

DISCUSSIÓ

1. REFLEXIONS SOBRE LA METODOLOGIA. VALORACIÓ DE LA RAP-PCR-HIS

Estudiar l'expressió gènica diferencial en teixits de rata prenatal era un repte que ens va agradar d'assumir doncs significava la col·laboració de dues línies de recerca, l'una procedent de l'embriologia i l'altre de la biologia molecular. Aquest treball és la primera collita d'aquest *empelt* entre les dues línies, moment de mirar endarrera i de mirar endavant.

Analitzant, amb la perspectiva actual, el treball d'aquests tres anys, voldria comentar els següents punts:

El primer objectiu va ser aconseguir una correcta microdissecció que ens permetés saber que treballaríem amb territoris delimitats i coneguts. El criteri a l'hora d'escollir territoris *objecte*, per a un estudi d'expressió gènica diferencial, és cercar que siguin, entre ells, prou semblants per obtenir patrons comparables, però suficientment diferents per detectar canvis, potencialment importants, d'expressió gènica. Amb aquestes premisses i una certa desviació cap al terreny digestiu, per la història d'ambdós grups, vàrem delimitar uns segments de tub digestiu amb una entitat diferencial anatòmica i embriològica.

L'extracció de RNA és una tècnica feixuga per totes les precaucions que s'han de tenir a fi d'evitar la degradació del àcid nucleic. En el nostre cas a això s'hi afegia la petita grandària de les mostres i la inexperiència de l'*extractor*, però malgrat tot el RNA va ser extret i la petita quantitat que, en ocasions, s'obtingué va ésser compensada per l'alt rendiment de la RAP-PCR en aquestes situacions.

Posar a punt la tècnica de la RAP-PCR per les mostres d'embrió de rata va ésser més senzill del que d'entrada suposàvem doncs els *primers arbitraris* que vàrem provar varen donar, en general, bons *patrons de bandes*, reproduïbles. Vàrem optar per el *primer* D4S2912GT, un *primer* dissenyat per a estudiar polimorfismes en un dels microsatèl·lits del cromosoma 4 humà, per ser el que va produir patró més operatiu.

Els resultats de la RAP-PCR varen oferir un bon número de bandes corresponents a gens expressats en els diferents segments de tub digestiu, alguns d'ells expressats diferencialment. La tècnica de la RAP-PCR és molt bona per veure expressió gènica però és una tècnica de cribratge i, per tant, un primer pas que ha de seguir-se d'altres tècniques que confirmin i complementin la seva informació.

Un cop seleccionades les bandes a estudiar vàrem clonar-les i seqüenciar-les a fi de conèixer quins eren els gens que s'hi amagaven al darrera. La seqüenciació dona ja una informació "de qualitat" doncs posa noms, i a vegades cognoms, a les que fins aquell moment són unes "sense papers" i permet decidir l'estratègia a seguir: continuar la recerca o aturar-se en aquell punt.

La seqüenciació ha proporcionat, en la major part dels casos, informació "de qualitat" i en altres, els menys, no ha aportat dades concloents. La metodologia de la **RAP-PCR** amplifica tot tipus d'RNAs, a diferència del **differential display** que només ho fa dels mRNAs, per la qual cosa, en el nostre cas, hem obtingut cinc seqüències de rRNA (E3, G1, H3, N0 i N1), dues de les quals procedeixen del genoma mitocondrial (E3 i G1). En tres casos les bandes seqüenciades han mostrat la màxima homologia amb mRNAs (F8/hsp86, G0/CCT-5 i M2/GTP binding protein), dos seqüenciats en ratolí i un, en rata. Dues seqüències (J2 i N1.1) han mostrat una seqüència desconeguda de nucleòtids. Per últim, en el cas de la banda O1, com més endavant en aquesta discussió comentaré, és molt difícil d'assegurar que és el què realment hem amplificat.

Complementar la metodologia de la RAP-PCR amb la HIS l'hi confereix a la primera una verificació topogràfica, proporcionant un patró d'expressió ja no només tissular sinó cel·lular, amb l'avantatge addicional de no requerir l'obtenció d'una major quantitat de RNA a diferència, per exemple, de la tècnica del Northern blot (Shen, 2001)

La hibridació "in situ" ha estat, per tant, el següent pas per una de les bandes seqüenciades, la que donava màxima homologia amb la hsp86 i, gràcies a ella, hem aconseguit una informació molt valuosa en la comprensió de la funció d'aquest gen.

2. F8. HSP 90

2.1. Gen-proteïna de la hsp 90

2.1.1. Gen de la hsp 90. Estructura i localització.

Quan vàrem seqüenciar el *clon* de la hsp90, aquesta encara no havia estat seqüenciada en rata. Fa pocs mesos va aparèixer la seqüència del gen sencer de la **hsp86** (hsp90) en *Rattus Norvegicus* (Li et al [qj|14270365|emb|AJ297736.1|RNO297736](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/14270365)) i va ratificar les nostres suposicions, basades en homologies amb altres espècies, de què la seqüència F8 era un fragment del mRNA de la **hsp86** de la rata (*ortòloga* a la **hsp90 α** humana).

El fragment F8 comprèn tres dels 11 exons del gen: Part de l'exó 2 (1432-1493), l'exó 3 sencer (1591-1959) i part de l'exó 4 (2321-2388), numerats segons l'ordre de nucleòtids del gen **hsp86** de *Rattus Norvegicus* que consta en **BLAST NCBI**.

La localització de F8 en el genoma humà (segons UCSC) és a nivell de 14q 32.31 a on mostra una homologia d'un 92% amb el gen **hsp90 α** i a on també s'hi troben altres seqüències que corresponen a variants d'*splicing* del gen hsp90 com són *Heat shock*

protein 86 (exons 1-5), amb la que F8 mostra homologia i *Homo sapiens Hsp89-alpha-delta-N* (exons 5-11), considerada un fet evolutiu recent i que no conté el domini d'unió ATP/Geldanamicina (Schweinfest et al., 1998), amb la que F8 no presenta coincidències.

2.1.2. Regulació de la transcripció. Factors de transcripció.

L'expressió del gens de les *heat shock proteins* en mamífers està regulada pels factors de transcripció anomenats *Heat shock factors* (HSFs) (Morimoto et al., 1992). En ratolí i humà inicialment es varen clonar dos gens per HSFs (Sarge et al., 1994; Rabindran et al., 1991; Schuetz et al., 1991) i tres en pollastre (Nakai i Morimoto, 1993). Darrerament, s'ha descrit un quart factor en humans, el hHSF4 (Nakai et al., 1997), que mostra una acció repressora o activadora dels gens de les HSP, depenent d'un mecanisme d'*splicing* alternatiu (hHSF4a i hHSF4b). Els HSFs s'uneixen al DNA a una zona anomenada *heat shock element* (HSE) que es troba *aigües amunt* de tots els gens *heat shock* (Wu, 1995).

HSF1 i HSF3 són factors induïbles per l'estrès (Sarge et al., 1993; Nakai i Morimoto, 1993), però HSF 2 no s'uneix a la HSE en situacions d'estrès sinó que s'ha vist que s'indueix en cèl·lules que s'estan diferenciant (Sistonen et al., 1992), per aquest motiu i perquè s'ha demostrat durant l'embriogènesi del ratolí (Rallu et al., 1997) s'ha considerat que pot estar relacionat amb esdeveniments del desenvolupament.

2.1.3. Proteïna HS 90 α

El fragment clonat de hsp86 mostra una conservació perfecta de la seqüència d'aminoàcids respecte a la seqüència humana, això vol dir que estem davant d'una proteïna molt important en el curs de l'evolució i/o un fragment capdal dins de l'estructura d'aquesta proteïna. La conservació de la seqüència d'aminoàcids és deguda, molt probablement, a que la zona codificada per F8 correspon, segons podem veure en la relació d'homologies de F8 per a proteïnes, al domini d'unió de la hsp90 a Geldanamicina-ATP. L'existència d'un lloc d'unió de l'ATP a la hsp90 ha estat durant molt temps en debat fins que es va veure de manera inqüestionable, en la seva estructura cristal·lina, una *butxaca* en la qual s'uneix la molècula d'ATP (Prodromou et al., 1997) i que correspon al mateix lloc on s'uneix la molècula de Geldanamicina (Stebbins et al., 1997), un antibiòtic de la família de les Ansamicines, que inhibeix les funcions de la hsp90. Donat que, com veurem més endavant, la hsp90 s'associa a proliferació cel·lular en el càncer, darrerament s'està

considerant el potencial de la Geldanamicina com a molècula anticancerígena (Neckers et al., 1999a)

2.2. Fil·logenia de les hsp90.

2.2.1. Família de les hsp90

Les *Heat shock proteins* han estat dividides en cinc famílies: hsp 100, 90, 70, 60 i hsp (small hsp) d'acord amb el seva grandària, estructura i funció (Craig et al., 1994)

Els gens de la família de les hsp90 mostren una marcada conservació des de bacteris fins als humans (Parsell i Lindquist, 1993), actuen com a chaperones en el citosol i en el reticle endoplasmàtic. La família de les chaperones hsp90 està composta per les dues formes humanes hsp90 α i hsp90 β (Hickey et al., 1989), hsp 86 i 84 en ratolí (Perdew et al., 1993), hsp 83 en *Drosophila* i Hsc82 i hsp82 en llevats. Altres membres de la família són HtG en el citosol dels bacteris, Grp94/gp96 (Nicchitta, 1998; Argon i Simen, 1999) en el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules eucariotes i recentment s'ha descobert hsp75/TRAP 1 en la matriu mitocondrial (Felts et al., 2000).

2.2.2. hsp90 α i hsp90 β

Les duplicacions gèniques són situacions molt freqüents en el genoma i tenen una importància capdal en l'evolució. Quan hi ha una duplicació és com si hi hagués una *relaxació* en la pressió evolutiva sobre una seqüència, doncs com que la funció de la proteïna està *assegurada* per una de les dues còpies, l'altre *es pot permetre el luxe* de fer canvis en la seva seqüència i d'aquesta manera produir nous gens amb noves funcions, o bé esdevenir un *pseudogen*. Aquest és el cas de hsp90 en el que existeix una duplicació ancestral que en Homo Sapiens està representada per hsp90 α i hsp90 β .

