

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

CARACTERIZACIÓN DE *SEPTIN 4*, UN GEN QUE  
CODIFICA UN POTENCIAL SUSTRATO DE PARKIN EN  
*DROSOPHILA*

VERÒNICA MUÑOZ I SORIANO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7  
d'abril de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Costantino Martínez Gómez
- D. José A. Botella Muñoz
- D<sup>a</sup>. Isabel Fariñas Gómez
- D. Marco Milán Kalbfleisch
- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Moltó Ruiz

Va ser dirigida per:  
D<sup>a</sup>. Nuria Paricio Ortiz

©Copyright: Servei de Publicacions  
Verònica Muñoz i Soriano


---

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7221-0

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  E VALÈNCIA

**Caracterización de *septin 4*, un gen que  
codifica un potencial sustrato de Parkin  
en *Drosophila***

MEMORIA PRESENTADA POR DÑA. VERÓNICA MUÑOZ SORIANO PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
POR LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
DIRIGIDA POR LA Dra. NURIA PARICIO ORTIZ

Valencia, Febrero 2008

---

Dra. Dña. NURIA PARICIO ORTIZ, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia

CERTIFICA: que Dña. VERÓNICA MUÑOZ SORIANO, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria bajo el título “Caracterización de *sepin 4*, un gen que codifica un potencial sustrato de Parkin en *Drosophila*”, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas y

AUTORIZA: su presentación en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas para tal fin.

Para que conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en Burjassot a 28 de enero de 2008.

Fdo. Dra. Dña. Nuria Paricio Ortiz





**A Jorge, Pati i ma mare.**

---

# *Agradecimientos*

---

En Octubre de 2001 vaig començar a recórrer el camí del doctorat i moltes heu sigut les persones que, des d'aleshores, m'heu tirat una maneta en aquest recorregut. Cadascú a la seva manera m'heu fet més lleuger aquest camí, per això vull dir-vos,

a Jorge i a la meua família, els meus pilars, els que millor sabeu com sóc i el que necessite, que m'heu oferit TOT i heu tingut la paciència de recolzar-me i animar-me tots aquests anys i, a més, s'heu mostrat encantats de fer-ho,

als membres de GMD, amb els quals, sense dubte, he establert una relació privilegiada:

als que m'acompanyeu dia a dia i amb els que compartisc molt més que feina i espai, en especial a Nuria, a tu que confiaves en mí per a aquest treball, que també t'has esforçat molt per que aquesta tesi tirara endavant i m'has ajudat a perseverar i a confiar en que al final tot ix,

a les que ja heu abandonat el laboratori, que trobe en falta i amb les que estaria encantada de tornar a treballar algun dia,

als meus nombrosos col·laboradors, als quals, pel que es veu, vaig exclavitzar massa i fugiren, desperdigant-se per diferents punts de la geografia mundial,

a la resta de membres del Departament de Genètica, als dels laboratoris, als dels despatxos i al PAS, a vosaltres que sempre m'heu dedicat un moment del vostre temps quan l'he necessitat,

a la resta d'investigadors/es que m'han prestat la seva ajuda amb diferents tipus d'informació, materials i consells tècnics,

i a les meues amigues i amics, font inesgotable de bons moments i vitamina en les hores baixes...

...MOLTES GRÀCIES per la vostra col·laboració, ajuda i estima, sols espere haver-la merescut... Bessos a tots!

*Índice*

Índice.....	1
Abreviaturas.....	7
Introducción.....	10
1. La enfermedad de Parkinson.....	11
1.1. Incidencia.....	12
1.2. Características clínicas de la enfermedad.....	12
1.3. Etiología.....	14
1.4. Genética y mecanismos de patogénesis de la EP.....	14
1.4.1. Genes asociados a la EP.....	14
1.4.2. Mecanismos de patogénesis.....	16
2. Parkin y su implicación en la EP.....	17
2.1. Función de parkin.....	18
2.2. Sustratos de parkin.....	20
2.3. Mutantes de parkin en ratón.....	21
3. <i>Drosophila</i> como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas.....	23
4. <i>Drosophila</i> como modelo de estudio de la EP.....	25
4.1. Estudios sobre la falta de función de <i>parkin</i> en <i>Drosophila</i> .....	25
4.2. Otros modelos de la EP en <i>Drosophila</i> .....	29
4.2.1. Modelos basados e la falta de función de genes.....	29
4.2.1.1. Mutantes de los genes <i>dj-1<math>\alpha</math></i> y <i>dj-1<math>\beta</math></i> .....	29
4.2.1.2. Reducción en la función del gen <i>pink1</i> .....	29
4.2.2. Modelos basados en la expresión de genes humanos.....	29
4.2.2.1. $\alpha$ -synuclein.....	29
4.2.2.2. El receptor PAEL.....	30
4.3. Implicación de los modelos de <i>Drosophila</i> en el estudio de la EP.....	32
5. SEPTIN 5.....	32
5.1. Características de la proteína septin 5.....	32
5.2. Estudio de la función de septin 5 en ratón.....	35
Objetivos.....	37
Materiales y métodos.....	39
1. Material biológico.....	40
1.1. Líneas de moscas.....	40
1.2. Cepas de <i>E.coli</i> .....	41
2. Clones de ADNc.....	41
3. Vectores.....	42

4. Cebadores.....	44
5. Anticuerpos.....	45
6. Métodos moleculares.....	45
6.1. Extracción de ADN plasmídico.....	45
6.2. Extracción de ARN.....	46
6.3. Electroforesis.....	46
6.3.1. Electroforesis de ADN.....	46
6.3.2. Electroforesis de ARN.....	46
6.3.3. Electroforesis de proteínas.....	47
6.4. Digestión de ADN.....	48
6.5. Purificación de ADN a partir de agarosa.....	48
6.6. Clonación de insertos de ADN en un vector.....	48
6.6.1. Clonación en el vector pUAST .....	48
6.6.2. Clonación en los vectores pGEX y pQE32.....	48
6.7. Amplificación de ADN por PCR.....	49
6.8. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	50
6.9. Transformación de células competentes.....	50
6.9.1. En XL1-Blue.....	50
6.9.2. En BL21.....	51
6.10. Selección de colonias transformantes.....	51
7. Métodos de determinación de la expresión de genes.....	51
7.1. Marcaje de sondas de ARN.....	52
7.2. Northern blot.....	53
7.3. Hibridación <i>in situ</i> de embriones de <i>Drosophila</i> .....	53
7.4. Hibridación <i>in situ</i> de cerebros adultos.....	56
8. Métodos histoquímicos e inmunológicos.....	57
8.1. Inclusión de cerebros adultos de <i>Drosophila</i> en parafina.....	57
8.2. Preparación de secciones frontales de cerebro.....	58
8.3. Tinción de secciones de cerebro de <i>Drosophila</i> .....	59
8.4. Tinción de cerebros enteros de <i>Drosophila</i> .....	60
8.5. Extracción de proteínas a partir de moscas.....	61
8.6. <i>Western blot</i> .....	61
8.7. Análisis microscópico de la estructura de la retina en ojo adulto.....	63
8.8. Preparación de ojos adultos para su análisis mediante microscopía electrónica de barrido.....	64
9. Métodos bioquímicos.....	65
9.1. Expresión y purificación de proteínas de fusión.....	65

