabin, P. Schedl, & T.W. Cline (1991). Positive autoregulation of *Sex-lethal* by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell*, 65: 229-239.

- Belote, J.M. & J.C. Lucchesi (1980a). Male-specific lethal mutations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 96: 165-186.
- Belote, J.M. & J.C. Lucchesi (1980b). Control of X chromosome transcription by the *maleless* gene in *Drosophila*. *Nature*, 285: 573-575.
- Belote, J.M. (1983). Male-specific lethal mutations of *Drosophila melanogaster*. II. Parameters of gene action during male development. *Genetics*, 105: 881-896.
- Benezra, R.; R.L. Davis, D. Lockstone, D.L. Turner, & H. Weintraub (1990). The protein Id: a negative regulator of the helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 61: 49-59.
- Boggs, R.T.; P. Gregor, S. Idriss, J.M. Belote & M. McKeown (1987). Regulation of sexual differentiation in *Drosophila melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. *Cell*, 50: 739-747.
- Bopp, D.; L.R. Bell, T.W. Cline, & P. Schedl (1991). Developmental distribution of female-specific *Sex-lethal* proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.*, 5: 403-415.
- Borsani, G., R. Tonlorenzi, M. C. Simmler, L. Dandolo, D. Arnaud, V. Capra, M. Grompe, A. Pizzuti, D. Munzny, C. Lawrence, *et al* (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature*, 352: 325-329.
- Brockdorff, N., A. Ashworth, G. F. Kay, P. Cooper, S. Smith, V. M. McCabe, D. P. Norris, G. D. Penny, D. Patel & S. Rastan (1991). Conservation of position and exclusive expression of mouse *Xist* from the inactive X chromosome. *Nature*, 351: 329-331.
- Brown, C. J. & H. F. Willard (1989). Localization of the X Inactivation Centre (XIC) to Xq13. *Cytogenet. Cell Genet.*, 51: 971.
- Brown, C. J. & H. F. Willard (1994). The human X Inactivation Center is not required for maintenance of X chromosome inactivation. *Nature*, 368: 154-156.
- Brown, C. J., A. Ballabio, J. L. Rupert, R. G. Lafreniere, M. Grompe, R. Tonlorenzi & H. F. Willard (1991). A gene from the region of the human X-Inactivation Centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 349: 38-44.
- Brown, C. J., B. D. Heindrich, J. L. Rupert, R. G. Lafreniere, Y. Xing, J. Lawrence & H. F. Willard (1992). The human *XIST* gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 71: 527-542.

- Burtis, K.C. & B.S. Baker (1989). *Drosophila double-sex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, 56: 997-1010.
- Campuzano, S.; L. Carramolino, C.V. Cabrera, M. Ruiz-Gómez, R. Villares, A. Boronat & J. Modolell (1985). Molecular genetics of the *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*. *Cell*, 40: 327-338.
- Campuzano, S. & J. Modolell (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends in Genet.*, 8: 202-208.
- Caudy, M.; E.H. Grell, C. Dambly-Chaudière, A. Ghysen, L.Y. Jan & Y.N. Jan (1988). The maternal sex determination gene *daughterless* has zygotic activity necessary for the formation of peripheral neurons in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 2: 843-852.
- Chapman, V. M. (1986). X chromosome regulation in oogenesis and early mammalian development, in *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development* (J. Rosant & A. R. Pedersen, eds), pp 365-398.
- Chuang, P-T., D. G. Alberston & B. J. Meyer (1994). DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell*, 79: 459-474.
- Cline, T.W. (1978). Two closely-linked mutations in *Drosophila melanogaster* that are lethal to opposite sexes and interact with *daughterless*. *Genetics*, 90: 683-698.
- Cline, T.W. (1983). Functioning of the genes *daughterless* (*da*) and *Sex-lethal* (*Sxl*) in *Drosophila* germ cells. *Genetics*, 104 (Suppl): s16-17.
- Cline, T.W. (1984). Autoregulatory functioning of a *Drosophila* gene product that establishes and maintains the sexually determined state. *Genetics*, 107: 231-277.
- Cline, T.W. (1986). A female specific lethal lesion in an X-linked positive regulator of the *Drosophila* sex determination gene *Sex-lethal*. *Genetics*, 113: 641-663.
- Cline, T.W. (1988). Evidence that "*sisterless-a*" and "*sisterless-b*" are two of several discrete "numerator elements" of the X:A sex determination signal in *Drosophila* that switch *Sex-lethal* between two alternative stable expression states. *Genetics*, 119: 829-862.
- Deshpande, G.; J. Stuckey & P. Schedl (1995). *scute* (*sis-b*) function in *Drosophila* sex determination. *Mol Cell Biol*, 15: 4430-4440.