A la rata trobem també els dos gens, hsp90 α (hsp86) i hsp90 β (hsp90). La hsp90 β de la rata es va seqüenciar el 1992 (MacGuire et al., 1992) i consta a la base de dades NCBI amb l'entrada *heat shock protein 90 (rats, brain)* ([S45392](#)). Aquest gen mostra una homologia del 92% amb *Mus musculus heat shock protein, 84 kDa 1 (hsp84-1)* ([gi|6680304|ref|NM_008302.1|](#)) i del 88% amb el gen homòleg humà *Homo sapiens heat shock 90kD protein 1, beta (HSPCB), mRNA* ([NM_007355](#)), que està format per 11 exons (igual que hsp90 α) i es localitza a 6p 21.1 (chr6:50422927-50428126) al genoma humà segons consta a la base de dades de la UCSC. La seqüència **F8** mostra una homologia d'un 77% amb el gen hsp90 β de la rata, però hem de recordar que no són gens homòlegs sinó paràlegs. A nivell de seqüència d'aminoàcids hsp90 β de la rata (hsp90 β) mostra un 85%

d'homologia amb la hsp90 Humana ([qij13654497/ref/XP_018115.1](#) *heat shock 90kD protein 1, beta (Homo sapiens)*).

L'homologia entre els dos gens paràlegs hsp90 i hsp90 , en un alineament de seqüències oscil·la entre el 75 i el 78 %, en la rata, però hi ha tres regions en les que aquesta homologia augmenta: 1. Un segment del 90% en l'exó 5 (2687-2726 de la) 2. Un segment del 86% (1376-1471) en l'exó 2 i 3. Un segment del 83 % també en l'exó 5.

La seqüència F8 conté una part del segment d'homologia del 86% (2), mostrant 39 nucleòtids (de 493-454 d'F8) amb una homologia del 85% entre F8 (hsp90) i hsp90 amb una conservació del 100% en la seqüència d'aminoàcids (NTFYSNKEIFLRE). Aquesta seqüència d'aminoàcids mostra l'homologia dins del domini de la Geldanamicina de les hsp90 ([qij3114264|pdb|1YES](#) Human hsp90 Geldanamycin-Binding Domain, "open" Conformation), que, com ja he comentat abans, està molt conservada en l'evolució dels gens homòlegs (hsp90) i paràlegs (hsp90 i hsp90).

2.3.Funcions de les hsp 90

Els membres de la família de les hsp90 tenen funcions molt importants en la tolerància a l'estrès (Borkovich et al., 1989) i en el plegament de proteïnes (Freeman i Morimoto, 1996).

La resposta tipus "heat shock" o resposta a l'estrès està molt conservada en l'escala evolutiva (en bacteris, plantes i animals) i és essencial com a mecanisme de defensa cel·lular d'un ampli ventall de situacions com són el "heat shock", els alcohols, els inhibidors del metabolisme energètic, els metalls pesats, l'estrès oxidatiu, la febre o la inflamació (Lindquist, 1986; Morimoto, 1993). En totes aquestes situacions es produeix una alteració de l'equilibri àcid-base i una hiperhidratació cel·lular que condueix a una alteració en el plegament de les proteïnes i, per tant, a un trastorn de la seva funcionalitat. La resposta de l'organisme a aquesta situació consisteix en la síntesi de dues classes de *heat shock proteins*: les chaperones que repleguen proteïnes alterades i les proteases, com les ubiquïtines, que asseguren la degradació de proteïnes alterades (Jolly i Morimoto, 2000).

En eucariotes, però, els membres de la família de les hsp90 s'ha vist que tenen funcions tant o més importants en situacions fisiològiques exercint de chaperones específiques de proteïnes implicades en transducció de senyals, regulació del cicle cel·lular i resposta hormonal (Prodromou et al., 1997). La via de senyalització millor estudiada, en la qual està involucrat hsp90, és la dels receptors d'esteroides. Els receptors d'esteroides en unir-se a hsp90 canvien la seva conformació fent-se capaços d'unir l'hormona, posteriorment la seva dissociació capacita al complex receptor-hormona a unir-se al DNA (Pratt i Toft,

1997). Una altra ruta a on s'ha demostrat la participació de hsp90 és la de les tirosin-kinases (Xu i Lindquist, 1993). Hsp90 col·labora al plegament de moltes proteïnes de les que cal destacar: la forma mutada de p53 (Blagosklonny et al., 1996), Tubulina (Sanchez et al., 1988) i Actina (Nishida et al., 1986)

2.4.hsp90 i desenvolupament

2.4.1. Implicació de la hsp90 en el desenvolupament. Revisió de la literatura.

L'expressió dels gens de la família de les hsp (Mirkes, 1987), així com els seus reguladors transcripcionals, els HSF (Kawazoe et al., 1999), ha estat constatada i ben estudiada durant el desenvolupament després d'un episodi d'estrès tèrmic. S'ha vist que determinades situacions d'estrès, com per exemple l'augment de temperatura, augmenten l'índex de mortalitat i el número de malformacions (Ingalls i Murakami, 1962; Schirone i Gorss, 1968). En aquesta línia s'ha especulat que situacions d'estrès durant períodes crítics de l'organogènesi poden produir alteracions del desenvolupament a causa de l'acció dels gens de les *hsp* sobre d'altres gens involucrats en el desenvolupament de diferents estructures embrionàries (German, 1984).

Menys es coneix del paper de les *hsp* durant el desenvolupament normal. S'ha vist, en quan als HSF, que l'HSF2 s'expressa constitutivament durant el desenvolupament en embrions de rata (Min et al., 2000) i de ratolí (Rallu et al., 1997). En testicle de ratolí, en període postnatal, existeix una correlació entre els nivells d'HSF2 i de hsp70 (Sarge et al., 1994) però no s'ha pogut correlacionar en altres sistemes, com és el cas del SNC, durant el període prenatal del ratolí, en què hsp70 mostra nivells d'expressió assincrònics amb els d'HSF2 (Rallu et al., 1997). Per explicar aquest fet s'han implicat variants d'splicing en el HSF2, HSF2 expressada en testicle i HSF en cor i SNC (Goodson et al., 1995), i s'ha plantejat que potser són d'altres gens, diferents a les hsp, les *dianes* del HSF2 durant el desenvolupament.

Respecte a l'expressió de les hsp de la família de les hsp90 durant l'embriogènesi no existeixen moltes dades en la literatura. En *Drosophila melanogaster* s'ha vist l'expressió de hsp83 durant l'oogènesi i en les primeres fases del desenvolupament (Michaud et al., 1997) i posteriorment durant la metamorfosi, relacionat amb *pics* dels nivells d'Ecdisona (Thomas i Lengyel, 1986).

En *Xenopus Laevis*, també s'ha vist l'expressió de hsp90 en l'oocit. Durant la segmentació s'observa mRNA de *hsp* d'origen matern i no és fins a la part final de la blàstula que l'embrió és capaç de generar-lo per ell mateix (Ali et al., 1996)

En peix zebra, mitjançant estudis de HIS, s'ha vist que hsp90 s'expressa en un petit grup cel·lular dins del mesoderma paraxial presomític a on també expressa MyoD (Sass et al., 1996), un factor regulador de la miogènesi (Davis et al., 1987). Per a poder conèixer l'espectre de funcions que podien tenir les hsp90 (i) en el desenvolupament de Zebrafish es va realitzar un estudi on es varen incubar embrions de peix zebra en aigua amb Geldanamycin. Els embrions varen mostrar alteracions de la somitogènesi, com era d'esperar donada la seva expressió en embrions normals al mesoderma presomític, però també varen presentar anomalies en el seu creixement al voltant del sac vitel·lí i en els embrions menys afectats es va veure una reducció en la pigmentació, una disminució del creixement dels ulls, anomalies del desenvolupament del cervell anterior i mig i defectes en el desenvolupament del sistema circulatori en el que, malgrat haver-hi batec cardíac, la circulació sanguínia no arribava a establir-se (Lele et al., 1999).

En ratolí també s'ha vist expressió de hsp90 en els oòcits (Curci et al., 1991). En embrions postimplantacionals s'ha observat l'expressió de hsp90 a SNC a nivell de la perifèria del tub neural, en derivats de la zona marginal, i durant l'osteogènesi tant membranosa com endocondral (Loones et al., 1997).

No existeix cap treball en el que s'hagi estudiat específicament l'expressió de hsp86 (hsp90) durant el període del desenvolupament en la rata. La informació que posseïm en la rata prové de l'expressió de hsp en estrès experimental o de l'expressió de HSFs. S'han observat alteracions de la somitogènesi, elevació del nivell de proteïna hsp90 i disminució dels nivells de Vimentina després d'un shock tèrmic experimental (Fisher et al., 1996). Aquest fet dona recolzament a la hipòtesi que hsp90 està implicada en la somitogènesi, com ja veiem en els experiments amb peix zebra (Sass et al., 1996).

2.4.2. Expressió de la hsp86 en el fetus de rata

Els nostres resultats amb la tècnica de la hibridació "in situ" mostren presència de la sonda F8Xbal (fragment de hsp86 de rata) a diferents localitzacions.

Inicialment vàrem intentar relacionar les diferents localitzacions a on s'expressa aquest gen, en el fetus de rata, segons el seu origen ontogènic però aquesta no ens aportà informació, doncs, malgrat un cert predomini d'estructures d'origen endodèrmic, les diverses localitzacions a on s'*expressa* F8 tenen el seu origen en diferents fulles embrionàries.