9.2. Ensayo de coprecipitación.....	67
10. Métodos genéticos.....	68
10.1. Generación de líneas transgénicas.....	68
10.1.1. Microinyección de embriones de <i>Drosophila</i> .....	69
10.1.2. Selección de transformantes y localización y equilibrado de inserciones.....	71
10.2. Generación de líneas recombinantes de <i>Drosophila</i> .....	72
10.2.1. Generación de líneas recombinantes para dos inserciones.....	72
10.2.2. Generación de líneas recombinantes para una inserción UAS-Sep4 y la mutación <i>park</i> <sup>Δ21</sup> .....	73
10.3. Generación de una línea estable con los elementos UAS-Sep4 y <i>da</i> -GAL4 para la realización de un rastreo genético.....	74
11. Test de escalada.....	75
12. Test de letalidad.....	76
13. Test de longevidad.....	77
14. Herramientas informáticas.....	77
14.1. Programas informáticos de captación de imágenes.....	77
14.2. Recursos en la red.....	77
14.2.1. Páginas sobre <i>Drosophila</i> .....	77
14.2.2. Páginas para el análisis de secuencias.....	77
14.2.3. Otras direcciones.....	78
Resultados.....	79
1. Búsqueda del gen ortólogo del humano septin 5 en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	80
2. Patrón de expresión del gen <i>septin 4</i> .....	85
2.1. Determinación del patrón de expresión temporal.....	85
2.2. Determinación del patrón de expresión espacial.....	86
2.2.1. En embriones.....	86
2.2.2. En adultos.....	87
3. Análisis de la sobreexpresión de Septin 4.....	89
3.1. Generación de líneas transgénicas UAS-Sep4.....	89
3.2. Efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas.....	91
3.3. Efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en otras neuronas.....	98
3.4. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas sobre la longevidad de las moscas.....	99
3.5. Correlación entre la toxicidad de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas y la aparición de defectos de movilidad.....	100

3.6. Análisis de la sobreexpresión de Septin 4 en otros tejidos.....	103
3.6.1. Sobreexpresión de Septin 4 en tejidos no neuronales.....	103
3.6.2. Análisis de la sobreexpresión general de Septin 4.....	104
3.7. Efecto de la sobreexpresión de septin 5 en las neuronas dopaminérgicas de <i>Drosophila</i> .....	106
3.7.1. Generación de líneas transgénicas UAS-SEPT5.....	106
3.7.2. Análisis de la sobreexpresión de septin 5 en neuronas dopaminérgicas.....	108
4. Efecto de la alteración de los niveles de Parkin sobre la toxicidad de Septin 4.....	109
4.1. Análisis del aumento de los niveles de Parkin sobre la toxicidad de Septin 4.....	110
4.1.1. Generación de líneas transgénicas UAS-Park.....	110
4.1.2. Generación de una línea recombinante UAS-Sep4, UAS-Park.....	110
4.1.3. Efecto de la coexpresión de Septin 4 y Parkin en las neuronas dopaminérgicas.....	111
4.2. Análisis de la reducción de los niveles de Parkin sobre la toxicidad de Septin 4.....	114
4.2.1. Generación de recombinantes UAS-Sep4, UAS-iRdPark y TH-GAL4, UAS-iRdPark.....	115
4.2.2. Efecto de la interferencia del ARN del gen <i>parkin</i> sobre la toxicidad de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas.....	115
4.2.3. Efecto de la mutación del gen <i>parkin</i> sobre la toxicidad de Septin 4....	118
4.2.3.1. Generación de recombinantes UAS-Sep4, <i>park</i> <sup>A21</sup> .....	118
4.2.3.2. Sobreexpresión de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas en un fondo mutante heterocigoto <i>park</i> <sup>A21</sup> .....	120
4.2.3.3. Efecto de la mutación del gen <i>parkin</i> sobre los fenotipos de ojo y ala.....	122
5. Análisis bioquímico de la interacción entre Septin 4 como posible sustrato de Parkin.....	124
5.1. Análisis de la interacción física entre Septin 4 y Parkin.....	125
5.2. Detección inmunológica de Septin 4.....	126
6. Búsqueda de genes relacionados funcionalmente con Septin 4.....	128
6.1. Rastreo de falta de función para la identificación de genes relacionados con <i>septin 4</i> .....	129
6.1.1. Generación de la línea UAS-Sep4(x2), <i>da</i> -GAL4/ CyO, TM3.....	130



6.1.2. Identificación de regiones autosómicas cuya delección intensifica significativamente el fenotipo de ala de UAS-Sep4; <i>da</i> -GAL4.....	130
6.1.3. Selección de genes candidatos dentro de las deficiencias.....	132
6.1.4. Análisis de la falta de función de <i>nedd4</i> sobre el fenotipo causado por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas dopaminérgicas.....	135
6.2. Análisis de la posible interacción de Septin 4 con proteínas que interaccionan con Parkin.....	138
7. Efecto de la modificación de los niveles de dopamina sobre el fenotipo de letalidad parcial producido por la sobreexpresión ubicua de Septin 4.....	139
8. Relación de Septin 4 con otras septinas de <i>Drosophila</i> .....	144
8.1. Análisis del efecto de un incremento en los niveles de Septin 4 sobre la expresión del gen <i>septin 1</i> en embriones.....	144
8.2. Efecto de la falta de función de peanut sobre la expresión del gen <i>septin 4</i> .....	146
Discusión.....	147
1. Relación de <i>septin 4</i> con la EP.....	148
2. Expresión de <i>septin 4</i> en <i>Drosophila</i> .....	151
3. Neurotoxicidad de Septin 4.....	154
4. Toxicidad de Septin 4 en otros tejidos.....	156
5. Relación de <i>septin 4</i> con <i>parkin</i> .....	157
6. Relación de <i>septin 4</i> con otros genes.....	159
7. Implicación de <i>septin 4</i> en procesos relacionados con <i>parkin</i> .....	164
8. Relación de la toxicidad de Septin 4 con los niveles de dopamina.....	166
Conclusiones.....	168
Bibliografía.....	171