- Duffy, J.B. & J.P. Gergen (1991). The *Drosophila* segmentation gene *run*t acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene *Sex-lethal*. *Genes Dev.*, 5: 2176-2187.
- Duffy, J.B.; M.A. Kania & J.P. Gergen (1991). Expression and function of the *Drosophila* gene *run*t in early stages of neuronal development. *Development*, 113: 1223-1230.
- Ellis, H.M.; D.R. Apann & J.W. Posakony (1990). *extramacrochaete*, a negative regulator of sensory organs development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix protein. *Cell*, 61: 27-38.
- Endo, S., N. Takagi & M. Sasaki (1982). The late replicating X chromosome in digynous mouse triploid embryos. *Dev. Genet.*, 6: 137-143.
- Epstein, C. J.; S. Smith, B. Travis & G. Tucker (1978). Both X chromosomes function before visible X chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature*, 274: 500-503.
- Erickson, J.W. & T.W. Cline (1991). Molecular nature of the *Drosophila* sex determination signal and its link to neurogenesis. *Science*, 251: 1071-1074.
- Erickson, J.W. & T.W. Cline (1993). A bZIP protein, Sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in *Drosophila* development to determine sex. *Genes Dev.*, 7: 1688-1702.
- García-Bellido, A. (1979). Genetic analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 91: 491-520.
- Gergen J.P. (1987). Dosage compensation in *Drosophila*: evidence that *daughterless* and *Sex-lethal* control X chromosome activity at the blastoderm stage of embryogenesis. *Genetics*, 117: 477-485.
- Gergen, J.P. & E. Wieschaus (1986). Dosage requirements for *run*t in the segmentation of *Drosophila* embryos. *Cell*, 45: 289-299.
- Ghysen, A. & C. Dambly-Chaudière (1988). From DNA to form: the *achaete-scute* complex. *Genes Dev.*, 2: 495-501.
- Goralsky, T.J.; J-E Edström & B.S. Baker (1989). The sex determination locus *tra-2* of *Drosophila* encodes a polypeptide with similarity to RNA binding proteins. *Cell*, 56: 1011-1018.
- Gorman, M; M.I. Kuroda & B.S. Baker (1993). Regulation of the sex-specific binding of the *maleless* dosage compensation protein to the male X chromosome in *Drosophila*. *Cell*, 72: 39-49.
- Gorman, M.; A. Franke & B.S. Baker (1995). Molecular characterization of the male-specific lethal-3 gene and investigations of the regulation of dosage compensation in *Drosophila*. *Development*, 121: 463-475.

- Graham, P. L. & J. Kimble (1993). The *mog-1* gene is required for the switch from spermatogenesis to oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 133: 919-931.
- Granadino, B.; P. Santamaria & L. Sánchez (1993). Sex determination in the germ line of *Drosophila melanogaster*: activation of the gene *Sex-lethal*. *Development*, 118: 813-816.
- Gubbay, J.; J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Münsterberg, N. Vivian, P. N. Goodfellow & R. Lovell-Badge (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346: 245-250.
- Hirsh, D., D. Oppenheim & M. Klass (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 49: 200-219.
- Hodgkin, J. (1980). More sex determination mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 96: 649-664.
- Hoshijima, K.; K. Inoue, I. Higuchi, H. Sakamoto & Y. Shimura (1991). Control of *doublesex* alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science*, 252: 833-836.
- Hunter, C.P. & W.B. Wood (1990). The *tra-1* gene determines sexual phenotype cell autonomously in *C. elegans*. *Cell*, 63: 1193-1204.
- Hunter, C.P. & W.B. Wood (1992). Evidence from mosaic analysis of the masculinizing gene *her-1* for cell interactions in *C. elegans* sex determination. *Nature*, 355: 551-555.
- Inoue, K.; K. Hoshijima, H. Sakamoto & Y. Shimura (1990). Binding of the *Drosophila Sex-lethal* gene product to the alternative splice site of *transformer* primary transcript. *Nature*, 344: 461-463.
- Jeppesen, P. & B. M. Turner (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74: 281-289.
- Jiménez, R., A. Sánchez, M. Burgos & R. Díaz de la Guardia (1996). Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet.*, 12: 164-166.
- Kania, M.A.; A.S. Bonner, J.B. Duffy, & J.P. Gergen (1990). The *Drosophila* segmentation gene *rynt* encodes a novel regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev.*, 4: 1701-1713.
- Kay, G. F., G. D. Penny, D. Patel, A. Ashworth, N. Brockdorff & S. Rastan (1993). Expression of *Xist* during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell*, 72: 171-182.