Mereix un tractament especial el lloc a on l'expressió del gen de la hsp86 (hsp90) és més intens, en totes les edats, en els fetus de rata estudiats: les cèl·lules germinals a nivell testicular. En moltes espècies, entre les que hi ha la rata, l'aparell reproductor masculí es troba a una temperatura inferior a la dels altres teixits de l'animal, doncs les cèl·lules germinals masculines són més sensibles al calor, de manera que petits augments de

temperatura poden alterar la seva funcionalitat i produir esterilitat (Sarge i Cullen, 1997). S'ha vist que l'HSF1 mostra un dintell d'activació a temperatures inferiors en les cèl·lules testiculars que en les de la resta de l'organisme (Sarge et al., 1994), el que no queda clar és quin és el paper que juguen les hsp, que s'activen pel HSF1, en la inhibició de l'espermatogènesi. S'ha especulat que les *hsp* podrien inhibir l'entrada en mitosi de les cèl·lules germinals com s'ha vist en altres models experimentals (Sarge i Cullen, 1997) i d'aquesta manera aturar l'espermatogènesi. En models de desenvolupament prenatal, en ratolí, s'ha vist expressió de hsp86 i hsp84 (Gruppi et al., 1995), tot i que el gen de *hsp* més abundantment expressat en testicles és el de la hsp70. Un factor que s'ha implicat en l'expressió de les hsp 90 en testicle és la seva funció en la regulació funcional dels receptors d'hormones esteroïdals que pot ésser important en l'acció de la testosterona (Sarge i Cullen, 1997).

Una relació possible, entre les localitzacions on s'expressa el fragment de la hsp86 de rata, la podem establir entre l'epiteli de les fosses nasals i bronquis doncs ambdós estan relacionats amb la respiració i presenten el mateix tipus d'epiteli: pseudoestratificat ciliat. Aquest fet fa pensar en què la connexió, en aquest cas, s'estableix en el fet de compartir funció i estructura cel·lular més que en el seu origen. Hi ha, però, un altre nivell de relació entre aquestes cèl·lules, dels **epitelis respiratoris** (nasal i bronquial), amb les dels **plexes coroïdals** (Chamberlain, 1973; Otani i Tanaka, 1988; Peters i Swan, 1979) i les **cèl·lules germinals masculines**: totes elles desenvolupen estructures lliures amb mobilitat: **cilis** o **flagels**. Els cilis i flagels estan formats per una estructura interna, l'axonema, constituïda, en vertebrats, per nou doblets de microtúbuls que n'envolten a dos centrals. Cada microtúbul està format per protofilaments constituïts per heterodímers d' α i β **tubulina** (Ladueña et al., 1992). S'ha evidenciat una clara relació entre hsp90 i tubulina (Sanchez et al., 1988; Redmond, 1989; Czar et al., 1996) però no està encara esclarida quina és la funció exacta que hsp90 desenvolupa en el funcionament i ensamblatge dels microtúbuls. Tot i que amb els nostres resultats no podem donar explicacions funcionals pel que fa al paper de la hsp90 en la dinàmica de la tubulina, si que podem afirmar que existeix una relació entre cèl·lules amb elements cel·lulars lliures, cilis i flagels, i l'expressió de la hsp90. En aquesta línia s'ha observat l'associació de hsp82, i també de hsp73, amb microtúbuls madurs i còrtex de *Tetrahymena* suggerint-se la implicació de gens de la família de les hsp90 en l'estabilitat de cilis, flagels i còrtex ciliat (Williams i Nelsen, 1997).

Del que he comentat, respecte a la funció de hsp90 en espermatogènesi, podem concloure que no està clara quina és la causa de la marcada expressió de hsp90 en les cèl·lules germinals masculines, evidenciada tant en el nostre treball com en la literatura, doncs hi ha un motiu estructural: la implicació de les hsp en la dinàmica de la tubulina, i un altre de funcional: la protecció de les cèl·lules germinals masculines per les *hsp*. Serà

necessari invertir més esforços en aclarir aquest fet, tot i que és possible que ambdós mecanismes tinguin un paper en la seva explicació

La presència d'hibridació en d'altres localitzacions pot explicar-se en base a la presència de receptors de glucocorticois, diana de les hsp90, és el cas del timus, l'escorça suprarenal, diferents zones del cervell i, una altra vegada en testicle, localitzacions on ja prèviament s'ha descrit l'expressió de hsp90 (Vamvakopoulos, 1993). En altres localitzacions l'expressió estaria relacionada amb diverses proteïnes plegades per hsp90 .

2.5.Hs 90 α i càncer

El gen de la hsp 90 ha estat relacionat amb la carcinogènesi en diferents treballs. Amb la idea de resumir i de correlacionar la bibliografia existent amb els resultats d'aquest treball dividiré aquest apartat en dues parts: 1. Implicació de la hsp 90 en el càncer i 2. Relació existent entre tumorigènesi i localitzacions on s'expressa la sonda F8Xbal en la HIS.

2.5.1. Implicació de la hsp 90 α en el càncer

Els treballs que estudien la presència de hsp90 en carcinogènesi coincideixen, a grans trets, en que la hsp90 està sobreexpressada en tumors, fet que fa considerar aquest gen més com un oncogen que com un gen supressor de tumors.

Per explicar la relació entre proliferació cel·lular i hsp 90 s'ha considerat que les proteïnes de la família hsp90 tenen un paper molt important en el plegament de les proteïnes necessàries per a les fases de creixement i divisió cel·lular, com són els receptors d'esteroides, p53 mutada o proteïnes relacionades amb les Protein Kinases.

Un possible mecanisme d'acció carcinogènica de la hsp90 és a través del protooncogèn Pim-1, involucrat en proliferació cel·lular i en la generació de limfomes i leucèmies. S'ha vist que hsp90 i hsp90 interaccionen amb Pim-1 i que l'inhibidor específic de hsp90, Geldanamicina, indueix una ràpida degradació de Pim-1 i la seva activitat kinasa (Mizuno et al., 2001).

Entre els càncers en què s'ha relacionat l'augment de l'expressió de hsp90 i hiperproliferació cel·lular hi ha, entre d'altres:

- Càncer d'Endometri: A més de l'augment d'expressió en càncer, hi ha un augment d'expressió en la fase proliferativa del cicle menstrual i en hiperplàsies (Wataba et al., 2001). Prèviament ja s'havia descrit la correlació entre l'expressió de receptors d'estrògens i de hsp90 , durant el cicle menstrual normal (Tang et al., 1995)

- Càncer de Pàncrees: S'ha observat augment d'expressió de hsp90 en carcinomes de pàncrees, no així en pàncrees normal o en pancreatitis crònica (Ogata et al., 2000).
- Càncer de Mama: S'ha vist l'augment de l'expressió de hsp90 en tumors de mama amb una correlació estreta entre l'expressió de hsp90 i l'índex de Proliferating-cell-nuclear-antigen (PCNA) (Yano et al., 1996)

El fet que hsp90 és essencial per la supervivència de les cèl·lules eucariotes s'ha d'afegir que les cèl·lules tumorals són particularment sensibles a la inhibició farmacològica de hsp90 per la qual cosa s'està considerant hsp90 com una bona diana per al tractament antineoplàsic i fàrmacs de la família de la Geldanamicina com els més indicats per dur a terme aquesta acció. (Neckers et al., 1999a). S'ha comprovat que la 17-(Allylamino)-17-demethoxygelganamycin (17-AAG), introduïda ja en assaigs clínics, produeix diferenciació morfològica i funcional en cèl·lules de càncer de mama que no tenen RB mutat (Münster et al., 2001), potser degut a què en absència de hsp90 no existeixen, en forma activa, els factors necessaris per entrar en fase S pel qual les cèl·lules es mantenen en G1 i opten pel camí de la diferenciació (Münster et al., 2001).

2.5.2. Relació existent entre tumorigènesi i localització de la sonda F8 en l'HIS.

De les diferents localitzacions en què hem observat hibridació de la sonda F8 existeix correlació entre hsp 90 i càncer a les següents localitzacions:

1. Carcinoma de nasofaringe: Les fosses nasals i la nasofaringe són localitzacions on l'expressió d'F8 és intensa i nítida. S'ha observat mitjançant la tècnica de les microarrays i sobre un pannel de 588 gens, la hiperregulació de nou gens, entre els que es troba el de la hsp86, variant d'splicing de la hsp90, que multiplica per 2,2 la intensitat de la seva expressió en les cèl·lules de carcinoma nasofaringi respecte a les cèl·lules nasofaríniques normals (Fung et al., 2000)

2. Leucèmia: Si considerem que el marcatge cel·lular del fetge són precursors hematopoètics, trobem un altre punt de contacte amb càncer doncs s'ha vist en diferents estudis un marcat augment de l'expressió de hsp90 en cèl·lules de leucèmia aguda tant "in vivo" com "in vitro" (Yufu et al., 1992).

3. Tumors de glàndules salivals: S'ha observat mitjançant immunohistoquímica l'expressió de hsp90 en tumors de glàndules salivals, si bé aquesta positivitat era percentualment superior en tumors benignes que en malignes (Vanmuylder et al., 2000)

3. G0. UNA CHAPERONINA AMB FUNCIONS DE GEN SUPRESSOR DE TUMORS.

Els clons de la banda G0 mostren homologia d'un 93% amb *Mus Musculus* Chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct-5). La CCT (Chaperonin containing TCP-1) és una chaperona que ajuda al plegament proteic en el citosol de les cèl·lules eucariotes (Kubota et al., 1995) i s'ha involucrat en el plegament d'actina i tubulina (Kubota et al., 1994; Lewis et al. 1996). Aquesta chaperonina és membre de la família que inclou *Escherichia coli* GroEL (Georgopoulos et al., 1973), hsp60 mitocondrial (McMullin i Hallberg, 1987), la subunitat de la proteïna transportadora *Rubisco* dels Plastids (RuBP) (Hemmingsen et al., 1988) i TF 55 (Trent et al., 1991). En les cèl·lules somàtiques de mamífer hi ha vuit subunitats CCT: (TCP-1), , , , , -1, i que estan codificades respectivament pels gens Ccta (Tcp-1), Cctb, Cctg, Cctd, Ccte, Cctz-1, Ccth i Cctq (Yokota et al., 2000). En testicle de ratolí s'ha trobat una subunitat específica d'aquest òrgan que és la -2, codificada pel gen Cctz-2 (Kubota et al., 1997). Les subunitats de CCT estan expressades ubiquament en cèl·lules de mamífers però els seus nivells depenen de l'índex de creixement cel·lular (Yokota et al., 1999). Pel que fa a la seves funcions se sap que CCT ajuda al plegament de l'actina (Gao et al., 1992) i la tubulina (Frydman et al., 1992) "in vitro" i que s'uneix a l'actina i la tubulina nou sintetitzades "in vivo" (Sternlicht et al., 1993). Així mateix, s'ha observat el augment en els nivells de subunitats de CCT després d'un estrès químic, causant d'una acumulació de proteïnes no-plegades (Yokota et al., 2000)

La seqüència dels clons de G0, quan els localitzem en el genoma humà (UCSC), es troba en la banda 5q 34 i és homòloga amb exons 6 i 7 dels gen *Homo Sapiens mRNA for KIAA0098 protein* i del *Homo Sapiens, clone IMAGE:3543711 mRNA, partial cds*. Aquests dos gens comparteixen els exons 1,2 i 3 amb el gen *Homo Sapiens PNAS-102, complete cds* i l'exó 1 amb *Homo Sapiens mRNA activated in tumor supression, clone TSAP9*.