# *Abreviaturas*

## *Abreviaturas*

---

**act**= *actin*

**AD**= autosómica dominante

**AR**= autosómica recesiva

**ARJP**= autosomic recesive juvenile parkinsonism

**BDGP**= Berkeley *Drosophila* Genome Project

**BSA**= seroalbúmina bovina

**CL**= cuerpos de Lewy

**DA**= dopaminérgicas

**da**= *daughterless*

**Def**= deficiencia

**DM**= dorsomedial

**Ddc**= dopamina decarboxilasa

**DIG**= digoxigenina

**en**= *engrailed*

**EP**= enfermedad de Parkinson

**GFP**= green fluorescent protein

**GST**= glutatión S-transferasa

**GstS1**= glutatión S-transferasa S1

**His**= 6x histidina

**Hsp70**= Heat shock protein 70

**IMAGE**= Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression

**JNK**= Jun N-terminal kinase

**LB**= lysogeny broth

**L-dopa**= 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

**LRRK2**= leucin rich repeat kinase 2

**OrR**= *Oregon R*

**PAEL**= Parkin associated endothelin receptor-like

**PAL**= protocerebral anterior lateral

**PARK2**= parkin

**PBS**= phosphate-buffered saline

**PCR**= polymerase chain reaction

**PINK1**= (PTEN)-induced putative kinase 1

**pnut**= *peanut*

**PPL**= protocerebral posterior lateral

**PPM**= protocerebral posterior medium

**SEPT**= septin

**Sep**= septin

**SNARE**= soluble NSF attachment receptor

**SNC**= sistema nervioso central

**SNCA**= alpha-synuclein

**SNpc**= *substantia nigra pars compacta*

**TH**= tirosina hidroxilasa

**UAS**= upstream activating sequence

**Ub**= ubiquitina

**UCHL-1**= ubiquitin C-terminal hydrolase 1

**VUM**= ventral unpaired medium

**w**= *white*

**y**= *yellow*

*Introducción*

## **1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en una monografía publicada en 1817 por el médico británico James Parkinson (Parkinson, 2002) (Fig I.1). En este trabajo, Parkinson denomina a la enfermedad *Paralysis Agitans*, y la describe como un trastorno que produce temblores involuntarios con pérdida de la potencia muscular, tendencia a doblar el torso hacia delante y a acelerar el paso, sin que se observen alteraciones mentales o sensoriales.

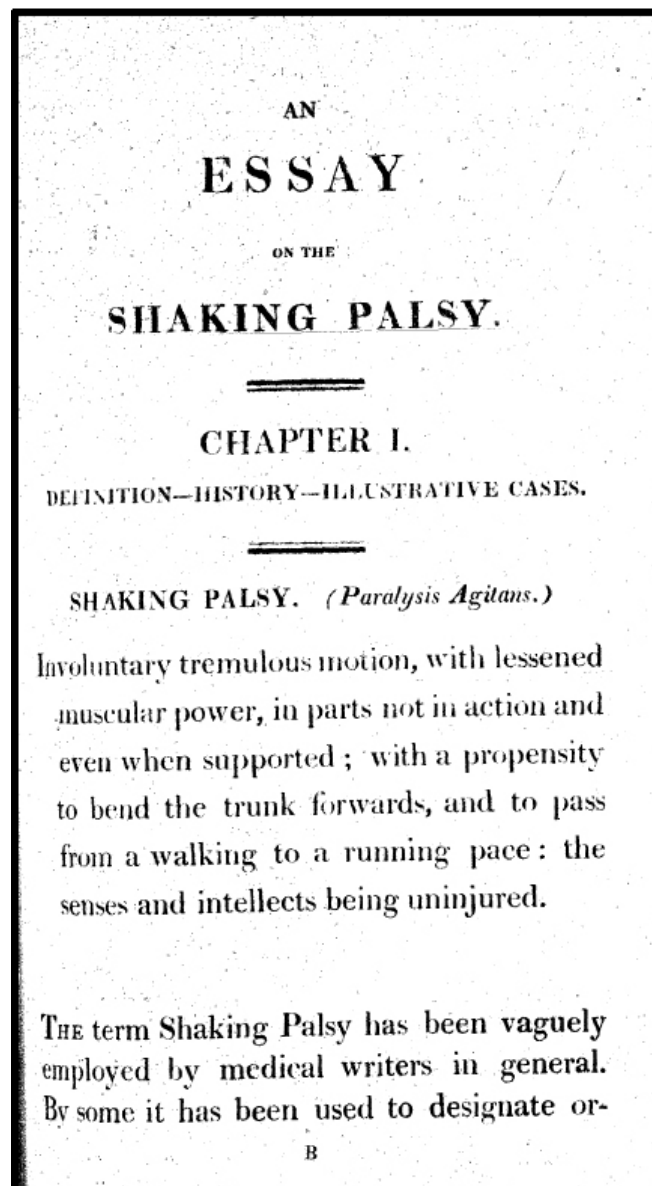


Figura I.1. Artículo original en el que se describe la EP.