- Kelley, R.L.; I. Solovyeva, L.M. Lyman, R. Richman, J.E. Manning, V. Solovyeva & M.I. Kuroda (1995). Expression of Msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell*, 81: 867-877.
- Keyes, L.N.; T.W. Cline, & P. Schedl (1992). The primary sex determination signal of *Drosophila* acts at the level of transcription. *Cell*, 68: 933-943.
- Klein, R. D. & B. J. Meyer (1993). Independent domains of the Sdc-3 protein control sex determination and dosage compensation in *C. elegans*. *Cell*, 72: 349-364.
- Koopman, P.; A. Münsterberg, B. Capel, N. Vivian & R. Lovell-Badge (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 450-452.
- Koopman, P.; J. Gubbay, N. Vivian, P. N. Goodfellow & R. Lovell-Badge (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 351: 117-121.
- Kuroda, M.I.; M.J. Kernan, R. Kreber, B. Ganetzky & B.S. Baker (1991). The *maleless* protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in *Drosophila*. *Cell*, 66: 935-947.
- Kuwabara, P.E. & J. Kimble (1992). Molecular genetics of sex determination in *C. elegans*. *Trends Genet.*, 8: 164-168.
- Kuwabara, P.E.; P.G. Okkema & J. Kimble (1992). *tra-2* encodes a membrane protein and may mediate cell communication in the *Caenorhabditis elegans* sex determination pathway. *Mol. Biol. Cell*, 3: 461-573.
- Liu, Y. & J.M. Belote (1995). Protein-protein interactions among components of the *Drosophila* primary sex determination signal. *Mol Gen Genet*, 248: 182-189.
- Lock, L. F., N. Takagi & G. R. Martin (1987). Methylation of the *Hprt* gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell*, 48: 39-46.
- Lucchesi, J.C. & T. Skripsky (1981). The link between dosage compensation and sex differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 82: 217-227.
- Marsh, J. L. & E. Wieschaus (1978). Is sex determination in germline and soma controlled by separate genetic mechanisms? *Nature*, 272: 249-251.
- Mattei, M. G.; J. F. Mattei, I. Vidal & F. Giraud (1981). Structural anomalies of the X chromosome inactivation centre. *Hum. Genet.*, 56: 401-408.

- Murre, C.; P.S. McCaw & D. Baltimore (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD* and myc proteins. *Cell*, 56: 777-783.
- Murre, C.; P.S. McCaw, H. Vässin, M. Caudy, Y.N. Jan, C.V. Cabrera, J.N. Buskin, S.D. Hauschka, A.B. Lassart, H. Weintraub & D. Baltimore (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complex that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58: 537-544.
- Nöthiger, R.; M. Jonglez, M. Leuthold, P. Meier-Gerschwiller & T. Weber (1989). Sex determination in the germline of *Drosophila* depends on genetic signals and inductive somatic factors. *Development*, 107: 505-518.
- Norris, D. P. N., D. Patel, G. F. Kay, G. D. Penny, N. Brockdorff, S. A., Sheardown & S. Rastan (1994). Evidence that random and imprinted *Xist* expression is controlled by pre-emptive methylation. *Cell*, 77: 41-51.
- Palmer, M.J.; V.A. Mergner, R. Richman, J.E. Manning, M.I. Kuroda & J.C. Lucchesi (1993). The *male specific lethal-one* gene encodes a novel protein that associates with the male X chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, 134: 545-557.
- Palmer, M.J.; R. Richman, L. Richter & M.I. Kuroda (1994). Sex-specific regulation of the *male-specific lethal-1* dosage compensation gene in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 8:698-706.
- Parkhurst, S.M.; D. Bopp & D. Ish-Horowicz (1990). X:A ratio, the primary sex-determination signal in *Drosophila*, is transduced by helix-loop-helix proteins. *Cell*, 63: 1179-1191.
- Parkhurst, S.M. & D. Ish-Horowicz (1992). Common denominators for sex. *Current Biology*, 2: 629-631.
- Perry, M.D.; W. Li, C. Trent, B. Robertson, A. Fire, J.M. Hageman & W.B. Wood (1993). Molecular characterization of the *her-1* gene suggests a direct role in cell signalling during *Caenorhabditis elegans* sex determination. *Genes Dev.*, 7: 216-228.
- Rastan, S. & S. D. M. Brown (1990). The search for the mouse X chromosome Inactivation Centre. *Genet. Res.*, 56: 99-106.
- Salz, H.K.; E.M. Maine, L.N. Keyes, M.E. Samuels, T.W. Cline & P. Schedl (1989). The *Drosophila* female-specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. *Genes Dev.*, 3: 708-719.