Homo Sapiens mRNA activated in tumor supresion, clone TSAP9 es va clonar quan s'estudiava el patró d'expressió diferencial entre dues línies cel·lulars, l'una de leucèmia humana (K562) i l'altre (KS) procedent de la infecció per un parvovirus a K562. Es coneix que H1 Parvovirus té un efecte citopàtic sobre una varietat de cèl·lules tumorals entre les que es troben les cèl·lules de leucèmia humana K562. Quan s'afegeix aquest virus a un cultiu de cèl·lules K562 es produeix la mort de les cèl·lules malignes, preservant les cèl·lules KS, que presenten un fenotip tumoral suprimit i no són, per tant, diana del virus. La causa per la qual les cèl·lules KS no presenten un fenotip maligne i són resistents a H-1 podria residir en el fet que les cèl·lules KS expressen p53 a diferència de les K562 (Telerman et al., 1993). L'estudi de l'expressió gènica diferencial entre KS i K562 (Roperch et al., 1999) va mostrar 15 cDNAs diferencialment expressats (14 activats en KS i 1 activat en K562) i un

dels activats en les cèl·lules KS va ser *TSAP9*. Com a conseqüència, els cDNA hiperexpressats en les cèl·lules amb *fenotip tumoral suprimit* eren considerades com a **possibles gens supressors** i potencialment relacionats amb p53 expressat diferencialment en aquestes cèl·lules. El paper prodiferenciador de la *CCT (Chaperonin containing TCP-1)*, plegant Actina i Tubulina, entre d'altres, és concordant amb la seva consideració de "gen supressor de tumors".

No existeixen estudis d'expressió de CCT en el desenvolupament, motiu que considerem a la sonda G0 com el següent candidat per a l'estudi de l'HIS en període prenatal.

4. DESENVOLUPAMENT I PATOLOGIA CONGÈNITA. M2. GEN DE L'ATROFIA ÒPTICA

La banda M2 és un bon exemple del bon rendiment que podem extreure de la comparació entre espècies i de la utilització de diferents bases de dades. Si utilitzem Blast NCBI, en el cas de la banda M2, trobem que la màxima homologia és amb el mRNA de *RN protein* de *Rattus Norvegicus*, el qual ens dona l'homologia de la nostra seqüència amb l'espècie en la qual hem treballat però, en aquest cas, no ens aporta més informació. La seqüència mostra un 92% d'homologia amb *Mus musculus largeG mRNA for large GTP binding protein* i un 84% amb dues seqüències d'*Homo Sapiens KIAA0567 protein* i *optic atrophy 1 (autosomal dominant) (OPA1)*. Totes aquestes homologies, com tot seguit veurem, conflueixen en el gen que causa l'atrofia òptica hereditària, tipus 1.

Recentment s'ha descrit una proteïna relacionada amb la dinamina a *Schizosaccharomyces pombe*, *Msp1*, essencial per al manteniment del DNA mitocondrial (Pelloquin et al., 1998; Pelloquin et al., 1999), igual que la seva seqüència ortòloga en *Saccharomyces cerevisiae* (Jones i Fangman, 1992), *Mgm1p*. Cercant la seqüència homòloga en humà es va trobar una seqüència que codificava una proteïna desconeguda, *KIAA0567*, (Delettre et al., 2000). Per tant, *KIAA0567* codifica una proteïna relacionada amb la dinamina, en humà. *Msp1* i *Mgm1p*, i per homologia també *KIAA0567*, tenen un domini GTPasa i un domini dinamina, conservats en totes les dinamines (Van der Bliek, 1999) i un domini aminoterminal necessari per a la localització mitocondrial (Pelloquin et al., 1999). En la seqüència M2, el clon obtingut ha mostrat homologia amb *KIAA0567* i concretament a nivell del domini GTPasa, segons podem extrapolar de l'homologia amb *Mus musculus largeG mRNA for large GTP binding protein*.

En el mateix estudi en què es troba l'homologia entre *Msp1*, *Mgm1p* i *KIAA0567* (Delettre et al., 2000) es detecta l'homologia de *KIAA0567* amb dos clons del servidor de l'Institut Whitehead corresponents a *OPA1* (el gen causant de l'atrofia òptica hereditària, tipus 1) i es localitza el gen *OPA1*, mitjançant FISH, a 3q28-29. El gen *Homo sapiens optic*

atrophy 1 (autosomal dominant) (OPA1) completa el ventall de seqüències homologues amb la banda M2 i la localització que mostra el FISH (3q28-29) és la mateixa localització d'M2 a la seqüència de genoma humà: 3q29.

L'**atrofia òptica tipus 1 (OPA1)** és una neuropatia hereditària dominant que afecta entre 1:20.000-1:50.000 nadons (Alexander et al., 2000). Clínicament es manifesta per una pèrdua d'agudes visual i, en molts casos, per ceguesa (Hoyt, 1980). El fet que en l'OPA1 hi hagi pèrdua de cèl·lules ganglionars de la retina i que el gen alterat estigui relacionat amb l'estructura mitocondrial indueix a fer un paral·lelisme amb l'**atrofia òptica hereditària de Leber** en la que existeix afectació en les cèl·lules ganglionars i la causa d'aquesta es troba en una alteració en la cadena respiratòria dels mitocondris deguda a mutacions en els gens que codifiquen les subunitats del complex de la cadena respiratòria (Wallace et al., 1988). Aquests fets indueixen a pensar que les mutacions en OPA1 que afecten la integritat mitocondrial resulten en una alteració del subministrament d'energia que a la llarga afecta metabòlicament a les cèl·lules ganglionars de la retina i conseqüentment a la seva supervivència (Alexander et al., 2000) .

Amb tècniques de Northern blot i mRNA dot blot s'ha vist que el gen OPA1 s'expressava ubiqüament i que la localització on l'expressió era més intensa era a retina (Alexander et al., 2000), però no existeixen treballs que hagin estudiat l'expressió d'aquest gen durant el desenvolupament.

5. O1. LA COMPLEXITAT DEL GENOMA

La banda O1 mostra homologia amb varies seqüències diferents i de difícil correlació. El primer a dir d'ella és que, donada l'homologia d'espècie i l'abundància dels rRNA, hem de pensar que el què hem amplificat en la nostra RAP-PCR és *Rat 18S rRNA gene*.

Si analitzem, però, els resultats obtinguts a BLAST NCBI-nr, veiem una homologia, amb el mateix valor estadístic que *Rat 18S rRNA gene*, amb un gen de rosegador, *Mus musculus ETS-related transcription factor ERF (Erf1)*, un membre de la família dels gens ETS que codifiquen factors de transcripció reguladors relacionats amb proliferació cel·lular, diferenciació i tumorigènesi (Mavrothalassitis i Ghysdael, 2000).

La seqüència O1 mostra, en el BLAST en la base de dades del genoma humà (UCSC), homologia en el cromosoma 19p12, en el mateix segment, amb *Homo sapiens tensin (AF225896)* i *Homo sapiens serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant CTAK75a (AF159295)* i una homologia molt elevada, d'un 98%, però en un segment relativament curt (77/78) amb *Human iroquois-class homeodomain protein IRX-3 (U90305)*, un gen amb homeodomini que està implicat en el desenvolupament de la glàndula mamària

en humans (Lewis et al., 1999). A 3p24.1 trobem també homologia amb el gen *Human iroquois-class homeodomain protein IRX-3*.

L'estudi d'aquesta seqüència ens mostra que el genoma és moltes vegades complex i que degut a recombinacions, duplicacions i una ampla varietat de canvis, una seqüència pot mostrar homologia, pràcticament completa, amb gens aparentment tan diferents com el d'un factor de transcripció de la família ETS, el de la tubulina o un gen que codifica RNA ribosòmic. Per altra banda, el fet de trobar localitzat un gen, *Human iroquois-class homeodomain protein IRX-3*, en dos cromosomes (19p12 i 3p24) diferents ens mostra que probablement l'estudi del genoma humà és encara inexacte i queda un llarg camí a recórrer en aquest camp. Per últim, considerar que la generació de seqüències de cDNA a partir de *primers* arbitraris pot presentar aquest tipus de limitacions, ja que els fragments de cDNA aleatoris, potser, si no contenen les zones més específiques de la seqüència d'un gen poden conduir a situacions en les que sigui probablement impossible conèixer a quin gen correspon la seqüència amplificada. En aquestes situacions, continuar la recerca amb la HIS només ens conduiria a resultats ininterpretables, motiu pel qual la millor opció, creiem, és aturar-nos en la seqüenciació o cercar noves estratègies, com el disseny de *primers* específics, per a l'estudi concret d'una de les seqüències homologues.

6. DESENVOLUPAMENT I CÀNCER. GENS DEL DESENVOLUPAMENT I DEL CÀNCER

Ron Amundson va desenvolupar el concepte de "força explicativa" com el significat que té un mecanisme, respecte a qualsevol altre mecanisme alternatiu, a l'hora de cercar explicacions d'un fet concret (Amundson, 1989). Aquest concepte no parla tant de la validesa d'un mecanisme sinó de la seva contribució, amb relació als altres, en explicar un fenomen concret.