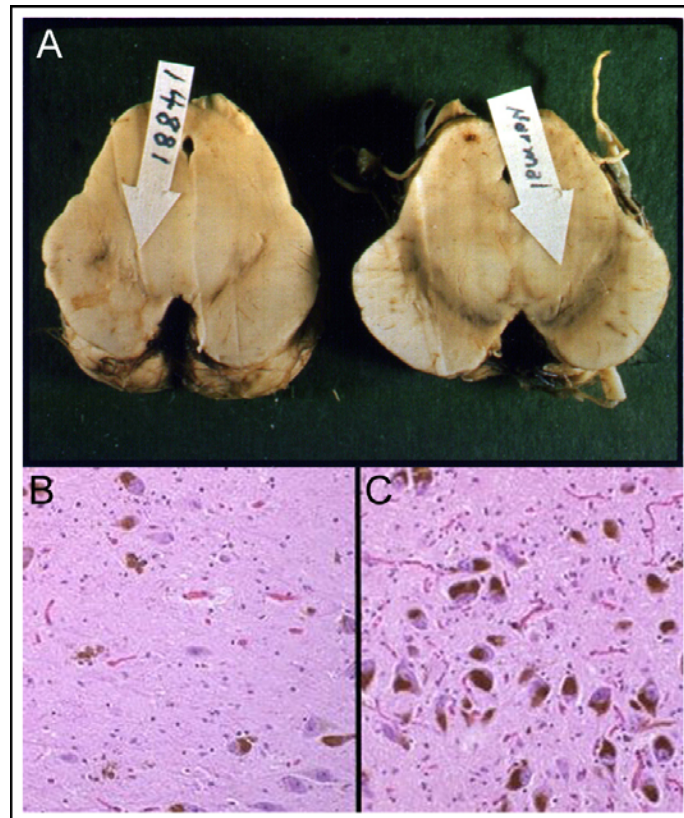
### 1.1. INCIDENCIA

La EP se incluye dentro de las denominadas enfermedades neurodegenerativas. Dentro de este grupo de enfermedades, es la segunda más común después de la enfermedad de Alzheimer. Se trata de una enfermedad progresiva, con una edad media de aparición de los síntomas de 55 años y una incidencia general de 1/10000, la cual aumenta sustancialmente hasta 12/10000 si se calcula sobre la población de 70 años (Dauer y Przedborski, 2003). Además, la aparición de los síntomas es en ocasiones muy temprana, antes de los 40 en la variante temprana de la enfermedad y antes de los 20 en la variante juvenil (ver Klein y Schlossmacher, 2006, como revisión). La distribución geográfica de la EP alcanza todas las poblaciones mundiales. Según la Federación Española de Parkinson, se calcula que sólo en España existen entre 65.000 y 80.000 afectados por esta enfermedad. Las implicaciones socio-económicas que esto conlleva han hecho que, desde el primer trabajo de Parkinson, se hayan desarrollado numerosos estudios sobre esta enfermedad con el objetivo de profundizar en sus mecanismos de patogénesis y posibles tratamientos.

### 1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Clínicamente, la EP se manifiesta por una serie de alteraciones del movimiento como son los temblores de las extremidades en reposo, la inestabilidad postural, con tendencia a flexionar el tronco, la cabeza y las extremidades, la rigidez muscular y la lentitud de movimientos o bradicinesia. Estos síntomas no siempre se presentan juntos pero pueden darse en cualquier combinación. La presencia de dos o más de estos síntomas se considera parkinsonismo. Además, estos síntomas pueden ir acompañados de otros como los trastornos del sueño, síntomas psíquicos como depresión o ansiedad, disminución de la expresividad del semblante, etc (ver Dauer y Przedborski, 2003, como revisión). El agravamiento progresivo de estos síntomas produce la dependencia del paciente y reduce su calidad de vida.

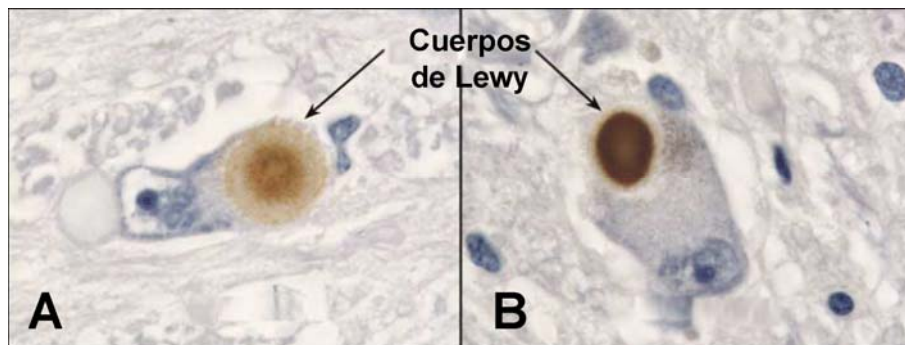
A nivel interno, la principal característica de la enfermedad es la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Fig. 1.2). Esto produce una reducción de los niveles de dopamina en el núcleo estriado, lo cual causaría los mencionados trastornos del movimiento. Se calcula que, cuando aparecen los síntomas de la enfermedad, han degenerado ya más del 50% de las neuronas DA de la SNpc y los niveles de dopamina en el núcleo estriado se han reducido en aproximadamente un 80% (Dauer y Przedborski, 2003).



**Figura 1.2. Muerte de neuronas DA en cerebros de pacientes de la EP.** (A) Imagen extraída de [www.urmc.rochester.edu](http://www.urmc.rochester.edu), desaparición de la pigmentación característica de la SNpc en cerebros de pacientes, izquierda, comparado con cerebros sanos, derecha. A nivel histológico se observa que la pérdida de pigmentación se debe a la pérdida de las neuronas DA en los pacientes, (B), respecto a individuos sanos, (C). Imágenes (B) y (C) extraídas de <http://library.med.utah.edu/WebPath>

Otra de las características de la enfermedad es la aparición de unas inclusiones proteicas intracitoplasmáticas, llamadas Cuerpos de Lewy (CL), en las neuronas supervivientes de varias regiones del cerebro pero particularmente de la SNpc (Fig. 1.3) (Dauer y Przedborski, 2003). Los CL presentan un núcleo con alta densidad proteica rodeado por un halo menos denso (Fig. 1.3) y contienen una alta concentración de la proteína  $\alpha$ -synuclein y de ubiquitina (Forno, 1996; Spillantini y col., 1998). Estas inclusiones se encuentran en la mayoría de casos de la EP, sin embargo no se detecta su presencia en cerebros de pacientes de la variante juvenil de la enfermedad (Mizuno y col., 2001).





**Figura I.3. Cuerpos de Lewy en neuronas DA de la SNpc.** Adaptada de Dauer y Przedborski (2003). Inmunodetección de CL con anticuerpos contra  $\alpha$ -synuclein (A) y ubiquitina (B)

### 1.3. ETIOLOGÍA

Aunque algunos estudios de ligamiento familiar han permitido la identificación de varios genes implicados en la EP (ver apartado 1.4.1), la mayoría de casos son esporádicos. La causa de estos casos esporádicos no se conoce con claridad aunque algunos estudios apuntan a la acción de posibles toxinas ambientales (Brown y col., 2006). Otra posibilidad es que la neurodegeneración se produzca por toxinas endógenas generadas por una alteración del metabolismo normal de ciertos compuestos (Cohen, 1984; Sandy y col., 1996; Nagatsu, 1997), por ejemplo la dopamina, cuyo metabolismo podría producir especies reactivas de oxígeno (Cohen, 1984).

### 1.4. GENÉTICA Y MECANISMOS DE PATOGÉNESIS DE LA EP

A pesar de que la mayoría de los casos de esta enfermedad son esporádicos, la especificidad del fenotipo hace pensar en la existencia de un mecanismo molecular común tanto en los casos esporádicos como en los familiares (Gandhi y Wood, 2005). Por tanto, aunque los casos familiares sólo supongan entre un 5 y un 10% del total de casos descritos de la EP, el estudio de la genética de la enfermedad ha permitido desvelar algunas rutas y procesos que podrían estar actuando en la patogénesis de ésta también en los casos esporádicos.