- Sánchez, L. & R. Nöthiger (1983). Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: production of male clones in XX females. *EMBO J.*, 2: 485-491.
- Sánchez, L.; B. Granadino & M. Torres (1994). Sex determination in *drosophila melanogaster*: X-linked genes involved in the initial step of *Sex-lethal* activation. *Dev. Genet.*, 15: 251-264.
- Schedl, T. & J. Kimble (1988). *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 119: 43-61.
- Schedl, T., P. L. Graham, M. K. barton & J. Kimble (1989). Analysis of the role of *tra-1* in germline sex determination in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 123: 755-769.
- Schüpbach, T. (1982). Autosomal mutations that interfere with sex determination in somatic cells of *Drosophila* have no direct effect on the germline. *Dev. Biol.*, 89: 117-127.
- Schüpbach, T. (1985). Normal female germ cell differentiation requires the female X chromosome to autosome ratio and expression of *Sex-lethal* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 109: 529-548.
- Sinclair, A. H.; P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf, R. Lovell-Badge & P. N. Goodfellow (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244.
- Steimann-Zwicky, M. (1993). Sex determination in *Drosophila*: *sis-b*, a major numerator element of the X:A ratio in the soma, does not contribute to the X:A ratio in the germ line. *Development* 117: 763-767.
- Steinmann-Zwicky, M.; H. Schmid & R. Nöthiger (1989). Cell-autonomous and inductive signals can determine the sex of the germ line of *Drosophila* by regulating the gene *Sxl*. *Cell*, 57: 157-166.
- Sun, X.H. & D. Baltimore (1991). A inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell*, 64: 459-470.
- Swain, A., E. Zanaria, A. Hacker, R. Lovell-Badge & G. Camerino (1996). Mouse *Dax 1* expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat. genet.*, 12: 404-409.
- Takagi, N. & M. Sasaki (1975). Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in XX mouse blastocysts. *Nature*, 256: 640-642.

- Takagi, N.; N. Wake & M. Sasaki (1978). Cytological evidence for preferential inactivation of the paternally-derived X chromosome in XX mouse blastocysts. *Cytogenet. Cell Genet.*, 20: 240-248.
- Torres, M. & L. Sánchez (1989). The *scute* (*T4*) gene acts as a numerator element of the X:A signal that determines the state of activity of *Sex-lethal* in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.*, 10: 3079-3086.
- Torres, M. & L. Sánchez (1991). The sisterless-b Function of the *Drosophila* gene *scute* is restricted to the state when the X:A ratio signal determines the activity of *Sex-lethal*. *Development*, 113: 715-722.
- Torres, M. & L. Sánchez (1992). The segmentation gene *runt* is needed to activate *Sex-lethal*, a gene that controls sex determination and dosage compensation in *Drosophila*. *Genetical Res.*, 59: 189-198.
- Turner, B.M.; A.J. Birley & J. Lavender (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell*, 69: 375-384.
- Uchida, S.; T. Uenoyama & K. Oishi (1981). Studies on the sex-specific lethals of *Drosophila melanogaster*. III. A third chromosome male-specific lethal mutant. *Jpn. J. Genet.*, 56: 523-527.
- Uenoyama, T.; S. Uchida, A. Fukunaga & K. Oishi (1982). Studies on the sex-specific lethals of *Drosophila melanogaster*. IV. Gynandromorph analysis of three male-specific lethals, *mle*, *msh-2* and *mle(3)132*. *Genetics*, 102: 223-231.
- Villares, R. & C.V Cabrera. (1987). The *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster* conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell*, 50: 415-424.
- West, J. D.; W. I. Freis, V. M. Chapman & V. E. Papaioannou (1977). Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse Yolk sac. *Cell*, 12: 873-882.
- Wolf, S. F., D. J. Jolly, K. D. Lunnen, J. Azelman & B. R. Migeon (1984). Methylation of the hypoxanthine Phosphoribosyltransferase locus on the inactive X chromosome: implications for X chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2806-2810.
- Younger-Shepherd, S.; H. Vaessin, E. Bier, L. Yeh Jan, & Y. Nung Jan (1992). *deadpan*, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell*, 70: 911-922.
- Zarkover, D.; M. , R. Aronoff & J. Hodgkin (1994). Regulatory rearrangements and *sm*-sensitive alleles of the of the *C. elegans* sex determination gene *tra-1*. *Dev. Gen.*, 15: 240-250.

Zhou, S.; Y. Yang, M.J. Scott, A. Pannuti, K.C. Fehr, A. Eisen, E.V. Koonin, D.L. Fouts, R. Wrightsman, J.E. Manning & J.C. Lucchesi (1995). Male-specific letahl 2, a dosage compensation gene of *Drosophila*, undergoes sex-specific regulation and encodes a protein with a RING finger and a metallothionein-like cysteine cluster. *EMBO J.*, 14: 2884-2895.