Günter Wagner, utilitzant el concepte d'Amundson diu que sempre hi ha un mecanisme que "té més força" a l'hora d'explicar cadascun dels esdeveniments en l'evolució de les espècies; la genètica de poblacions i la genètica del desenvolupament, no són explicacions alternatives, sinó que ambdues tenen "força explicativa" pels mecanismes evolutius i la importància de cadascuna d'elles varia d'un cas a l'altre (Wagner, 2000).

El càncer és un tipus molt concret d'evolució en el que poblacions cel·lulars han adquirit noves propietats que els hi confereixen un millor o pitjor futur en un ecosistema que és l'organisme animal. Quina és la seva força explicativa? La genètica de poblacions? En part segur que sí, en un medi concret, l'organisme, les cèl·lules millor adaptades, que es multipliquen més ràpid i són més *independents* dels factors externs tenen més possibilitats de resultar *seleccionades* (Hanahan i Weinberg, 2000) com malauradament succeeix masses vegades en la vida dels éssers humans. Però quins són els mecanismes cel·lulars

que confereixen a les cèl·lules tumorals aquest avantatge? Creiem que són vies de senyalització del desenvolupament mantingudes latents probablement en la maquinària adormida de les *stem cells* (Taipale i Beachy, 2001), cèl·lules embrionàries en l'organisme adult. Per això creiem que els mecanismes del desenvolupament tenen "força explicativa" pel càncer.

Hi ha molts estudis que parlen de càncer i desenvolupament com "dues cares de la mateixa moneda" i es comença a percebre que fer recerca en desenvolupament és fer una inversió en càncer, així com conèixer les vies del càncer ens ensenya a entendre el desenvolupament. En el nostre treball, en el que hem fet un primer sondeig en els gens durant el desenvolupament, hem trobat dos gens *hsp86* i **Chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct-5)** relacionats amb vies de la carcinogènesi. L'un, *hsp86*, un gen relacionat amb proliferació cel·lular i l'altre, **Chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct-5)**, un probable gen supressor de tumors. Aquesta nostra primera *pesca* de gens relacionats amb la carcinogènesi en el *mar* del desenvolupament, tot i que encara és minsa, ens diu que el camí del desenvolupament és bo per arribar al càncer.

Pensem que no es pot parlar de gens del desenvolupament i gens del càncer, doncs són els **mateixos gens** en situacions diferents, hauríem de parlar de **gens del desenvolupament i la carcinogènesi (GDC)**.

7. I ARA, CAP A ON?

Creiem que el camí que hem encetat és un camí apassionant de recorre, després d'aquest treball hi ha moltes més portes obertes que abans i el que darrera d'elles s'entreveu convida a travessar-les.

El gen de la **Chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct-5)**, és un nou repte per a nosaltres i ja hi ha d'altres *bandes* esperant a ésser seqüenciades, la RAP-PCR és una font inesgotable de noves idees.

Amb les tècniques de *microcaptura per làser de cèl·lules* podrem aconseguir millorar encara més en la concreció de les poblacions cel·lulars que expressen gens, per a poder delimitar les seves interaccions.

En l'horitzó proper o llunyà hi veiem les microarrays com a mètode per a aconseguir un cribratge gènic ampli i detectar així simultàniament un major nombre de gens implicats en desenvolupament.

I per últim el càncer, posar a punt les sondes de *gens del desenvolupament*, detectats en el període prenatal, per a realitzar hibridació "in situ" en teixits tumorals i així conèixer millor la implicació d'aquests gens en el procés carcinogènic.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La tècnica RAP-PCR ha mostrat ser adequada per a l'estudi de l'expressió gènica diferencial durant el desenvolupament prenatal a partir de fragments microdissecats. La hibridació "in situ" és un bon complement de la tècnica de *fingerprinting* doncs proporciona una informació topogràfica de l'expressió gènica.
2. De totes les bandes aïllades i seqüenciades, tres han mostrat homologia amb gens coneguts: F8 amb hsp86 de la rata, G0 amb *Chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct-5)* i M2 amb el gen de l'atròfia òptica tipus 1 (*OPA1*) i dues han resultat seqüències *desconegudes*. Això demostra la utilitat d'aquesta tècnica a l'hora de detectar gens coneguts i desconeguts durant el període del desenvolupament.
3. La banda F8 (homòloga amb hsp86 de la rata) s'expressa, entre altres localitzacions, en l'epiteli de les fosses nasals i dels bronquis de mida gran, en la capa endimèria dels plexes coroïdals i en les cèl·lules germinals masculines en el testicle. Totes elles són estructures que desenvolupen elements mòbils com cilis o flagels, fet que concorda amb l'associació de l'expressió de hsp90 amb tubulina.
4. Dues de les bandes analitzades: F8 (homòloga a hsp86 de rata) i G0 (homòloga a *Chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct-5)*) mostren implicació en la carcinogènesi, la qual cosa ens confirma que el plantejament de cercar gens de la carcinogènesi en el desenvolupament és una estratègia encertada.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195 (2000)
- Adati N, Ito T, Koga C, Kito K, Sakaki Y, Shiokawa K (1995). Differential display analysis of gene expression in developing embryos of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 1262(1):43-51
- Alexander C, Votruba M., Pesch UEA, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. (2000) . OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genet* 26:211-215
- Ali A, Krone PH, Pearson DS, Heikkila JJ (1996) Evaluation of stress-inducible hsp90 gene expression as a potential molecular biomarker in *Xenopus laevis*. *Cell stress and Chaperones* 1: 62-69
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Amundson R (1989). The trials and tribulations of selectionist explanations. A: Hahlweg K, Hooker CA, editors. *Issues in evolutionary epistemology*. New York: State University of New York Press. 413-432
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano R (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50(2):197-263
- Argon Y, Simen BB (1999). GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol* 10(5):495-505
- Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wntless signaling pathways. *Genes Dev* 12(16):2610-2622
- Baldwin TJ, Fazeli MS, Doherty P and Walsh FS (1996) Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J Cell Biochem* 61: 502-513
- Barra HS, Arce CA, Argarana CE. (1988). Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol*;2(2):133-153

- Beck F, Tata F, Chawengsaksapong K (2000) Homeobox genes and gut development. *BioEssays* 22:431-441
- Beddington RS, Smith JC (1993). Control of vertebrate gastrulation: inducing signals and responding genes. *Cur. Opin. Genet Dev* 3: 655-661.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382(6592):638-642
- Bejsovec A, Martinez Arias A (1991) Roles of wingless in patterning the larval epidermis of *Drosophila*. *Development* 113(2):471-85
- Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL (1997). Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 124(23):4867-78
- Bestor TH (1998) Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 393: 311-312
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9(16): 2395-2402
- Birchmeier W, Behrens J (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198(1):11-26
- Bird AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213
- Bird, A.P. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70, 5-8
- Bishop JM (1983). Cancer genes come of age. *Cell* 1983: 1018-1020
- Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoyer H, Elbe-Burger A, Wachtler F (1999). Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 199(5):391-396
- Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohlen S, Neckers L (1996). Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8379-83
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function?. *Cell* 105:829-841.

Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* 9: 3919-3930

Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 1):123-161

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000).From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290(5497):1775-1779

Brown NA i Fabro S (1981) Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology* 24: 65-78

Brueckner M (2001) Cilia propel the embryo in the right direction. *Am J Med Genet* 101 (4): 339-344

Burdine RD, Schier AF (2000). Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation.*Genes Dev* 14 (7): 763-776

Burkley SK & Roeder RG (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TF IID) *Annu Rev Biochem* 65: 769-799

Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signalling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305

Chamberlain JG (1973).Analysis of developing ependymal and choroidal surfaces in rat brains using scanning electron microscopy. *Dev Biol* 31(1):22-30

Chambers D, Medhurst AD, Walsh FS, Price J, Mason I. (2000). Differential display of genes expressed at the midbrain - hindbrain junction identifies sprouty2: an FGF8-inducible member of a family of intracellular FGF antagonists. *Mol Cell Neurosci* 15(1):22-35

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-cloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1623:156-159

Christie, GA (1964) Developmental stages in somite and post-somite rat embryos, based on external appearance, and including some features of macroscopic development of the oral cavity. *J Morph* 114: 263-286

Colgan DF, Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11:2755-2766

- Collins MD, Mao GE (1999). Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 399-430
- Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, Barth KS, Kispert A et al (1994). A primary requirement for nodal in formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120: 1919-28.
- Conway G (1995). A novel gene expressed during zebrafish gastrulation identified by differential RNA display. *Mech Dev* 52(2-3):383-91
- Copp AJ, Cockcroft DL (1990). Postimplantation mammalian embryos. A Practical approach. Oxford University Press. New York.
- Couly GF i Le Douarin NM (1985) Mapping of the Early Neural Primordium in Quail-Chick Chimaeras: I. Developmental Relationship between Placodes, Facial Ectoderm and Proscephalon. *Dev Biol* 110 (2): 422-439
- Craig EA, Weissman JS, Horwich AL (1994). Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78:365-372
- Cramer P, Srebrow A, Kadener S, Werbajh S, de la Mata M, Melen G, Nogues G, Kornblihtt AR (2001). Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett* 498(2-3):179-182
- Crick FHC (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature* 227:561-563
- Curci A, Bevilacqua A, Fiorenza MT, Mengia F (1991) Developmental regulation of heat-shock response in mouse oogenesis: identification of differentially responsive oocyte classes during graafian follicle development. *Dev Biol* 144:362-368
- Czar MJ, Welsh MJ, Pratt WB (1996). Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 70(4):322-30
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987 Dec 24;51(6):987-1000
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26(2):207-210