#### 1.4.1. Genes asociados a la EP

A lo largo de los últimos años, los estudios de ligamiento en casos raros de Parkinson familiar han permitido la identificación de varios genes implicados en la enfermedad (Klein y Schlossmacher, 2006). Como puede observarse en la tabla I.1, la identificación de varias formas monogénicas de la enfermedad ha mostrado una inesperada heterogeneidad genética y una complejidad que va en aumento, ya que

todavía quedan genes sin identificar hasta el momento, y podrían existir otras mutaciones en los genes ya identificados. Además, las mutaciones en estos genes pueden ser tanto causantes de variantes monogénicas de la enfermedad (*PARK 1-9*), como producir susceptibilidad a ella (*PARK 10-11*).

<b>Locus</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Gen</b>	<b>Herencia</b>	<b>Mutaciones identificadas</b>	<b>Referencia</b>
<i>PARK 1</i> (= <i>PARK 4</i> )	4q21-q23	<i>SNCA</i>	AD	A53T, A30P, E46K, duplicación y triplicación	(Polymeropoulos y col., 1997)
<i>PARK 2</i>	6q25.2-q27	<i>PARK2</i>	AR	Deleciones y duplicaciones de exones, mutaciones de diferentes tipos	(Kitada y col., 1998)
<i>PARK 3</i>	2p13	?	AD		(Gasser y col., 1998)
<i>PARK 5</i>	4p14	<i>UCHL-1</i>	AD	I93M	(Leroy y col., 1998)
<i>PARK 6</i>	1p35-36	<i>PINK1</i>	AR	G309D, A168P, H271Q, E417G, L347P; W437X, R246X, 1573_1574insTTA G	(Valente y col., 2004)
<i>PARK 7</i>	1p36	<i>DJ-1</i>	AR	Delección de los exones 1-5, mutaciones: L166P, M26I, E64D.	(Bonifati y col., 2003)
<i>PARK 8</i>	12p11.2-q13.1	<i>LRRK2</i>	AD	L1114L, I1122V, I1371V, I2020T, R1441C, Y1699C, R1441G, G2019S	(Funayama y col., 2002; Paisan-Ruiz y col., 2004)
<i>PARK 10</i>	1p	?	?		(Hicks y col., 2002)
<i>PARK 11</i>	2q	?	?		(Pankratz y col., 2003)
NA	5q23.1-q23.3	<i>SNCAIP</i>	?		(Marx y col., 2003)
NA	2q22-q23	<i>NR4A2</i>	?		(Le y col., 2003)

**Tabla I.1. Resumen de los genes asociados con la EP identificados hasta el momento y mutaciones encontradas en estos genes.** Adaptada de Gandhi y Wood (2005), Moore y col. (2005) y Klein y Schlossmacher (2006). AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; ?, desconocido; *SNCA*, alpha-synuclein; *PARK2*, parkin; *UCHL-1*, ubiquitin C-terminal hydrolase; *PINK1*, (PTEN)-induced putative kinase 1; *LRRK2*, leucin-rich repeat kinase 2; *SNCAIP*, synuclein alpha interacting protein (synphilin-1); *NR4A2*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2; NA, no asignado.

### 1.4.2. Mecanismos de patogénesis

Tanto los estudios de toxicidad realizados en modelos de la EP, como estudios de la posible función de los genes asociados a la enfermedad, han permitido plantear dos hipótesis sobre el mecanismo de patogénesis de la EP. Una de las hipótesis propone que la agregación de proteínas mal plegadas, que resultarían tóxicas para la célula, sería la causante de la muerte neuronal (Fig. 1.4). Según esta hipótesis, las mutaciones patogénicas inducirían directamente conformaciones anormales de las proteínas afectadas o bien podrían dañar la maquinaria celular encargada de destruir estas proteínas anormales (como sería el caso de parkin). En este contexto, se ha visto que las chaperonas como Hsp70 (Heat shock protein) son capaces de proteger contra la neurodegeneración producida por la sobreexpresión de proteínas asociadas a la enfermedad (Auluck y col., 2002). Dado que las chaperonas pueden actuar facilitando el correcto plegamiento de las proteínas, estos resultados apoyan la hipótesis de que la toxicidad de las proteínas se deba a un mal plegamiento de éstas. La segunda hipótesis propone que la causa de la degeneración de las neuronas de la SNpc sería el estrés oxidativo provocado por una disfunción mitocondrial y por la producción de especies reactivas de diferentes moléculas (incluyendo formas oxidadas de dopamina) (Fig 1.4).

Estos dos mecanismos no son excluyentes, y uno de los objetivos de los estudios que se llevan a cabo sobre la EP es determinar los posibles puntos de interacción entre ellos. Un ejemplo de esto es el hecho que la producción de especies reactivas de oxígeno podría también afectar al correcto plegamiento de las proteínas, como ocurre en el caso de la proteína  $\alpha$ -synuclein (Giasson y col., 2000). Aunque estas especies tóxicas (bien por estrés oxidativo o por crisis energética producida por la reducción en los niveles de ATP) también podrían ser las causantes directas de la activación de los mecanismos de muerte celular programada que producirían la degeneración de la neurona (Fig. 1.4).

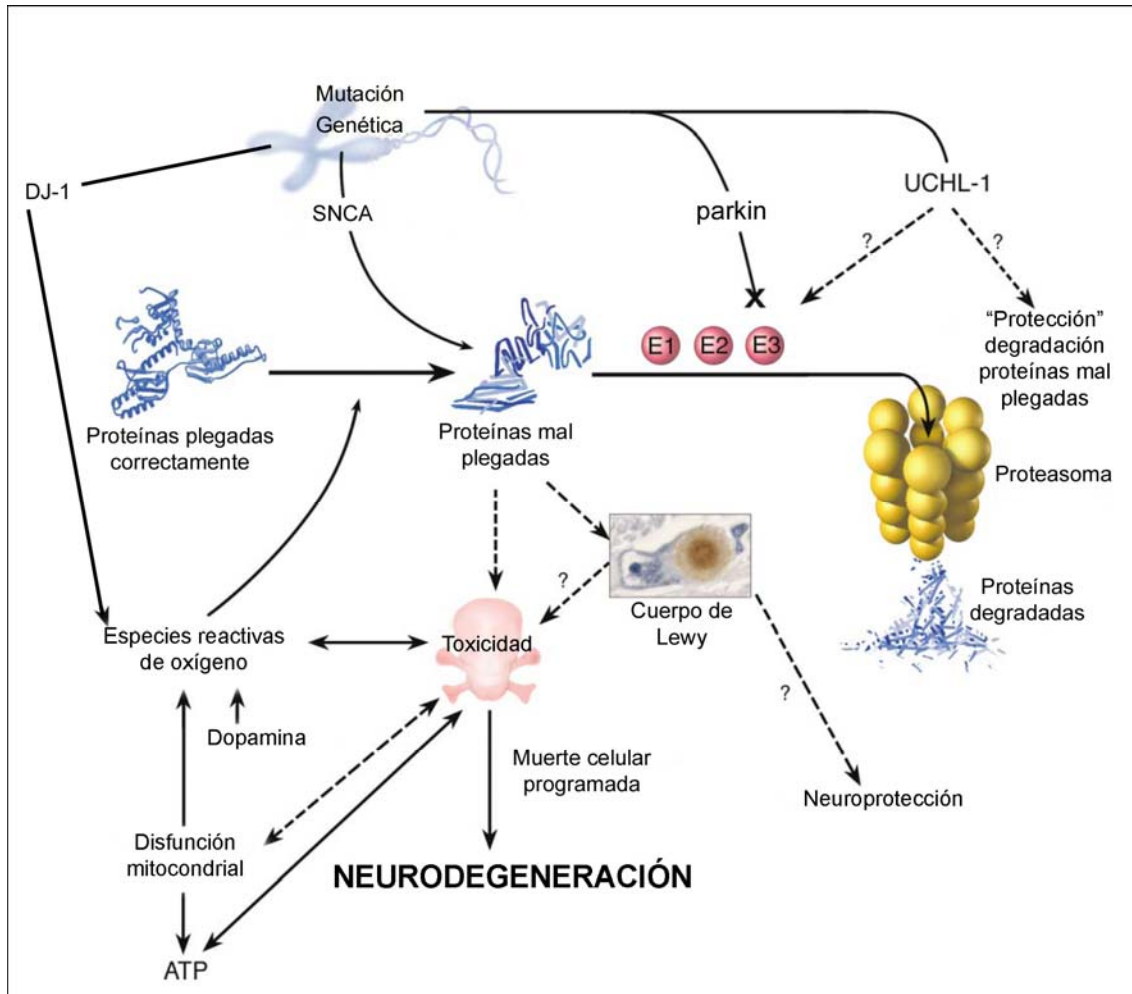
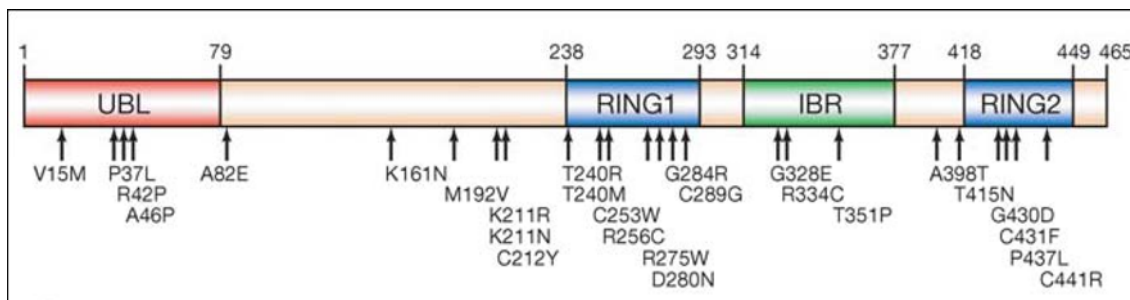


Figura I.4. Mecanismos de patogénesis propuestos para la EP. Adaptada de Dauer y Przedborski (2003).

## 2. PARKIN Y SU IMPLICACIÓN EN LA EP

Las mutaciones de falta de función en el gen *PARK2* o parkin se han descrito como las causantes de una forma autosómica recesiva juvenil de la EP (Kitada y col., 1998). *PARK2* codifica para una proteína, parkin, que pertenece a la familia de proteínas RBR (Marin y Ferrus, 2002), la cual está ampliamente representada en eucariotas (Morett y Bork, 1999; van der Reijden y col., 1999; Aguilera y col., 2000). Las proteínas de esta familia poseen un dominio funcional denominado RING-in between RINGS-RING en el extremo carboxilo terminal (Fig. I.5). Parkin, además, posee un dominio Ubl (ubiquitin-like) en la región amino terminal (Fig. I.5). Las mutaciones descritas en este gen son numerosas y se encuentran distribuidas por toda la proteína, aunque se concentran mayoritariamente en los dominios RING de la misma (Fig. I.5). Estas mutaciones representan entre el 10 y el 20% de los casos de Parkinson familiar de aparición temprana (Kitada y col., 1998; Klein y Schlossmacher,

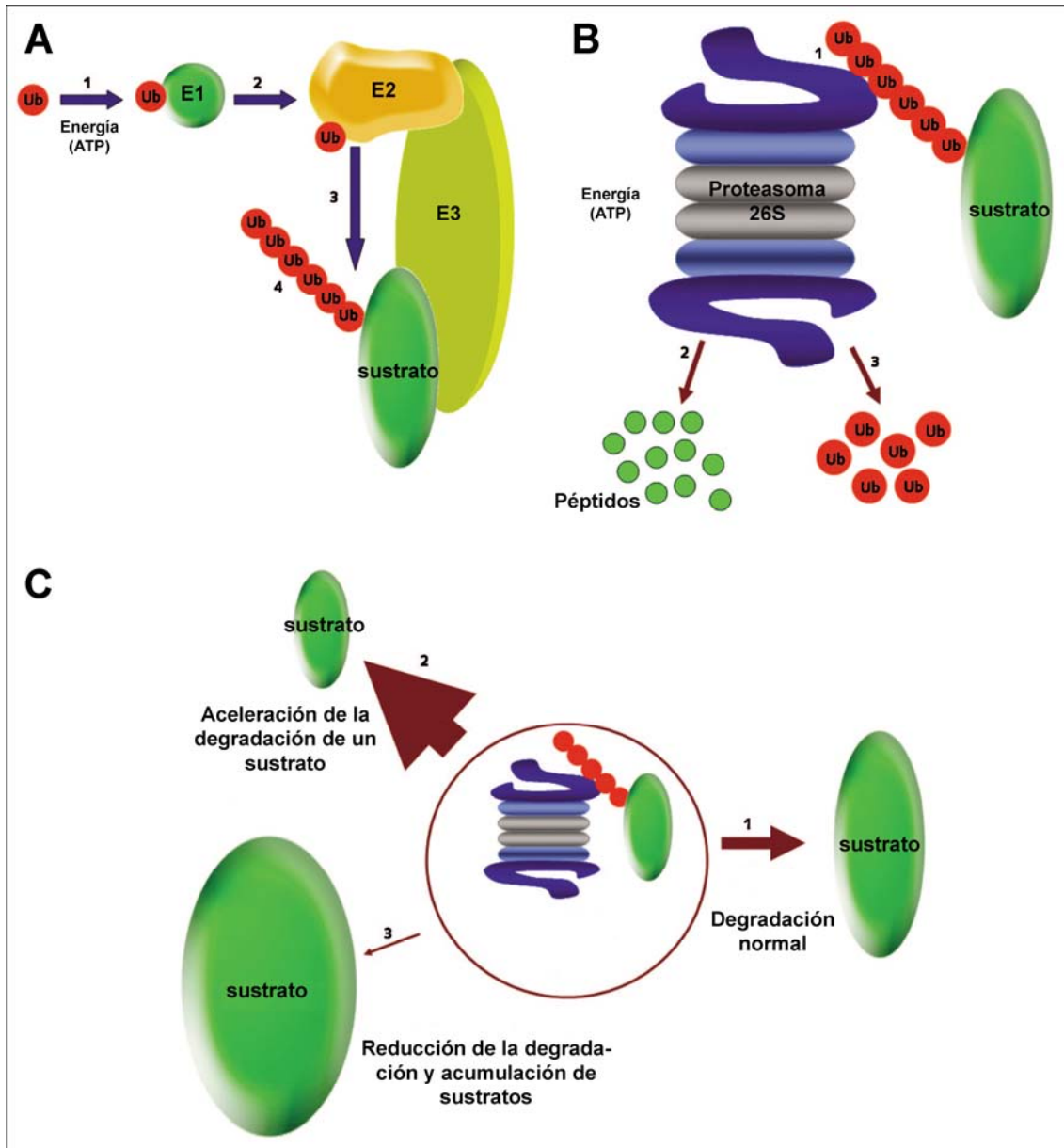
2006), en los que, por lo general, la enfermedad se manifiesta antes de los 30 años. Como se ha comentado en el apartado 1.2, este tipo de Parkinson se caracteriza, además de por la temprana edad a la que se manifiesta, por la ausencia de CL (Mizuno y col., 2001).