- Dietz, UH, Sandell LJ (1996) Cloning of a retinoid acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem* 271(6): 3311-3316
- Doerksen LF, Bhattacharya A, Kannan P, Pratt D, Tainsky MA (1996) Functional interaction between a RARE and an AP-2 binding site in the regulation of the human Hoxa-4 gene promoter. *Nucl Acid Res* 14: 2849-2856
- Douglas KR, Camper SA (2000). Partial transcriptome of the developing pituitary gland. *Genomics* 70(3):335-46
- Du Pasquier L, Hsu E U(1983). Immunoglobulin expression in diploid and polyploid interspecies hybrid of *Xenopus*: evidence for allelic exclusion. *Eur J Immunol* 13(7):585-590
- Duboule D, Morata G (1994) Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 10, 358-364
- Duluc I, Hoff C, Kedinger M, Freund JN (2001). Differentially expressed endoderm and mesenchyme genes along the fetal rat intestine. *Genesis* 29: 55-59
- Dupé V, Davenne M, Brocard J, Dolle P, Mark M, Dierich A, Chambon P, Rijli FM (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3' RARE). *Development* 124: 399-410
- Dutcher SK (2001) The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Op Cell Biol* 13: 49-54
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75(7):1417-1430
- Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247(4938):83-85
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10(8):2709-2721
- Eichele G(1989). Retinoids and vertebrate limb pattern formation. *Trends Genet* 5(8):246-251

- Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Collard JG (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration Eur J Cancer 36(10):1269-1274
- Fan CM, Tessier-Lavigne M (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. Cell 1994 Dec 30;79(7):1175-1186
- Faust C, Magnusson T (1993) Genetic control of gastrulation in mouse. Curr Opin Genet Dev 3: 491-498
- Fedonkin, MA & Waggoner BM (1997). The late precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. Nature 388: 868-871
- Fell HB (1925). The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. J Morph Physiol 40: 417-459
- Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, Toft DO (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. : J Biol Chem 275(5):3305-3312
- Ferguson EL, Anderson KV (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the Drosophila embryo Cell 71(3):451-61
- Fisher BR, Heredia DJ, Brown KM. Heat-induced alterations in embryonic cytoskeletal and stress proteins precede somite malformations in rat embryos. Teratog Carcinog Mutagen 1996;16(1):49-64
- Fleming TP, Johnson MH (1988). From egg to epithelium. Annu Rev Cell Biol 4: 459-485
- Freeman BC, Morimoto RI (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. EMBO J 15, 2969-2979
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells J Cell Biol 113(1):173-185
- Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument-Bromage H, Wall JS, Tempst P, Hartl FU (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. EMBO J 11(13):4767-4778

- Fukamachi H, Takayama S. (1980) Epithelial-mesenchymal interaction in differentiation of duodenal epithelium of fetal rats in organ culture. *Experientia* 36(3):335-336
- Fung LF, Lo AKF, Yuen PW, Liu Y, Wang XH, Tsao SW (2000) Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sciences* 67: 923-936
- Gao Y, Thomas JO, Chow RL, Lee GH, Cowan NJ (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell* 69(6):1043-1050
- Gaubert-Cristol R, Godlewski G (1991) Identification of point scores at stage 23 in the rat according to the system of scoring in the human embryo. *Acta Anat (Basel)* 141 (4): 364-368
- Georgopoulos, C., Hendrix, R.W., Casjens, S.R. and Kaiser, A.D. (1973). Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* 76, 45-60.
- German I (1984) Embryonic stress hypothesis of teratogenesis. *Am J Med* 76(2):293-301
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science* 285(5430):1028-1032
- Godlewski G, Gaubert-Cristol R, Rouy S (1992) Liver development in rats during the embryonic period (Carnegie stages 11-14). *Acta Anat* 144:45-50
- Gong TW, Hegeman AD, Shin JJ, Lindberg KH, Barald KF, Lomax MI (1997). Novel genes expressed in the chick otocyst during development: identification using differential display of RNA. *Int J Dev Neurosci* 15(4-5):585-94
- Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD (1995) Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol Cell Biol* 15(10):5288-5293
- Gouling M, Lumsden A, Paquette AJ (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120:957-971.
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R (1989).The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57(3):367-378
- Gruppi CM, Zakeri ZF, Wolgemuth DJ (1991) Stage and lineage-regulated expression of two hsp90 transcripts during mouse germ cell differentiation and embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 28(3):209-17
- Gumbiner BM (1993) Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11: 551-564

- Gurdon JB (1986) Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J Cell Sci Suppl* 4: 287-318
- Gurdon JB, Harguer P, Mitchell A, Lemaire P (1994). Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature* 371: 487-492
- Haffen K, Kedinger M, Simon-Asman PM (1987) Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 14-23
- Haffen K, Lacroix B, Kedinger M, Simon-Asman PM (1983). Inductive properties of fibroblastic cell cultures derived from rat intestinal mucosa on epithelial differentiation. *Differentiation* 23: 226-233
- Hanahan D i Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P (1998). Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3. *Curr Biol* 8: 573-581
- Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI (1997). N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma *Cell Adhes Commun* 4(6):399-411
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148(4):779-90
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281(5382):1509-1512
- Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* May 26;333(6171):330-4
- Henry GI, Melton DA (1998). Mixer, a homeobox gene required for endodermal development. *Science* 281: 91-96
- Hickey E, Brandon SE, Smale G, Lloyd D, Weber LA (1989). Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol Cell Biol* 9(6):2615-26

- Hoar RM, Monie IW (1981) Comparative development of specific organ systems. A Developmental Toxicology. Ed Kimmel CA, Buelke-Sam. Raven Press. New York 1981: 13-33.
- Hogan BL, Beddington R, Constantini F, Lacy E (1994). Manipulating the mouse embryo, A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 2nd ed.
- Hogan BLM (1999). Morphogenesis. Cell 96: 225-233
- Hoyt CS (1980). Autosomal dominant optic atrophy: a spectrum of disability. Ophthalmology 87: 245-251
- Hudson C, Clements D, Riday RV, Scott D, Woodland HR (1997). Xsox 17alpha and beta mediate endoderm in Xenopus. Cell 91: 397-405
- Hummer H, Korte R, Hendrick AG (1990) Induction of malformations in the cynomolgus monkey with 13-cis retinoic acid. Teratology 42: 263-272
- Hutchinson CA, Newbold JE, Potter SS (1974) Nature 251, 536-538.
- Hynes RO (1987). Integrins: a Family of Cell Surface Receptors. Cell 48: 549-554
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. EMBO J 17(5):1371-1384
- Ingalls TH, Murakami U (1962) Cyclopia, ectromelia and other monstrosities in zebrafish. Arch Environ Health 5:28-35
- International Human genome sequencing consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860-921
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. : J Clin Invest 107(11):1395-1402
- Jolly C, Morimoto RI (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J Natl Cancer Inst 92(19):1564-1572
- Jones B, Fangman W (1992) Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. Genes Dev 6: 380-389

- Jones PA (1999). The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 1999 Jan;15(1):34-37
- Jones PA, Takai D (2001) The role of dna methylation in mammalian epigenetics. : *Science* 293(5532):1068-1070
- Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19: 187-191.
- Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS (1999) Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284: 1998-2003
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6(5):705-714
- Kaplan F, Ledoux P, Kassamali FQ, Gagnon S, Post M, Koehler D, Deimling J, Sweezey NB (1999) A novel developmentally regulated gene in lung mesenchyme: homology to a tumor-derived trypsin inhibitor. *Am J Physiol* 276(6 Pt 1):L1027-36
- Kappen C, Schughart K, Ruddle FH (1989). Two steps in the evolution of Antennapedia-class vertebrate homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(14):5459-5463
- Kawazoe Y, Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Nakai A (1999) HSF3 is a major heat shock responsive factor during chicken embryonic development. *Eur J Biochem* 265: 688-697
- Kemler R, Ozawa M, Ringwald M (1989) Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1: 892-897
- Kimmel CB (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trens Genet* 5:283-288
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310
- Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3):369-377

- Kubota H, Hynes G, Carne A, Ashworth A, Willison K (1994). Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. *Curr Biol* 4 (2):89-99
- Kubota H, Hynes G, Carne A, Kerr SM, Willison K (1997) Tissue-specific subunit of the mouse cytosolic chaperonin-containing TCP-1. *FEBS Lett* 402(1):53-56
- Kubota H, Hynes G, Willison K (1995) The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukariotic cytosol. *Eur. J. Biochem* 230: 3-16
- Ladueña RF, Banerjee A, Khan IA (1992). Tubulin structure and biochemistry. *Curr Opin Cell Biol* 4:53-57
- Langston AW, Thompson JR, Gudas LJ (1997) Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the HoxA and HoxB homeobox genes clusters. *J Biol Chem* 272: 2167-2175
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H.(1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13(4):1095-1107
- Lasky LA (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 64:113-139
- Lawson KA, Pedersen RA (1987). Cell fate, morphogènic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. *Development* 101, 627-652.
- Le Douarin N (1973) A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol* 1973 Jan;30(1):217-22
- Le Douarin NM (1986) Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* Mar 28;231(4745):1515-22
- Le Douarin NM i Jotereau FV (1975) Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* 142(1): 17-40
- Lehmann FE (1926) Entwicklungsstörungen in der Medullaranlage von Triton, erzeugt durch Unterlagerungsdefekte. *Roux's Arch* 108:243-283

Lehmann FE (1928). Die Bedeutung der Unterlagerung für die Entwicklung der Medullarplatte von Triton. *Roux's Arch* 113:123-171

Lele Z, Hartson SD, Martin CC, Whitesell L, Matts RL, Krone PH (1999). Disruption of zebrafish somite development by pharmacologic inhibition of Hsp90. *Dev Biol* 210(1):56-70

Levin M. (1997) Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *Bioessays* Apr;19(4):287-96

Levine, A. , Cantoni, G.L. and Razin, A. (1992) Methylation in the preinitiation domain suppresses gene transcription by an indirect mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 10119-10123

Lewin B (2000). *Genes VII*. Oxford University Press. New York

Lewis MT, Ross S, Strickland PA, Snyder CJ, Daniel CW (1999). Regulated expression patterns of IRX-2, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tissue Res* 1999 Jun;296(3):549-54

Lewis SA, Tian G, Vainberg IE, Cowan NJ (1996) Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol* 132: 1-4

L'Hernault SW, Rosenbaum JL. (1985). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24(2):473-478

Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-365

Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A (2001). Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 409: 847-849

Liang P, Pardee AB (1992). Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-970

Liaubet L, Bertrand N, Medevielle F, Pituello F (2000). Identification by differential display of a chicken tolloid-related metalloprotease specifically expressed in the caudal notochord. *Mech Dev* 96(1):101-5

Lindquist S (1986).The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-91

Liu C, Liu W, Lu MF, Brown NA, Martin JF (2001) Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* 128(11):2039-48

Loones MT, Chang Y, Morange M (2000) The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones* 5(4):291-305

Loones MT, Rallu M, Mezger V, Morange M (1997) HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell mol life sci* 53: 179-190

Luduena RF, Zimmermann HP, Little M. (1988). Identification of the phosphorylated beta-tubulin isotype in differentiated neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 230(1-2):142-146

Manes C (1977) Nucleic acid synthesis in preimplantation rabbit embryos: III A "dark period" immediately following fertilization and early predominance of low molecular weight RNA synthesis. *J Exp Zool* 201: 247-258.

Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven, CT

Marshall H, Morrison A, Studer M, Popperl H, Krumlauf R (1996) Retinoids and Hox genes *FASEB J* 10 (9): 969-978

Martinez Arias A (2001). Epithelial Mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell* 105: 425-433

Masuda-Nakagawa LM, Gröger H, Aerne BL, Schmid V (2000). The hox-like gene *Cnox2-Pc* is expressed at the anterior region in all life cycle stages of the jellyfish *Podocorne carnea*. *Dev Genes Evol* 210:151-156

Maves L, Schubiger G (1998) . A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling. *Development* 125(1):115-24

Mavrothalassitis G, Ghysdael J (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* 19(55):6524-32

McClelland M, Welsh J (1994). RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Applic* 4: s66-s81

- McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37(2):403-408
- McGuire JA, Poellinger L, Wikstrom AC, Gustafsson JA (1992). Cloning and regulation by glucocorticoid receptor ligands of a rat hsp90. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42(8):813-822
- McMullin, T.W. and Hallberg, R.L. (1987). A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4414-4423
- Memili E, First NL (1998) Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amantin on embryo development. *Mol Reprod Dev* 51(4): 381-389
- Michaud S, Marin R, Tanguay RM (1997) Regulation of heat shock gene induction and expression during *Drosophila* development. *Cell mol life sci* 53: 104-113
- Min JN, Han MY, Lee SS, Kim KJ, Park YM (2000). Regulation of rat heat shock factor 2 expression during the early organogenic phase of embryogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1494:256-262
- Mirkes PE (1987). Hyperthermia-induced heat shock response and thermotolerance in postimplantation rat embryos. *Dev Biol* 119(1):115-122
- Mizuno K, Shirogane T, Shinohara A, Iwamatsu A, Hibi M, Hirano T (2001) Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (3): 663-669.
- Mizuno T, Yamaha E, Kuroiwa A, Takeda H (1999) Removal of vegetal yolk causes dorsal deficiencies and impairs dorsal-inducing ability of the yolk cell in zebrafish. *Mech Dev* 81(1-2):51-63
- Moon RT, Kimelman D (1998). From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *Bioessays* 20(7):536-545
- Morimoto RI (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410
- Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* 267: 21987-21990

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997 Mar 21;275(5307):1787-1790

Münster PN, Srethapakdi M, Moasser MM, Rosen N (2001) Inhibition of heat shock protein 90 function by ansamycins causes the morphological and functional differentiation of breast cancer cells. *Cancer Research* 61: 2945-2952

Munsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* 9(23):2911-2922

Nakai A, Morimoto RI (1993). Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* 13(4):1983-97

Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 17(1):469-481

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*;393(6683):386-389

Neckers L, Mimnaugh E, Schulte TW (1999b). Hsp90 as an anti-cancer target Drug Resistance updates 2:165-172

Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E (1999a). Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs* 17(4):361-373

Neel BG, Tonks NK (1997) Protein tyrosine phosphatase in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9: 193-204

Neumann C, Cohen S (1997) Morphogens and pattern formation. *Bioessays* 1997 19(8):721-729

Nicchitta CV (1998). Biochemical, cell biological and immunological issues surrounding the endoplasmic reticulum chaperone GRP94/gp96. *Curr Opin Immunol* 10(1):103-109

Nicholas JS (1942) Experimental methods and rat embryos . A The rat in laboratory investigation. JP. Lippincott Company, Philadelphia

- Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264(5160):835-9
- Nishida E, Koyasu S, Sakai H, Yahara I. (1986). Calmodulin-regulated binding of the 90-kDa heat shock protein to actin filaments. *J Biol Chem* 261(34):16033-16036
- Niswander L, Martin GR (1992). Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* 114, 755-768
- Noordermeer J, Johnston P, Rijsewijk F, Nusse R, Lawrence PA (1992) The consequences of ubiquitous expression of the wingless gene in the *Drosophila* embryo. *Development* 116(3):711-719
- Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260): 23-28
- Nuccio ML, Thomas TL (1999). *ATS1* and *ATS3*: two novel embryo-specific genes in *Arabidopsis thaliana* *Plant Mol Biol* 39(6):1153-63
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287(5785):795-801
- Ogata M, Naito Z, Tanaka S, Moriyama Y, Asano G (2000) Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma. *J Nippon Med Sch* 67(3): 177-185
- Ohno S. (1996). The notion of the Cambrian pananimalia genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)*: 8475-8478
- O'Rahilly R, Müller F (1987) *Developmental stages in human embryos*. Washington DC: Carnegie Institution of Washington Publication 637.
- O'Rahilly R, Müller F (1992) *a Human Embryology & teratology*. Ed. Wiley-Liss. New York 1992.
- Otani H, Tanaka O(1988).Development of the choroid plexus anlage and supraependymal structures in the fourth ventricular roof plate of human embryos: scanning electron microscopic observations. *Am J Anat* 181(1):53-66
- Otis EM i Brent R (1954) Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat Rec* 120: 33-63
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet* 27: 427-496

- Pascolo S, Tsoukatou D, Mamalaki C (1999) Identification of thymus specific and developmentally regulated genes by an improved version of the mRNA differential display technique *Dev Immunol* 7(1):1-7
- Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107(Pt 6):1529-1543
- Pazman C, Casteli JC, Wen X, Somogyi R (2000). Large-scale identification of differentially expressed genes during neurogenesis. *Neuroreport* 11(4):719-24
- Pelloquin L, Belenguer P, Gas N, Menon Y, Ducomun B (1999). Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin related protein. *J Cell Sci* 112, 4151-4161
- Pelloquin L, Belenguer P, Menon Y, Ducomun B (1998) Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 720-726
- Perdew GH, Hord N, Hollenback CE, Welsh MJ (1993) Localization and characterization of the 86- and 84-kDa heat shock proteins in Hepa 1c1c7 cells. *Exp Cell Res* 209(2):350-356
- Pernis BG, Chiappino G, Kelus AS, Gell PGH (1965). Cellular localization of immunoglobulins with different allotype specificities in rabbit lymphoid tissue. *J Exp Med* 122:853-875
- Peters A, Swan RC (1979). The choroid plexus of the mature and aging rat: the choroidal epithelium. *Anat Rec* 1979 Jul;194(3):325-353
- Plisov SY, Ivanov SV, Yoshino K, Dove LF, Plisova TM, Higinbotham KG, Karavanova I, Lerman M, Perantoni AO (2000) Mesenchymal-epithelial transition in the developing metanephric kidney: gene expression study by differential display. *Genesis* 27(1):22-31
- Popperl H, Featherstone MS (1993) .Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine Hox-4.2 gene. *Mol Cell Biol* 13(1):257-65
- Pratt WB, Toft DO (1997). Steroid receptors interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18: 306-360
- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90: 65-75

Pugh BF (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 2000 Sep 5;255(1):1-14

Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C (1991). Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16):6906-10

Rallu M, Loones M, Lallemand Y, Morimoto R, Morange M, Mezger V (1997). Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2392-7

Ralph D, Welsh J, McClelland M (1993) RNA fingerprinting using arbitrary primed PCR identifies regulated Rnase in Mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by TGF . *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10710-10714

Ramsay G, Evan GI, Bishop JM (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci (PNAS)* 81 (24) 7742-7746

Ramsdell AF, Yost HJ. (1998) Molecular mechanisms of vertebrate left-right development *Trends Genet*;14(11):459-65

Redmond T, Sanchez ER, Bresnick EH, Schlesinger MJ, Toft DO, Pratt WB, Welsh MJ.(1989). Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 50(1):66-75

Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, Weill JC (1989). Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59(1):171-183

Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C (1995). Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 121(10):3163-74

Rodaway A, Takeda H, Koshida S, Broadbent J, Price B, Smith JC, Patient R, Holder N (1999). Induction of the mesoderm in the zebrafish germ ring by yolk-cell-derived TGF-family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* 126: 3067-3068

Romano LA, Runyan RB (1999). Slug is a mediator of epithelial-mesenchymal cell transformation in the developing chicken heart *Dev Biol* 212(1):243-54

Roperch JP, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuyndes M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron MC, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A. (1999). SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding,

unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21^{Waf1}. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8070-8073

Rosales C, Juliano RL (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. J Leukocyte Biol 57(2) 189-198

Rosenquist GC (1971). The location of the pregut endoderm in the chick embryo at the primitive streak stage as determined by radioautographic mapping. Dev Biol. 26, 323-335

Ruberte E, Dolle P, Krust A, Zelent A, Morriss-Kay G, Chambon P (1990). Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. Development 108(2):213-222

Rubin GM.(2001) Comparing especies. Nature 409: 820-821

Rudiger M, Plessman U, Kloppel KD, Wehland J, Weber K. (1992). Class II tubulin, the major brain beta tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. FEBS Lett 308(1):101-105

Ruvkun G, Hobert O (1998). The taxonomy of developmental control in caenorhabditis elegans. Science 282:2033-2041