**Figura I.5. Dominios funcionales de la proteína parkin.** Se indican algunas de las mutaciones familiares identificadas en las que se produce un cambio de aminoácido. De Moore y col. (2005).

### 2.1. FUNCIÓN DE PARKIN

Parkin funciona como una E3 proteína-ubiquitina ligasa en la ruta proteasomal de degradación de proteínas, marcando las proteínas sustrato con moléculas de ubiquitina para su posterior degradación por el proteasoma (Fig. I.6) (Zhang y col., 2000). En esta ruta, las moléculas de ubiquitina son activadas por el enzima E1, y una vez activadas son transferidas a los enzimas E2, que son los encargados de transferir la ubiquitina a las E3 proteína-ubiquitina ligasas que la unirán a los sustratos (Fig. I.6A). Mediante varios ciclos como éste, la proteína queda marcada con una cadena de poliubiquitina, la cual es reconocida específicamente por el proteasoma (Fig. I.6B). Dado que son ellos los que interaccionan con los sustratos, los enzimas E3 de esta ruta son los que le confieren mayor especificidad a este sistema de degradación de proteínas (Fig. I.7) (ver Reinstein y Ciechanover, 2006, como revisión). En algunas ocasiones, el reconocimiento de los sustratos por los enzimas E3 no requiere ninguna modificación previa de éstos, pero en otras el sustrato sufre modificaciones post-traduccionales o cambios en su estructura antes de ser reconocido por estos enzimas (ver Glickman y Ciechanover, 2002, como revisión).

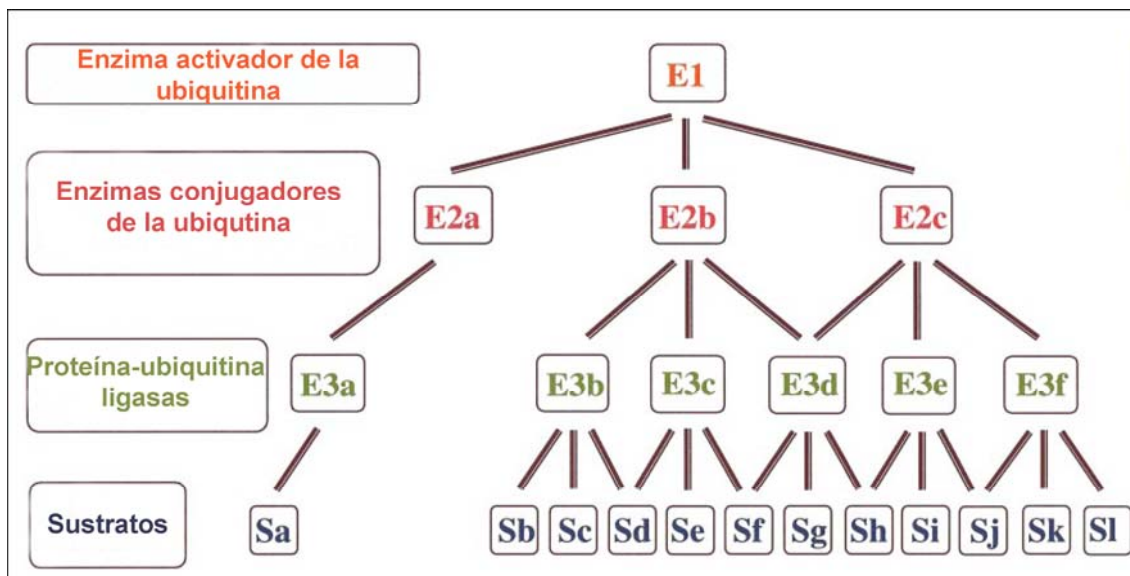


**Figura I.6. Degradación por el proteasoma de sustratos marcados con ubiquitina.** Adaptada de Reinstein y Ciechanover (2006). (A) Marcaje de los sustratos con moléculas de ubiquitina (Ub). (B) Degradación de los sustratos marcados por el proteasoma. (C) Anomalías en la degradación de sustratos por el proteasoma.

Este sistema de degradación de proteínas ha sido relacionado con diversas patologías humanas, las cuales se clasifican en dos grupos según los mecanismos que las causan (Reinstein y Ciechanover, 2006). En primer lugar, están aquellas patologías causadas por la degradación acelerada de un sustrato (Fig. I.6C). Este es el caso de algunos cánceres derivados de unos niveles anormalmente bajos del supresor de tumores p27 debido a una sobreexpresión del enzima E3 que lo reconoce. En segundo lugar, están las causadas por mutaciones de pérdida de función en algún enzima de la ruta de degradación o en algún sustrato que producen la estabilización



de estos sustratos, los cuales no se degradan (Fig. I.6C). Dentro de este grupo se encuentran la EP y el síndrome de Liddle (Reinstein y Ciechanover, 2006).