Ryu SL, Fujii R, Yamanaka Y, Shimizu T, Yabe T, Hirata T, Hibi M, Hirano T (2001).Regulation of dharma/bozozok by the Wnt pathway. Dev Biol 231(2):397-409

Sager R (1997). Expression genetics in cancer: Shifting the focus from DNA to RNA. PNAS 94: 952-955

Sanchez ER, Redmond T, Scherrer LC, Bresnick EH, Welsh MJ, Pratt WB (1988). Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. Mol Endocrinol 2:756-760

Sarge KD, Cullen KE (1997). Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. Cell mol life sci 53: 191-197

Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. Mol Cell Biol 13(3):1392-407

- Sarge KD, Park-Sarge OK, Kirby JD, Mayo KE, Morimoto RI (1994). Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 50(6):1334-43
- Sarto C, Binz PA, Mocarelli P (2000) Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 21: 1218-1226.
- Sass JB, Weinberg ES, Krone PH (1996). Specific localization of zebrafish hsp90 mRNA to myoD-expressing cells suggests a role for hsp90 during normal muscle development. *Mech Dev* 54: 194-204
- Sass JB, Weinberg ES, Krone PH (1996). Specific localization of zebrafish hsp90 alpha mRNA to myoD-expressing cells suggests a role for hsp90 alpha during normal muscle development. *Mech Dev* 54(2):195-204
- Schier AF (2001a). Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 2001 Aug;11(4):393-404
- Schier AF, Talbot WS (2001b). Nodal signaling and the zebrafish organizer. *Int J Dev Biol* 45(1Spec No):289-297
- Schirone RC, Gorss L (1968). Effect of temperature on early embryological development of the zebrafish; *Brachydanio rerio*. *JExp Zool* 169:43-52
- Schneider B i Norton S (1979). Equivalent ages in Rat, mouse and Chick embryos. *Teratology* 19: 273-278
- Schneider S, Steinbeisser H, Warga RM, Hausen P (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* 57(2):191-198
- Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kingston RE (1991). Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16):6911-5
- Schultz RM (1993) Regulation of zygotic gene activation in mouse. *BioEssays*, 15: 531-538
- Schweinfest CW, Graber MW, Henderson KW, Papas TS, Baron PL, Watson DK (1998) Cloning and sequence analysis of Hsp89alpha DeltaN, a new member of the Hsp90 gene family. *Biochem Biophys Acta* 1398 (1): 18-24

- Shen M (2001) Identification of differentially expressed genes in mouse development using differential display and in situ hybridization. *Methods* 24:15-27
- Shen MM, Wang H, Leder P (1997) A differential display strategy identifies *Cryptic*, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* 124: 429-442
- Shinya M, Eschbach C, Clark M, Lehrach H, Furutani-Seiki M (2000). Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* 98(1-2):3-17
- Siegfried Z, Eden S, Mendelson M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H (1999) DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 22 (2), 203-206
- Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI (1992). Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 12(9):4104-11
- Siveter DJ, Williams M, Waloszek D (2001). A phosphatocopid crustacean with appendages from the Lower Cambrian. *Science* 293(5529):479-481
- Smalley MJ, Sara E, Paterson H, Naylor S, Cook D, Jayatilake H, Fryer LG, Hutchinson L, Fry MJ, Dale TC (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J* 18(10):2823-2835
- Sokolov BP, Prockop DJ (1994) A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNA s from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 22: 4409-4015
- Spemann H, Mangold H (1924). Über induktion von Embryoanlagen durch Implantation art fremder Organisatoren. *Arch Mikrosk Anat Entw Mech* (Versió traduïda al anglés: Spemann H, Mangold H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Int J Dev Biol* 45: 13-38 (2001))
- Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57: 827-872
- Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targetting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89: 239-250

- Sternlicht H, Farr GW, Sternlicht ML, Driscoll JK, Willison K, Yaffe MB (1993). The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20):9422-9426
- Stone B, Warthon W (1994). Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res* 22: 2612-2618
- Sutovski P, Moreno RD, Ramalho Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402: 371-372
- Tabata T (2001) Genetics of morphogen gradients. *Nature Rev Genet* 2001,; Aug 2(8): 620-630
- Taipale J, Beachy PA (2001). The hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354.
- Tam PP, Behringer RR (1997). Mouse gastrulation: the formation of mammalian body plan. *Mech Dev* 68:3.25
- Tang PZ, Gannon MJ, Andrew A, Miller D (1995). Evidence for oestrogenic regulation of heat shock protein expression in human endometrium and steroid-responsive cell lines. *Eur J Endocrinol* 133(5): 598-605
- Tate PH, Bird AP (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3:226-231
- Teleman AA, Cohen SM (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* 103(6):971-80
- Telerman A, Tuynder M, Dupressoir T, Robaye B, Sigaux F, Shaulian E, Oren M, Rommelaere J, Amson R. (1993) A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8702-6
- The arabidopsis genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. Sequence and analysis of the genome of *C. elegans*. *Science* 282, 2012-2018 (1998)

- Theisen H, Haerry TE, O'Connor MB, Marsh JL (1996) Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* 122(12):3939-3948
- Thomas SR, Lengyel JA (1986). Ecdysteroid-regulated heat shock gene expression during *Drosophila Melanogaster* development. *Dev Biol* 115:434-438
- Thomsen G, Woolf T, Whitman M, Sokol S, Vaughan J, Vale W, Melton DA (1990). Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63(3):485-93
- Trent JD, Nimmesgern E, Wall JS, Hartl FU, Horwich AL (1991). A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature* Dec 12;354(6353):490-3
- Tupler R., Perini G, Green MR (2001) Expressing the human genome. *Nature* 409, 832-833
- Valentine JW, Jablonski D, Erwin DH. (1999) Fossil, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. *Development* 126: 851-859
- Vamvakopoulos NO (1993). Tissue-specific expression of heat shock proteins 70 and 90: potential implication for differential sensitivity of tissues to glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 98(1):49-54
- Van Blerkom J, Brockway GO (1975) Qualitative pattern of protein synthesis in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 44: 148-157
- Van der Blik AM (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* 9: 96-102
- Vanmuylder N, Evrard L, Daelemans P, Van Reck J, Dourov N (2000). Expression of heat shock proteins in salivary gland tumors. Immunohistochemical study of HSP27, HSP70, HSP90, and HSP110: apropos of 50 cases. *Ann Pathol* 20(3):190-5
- Venter JC et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 2001 Feb 16;291(5507):1304-51
- Wagner GP (2000). What is the promise of developmental evolution? Part I: why is developmental biology necessary to explain evolutionary innovations? : *J Exp Zool* 288(2):95-8

Walker, E.L. (1998) Paramutation of the *r1* locus of maize is associated with increased cytosine methylation. *Genetics* 148, 1973-1981

Walker, E.L. , Eggleston, W.B., Demopoulos, D., Kermicle, J.L. and Dellaporta, S.L. (1997) Insertions of a novel class of transposable elements with a strong target site preference at the *R* locus of maize. *Genetics* 146, 681-693.

Walker, E.L., Robbins, T.P., Bureau, T.E., Kermicle, J. and Dellaporta, S.L. (1995) Transposon mediated chromosomal rearrangements and gene duplications in the formation of the maize *R-r* complex. *EMBO Journal* 14, 2350-2363.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242(4884):1427-1430

Walsh CP, Bestor TH (1999). Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* 13:26-34.

Wataba K, Saito T, Fukunaka K, Ashihara K, Nishimura M, Kudo R (2001) Over-expression of heat shock proteins in carcinogenic endometrium . *Int J Cancer* 91 (4): 448-456

Watson JD, Crick FHC (1953a) Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738

Watson JD, Crick FHC (1953b) Genetic implications of the structure of DNA. *Nature* 171: 964-967

Weiler E (1965). Differential activity of allelic gamma-globulin genes in antibody-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:1765-1772.

Welsh J, Chada K, S.Dalal S, Cheng R, Ralph D, McClelland M (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Research* 20 (19), 4965-4970

Whatley FR (1981). The establishment of mitochondria: *Paracoccus* and *Rhodospseudomonas*. *Ann N Y Acad Sci*;361:330-40

Wieland I, Bolger G, Asouline G, Wigler M (1990) A method for difference cloning: gene amplification following subtractive hybridization *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2720-2724

Williams NE, Nelsen M (1997). HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and cortex of *Tetrahymena*. *J Cell Sci* 110: 1665-1672

- Wilson ME, Sonstegard TS, Smith TP, Fahrenkrug SC, Ford SP (2000). Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. *Genesis* 26 (1):9-14
- Witschi E (1962) A Growth VII. Pre-Natal vertebrate Development (ed. PL Altman i DS Dittmer) Biological handbooks of the federation of american societies for experimental biology, Washington DC
- Wu C (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*;11:441-69
- Xu Y, Lindquist S(1993). Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15):7074-8
- Yamaguchi TP, Rossant J (1995) . Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* 5: 485-491
- Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G (1996) Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer *Jpn J Cancer Res* 87(9): 908-915
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997) Cytosine methylation and ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13(8): 335-40
- Yokota S, Yanagi H, Yura T, Kubota H (1999) Cytosolic chaperonin is upregulated during cell growth: preferential expression and binding to tubulin at G1/S transition through early S phase. *J Biol Chem* 270: 37070-37078
- Yokota S, Yanagi H, Yura T, Kubota H (2000) Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *Eur J Biochem* 267: 1658-1664
- Yokoya F, Imamoto N, Tachibana T, Yoneda Y (1999). beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell* 10(4):1119-1131
- Yoshioka H, Meno C, Koshiba K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina EV, Murray JC, Hamada H, Noji S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94(3):299-305
- Youn BW, Malacinski GM (1981). Axial structure development in ultraviolet-irradiated (notochord-defective) amphibian embryos. *Dev Biol* 83(2):339-352

Yufu Y, Nishimura J, Nawata H (1992) High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk Res* 16 (6-7): 597-605

Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1996). Adhesion and Signaling in Vascular Cell-Cell Interactions. *J. Clin. Invest.* 98(8):1699-1702

Zimmermann JW, Schultz RM (1994). Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12):5456-60