**Figura I.7. Estructura jerárquica de la maquinaria de degradación proteasomal.** Adaptada de Ciechanover (1998). Un único enzima E1 cataliza la activación de la ubiquitina y la transfiere a varios E2. En la mayoría de casos un enzima E2 puede transferir la ubiquitina a diversos E3, pero en ocasiones esta transferencia es específica. La relación entre los E3 y sus sustratos puede ser específica o, por el contrario, un E3 puede marcar varios sustratos o un sustrato ser marcado por diferentes E3.

La mayoría de mutaciones identificadas en el gen *PARK2* son de falta de función y afectan tanto a la interacción de la proteína con los enzimas E2 y con los sustratos, así como a su función como proteína-ubiquitina ligasa. Según una de las hipótesis sobre la patogénesis de la EP, las mutaciones de falta de función en el gen *PARK2* producirían una disfunción en el marcaje de sus sustratos para su degradación, de manera que se acumularían en el citoplasma celular, pudiendo ser tóxicos para las neuronas (ver Moore y col., 2005, como revisión). Por esta razón, son muchos los esfuerzos que se han dedicado a la identificación de los sustratos de Parkin.

## 2.2. SUSTRATOS DE PARKIN

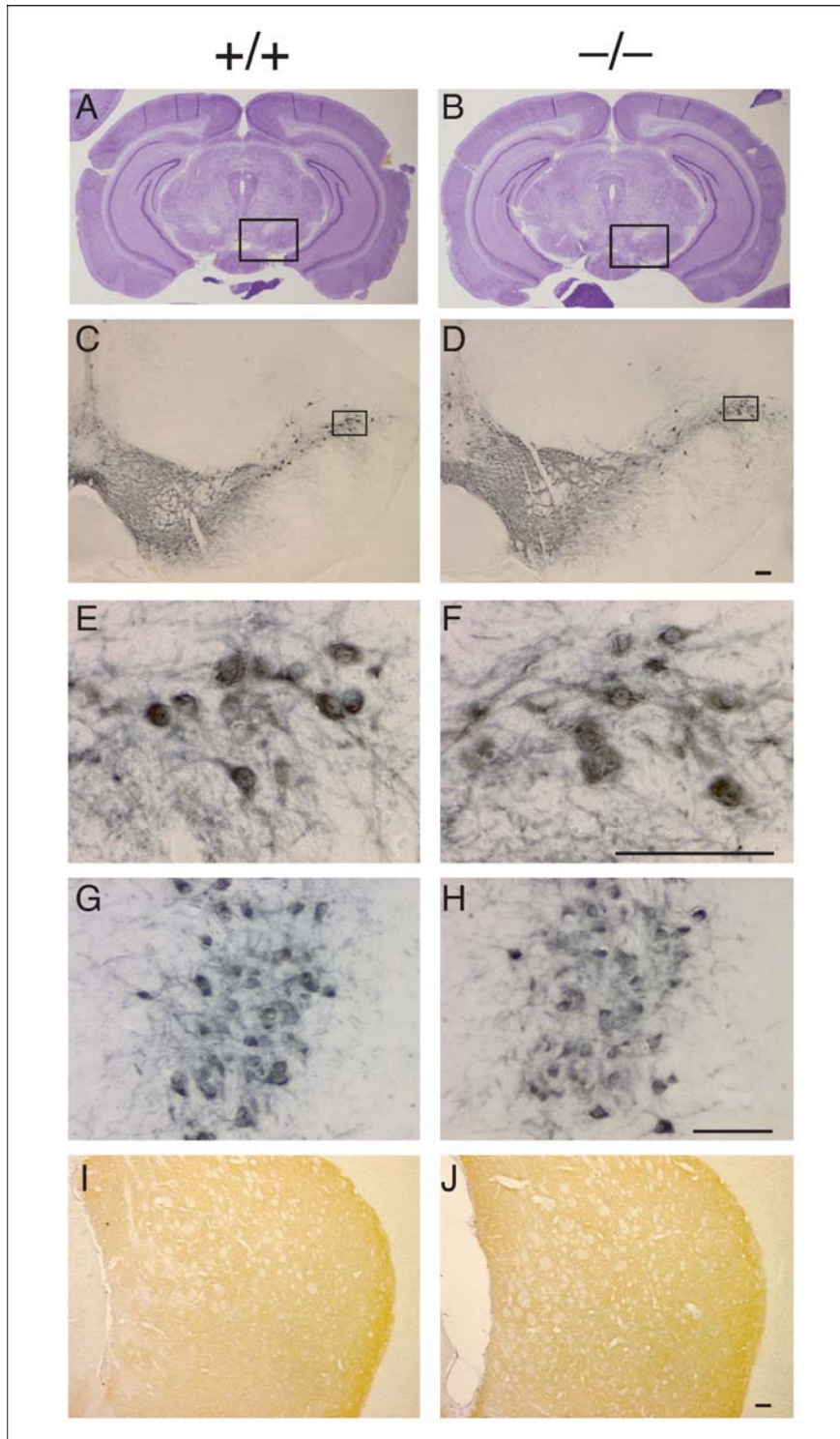
El primer sustrato de parkin que se identificó en humanos fue septin 5 (SEPT5), conocida anteriormente como CDCrel-1 (Zhang y col., 2000). Posteriormente, la lista de proteínas que son marcadas por parkin para su degradación ha ido en aumento. Entre estos sustratos encontramos las proteínas synphilin-1, una forma glicosilada de  $\alpha$ -synuclein, el receptor PAEL,  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y p38/JTV-1 (Chung y col., 2001; Imai y col., 2001; Shimura y col., 2001; Ren y col., 2003; Ko y col., 2005). El número de

sustratos identificados sorprende un poco, ya que, por lo general, los enzimas E3 suelen tener un alto grado de especificidad. Aunque estos sustratos son muy diversos y parecen tener poco en común, se ha demostrado que la acumulación de algunos de ellos puede producir toxicidad neuronal. Es el caso de SEPT5 y el receptor PAEL (Imai y col., 2001; Dong y col., 2003) (ver apartados 4.2.2.2 y 5.2 de Introducción), así como p38/JTV-1, cuya sobreexpresión en células produce agregados proteicos y en algunas ocasiones muerte celular (Corti y col., 2003). También la sobreexpresión de la proteína synphilin-1 en células es capaz de formar, junto con  $\alpha$ -synuclein, inclusiones citoplasmáticas similares a los CL (Engelender y col., 1999).

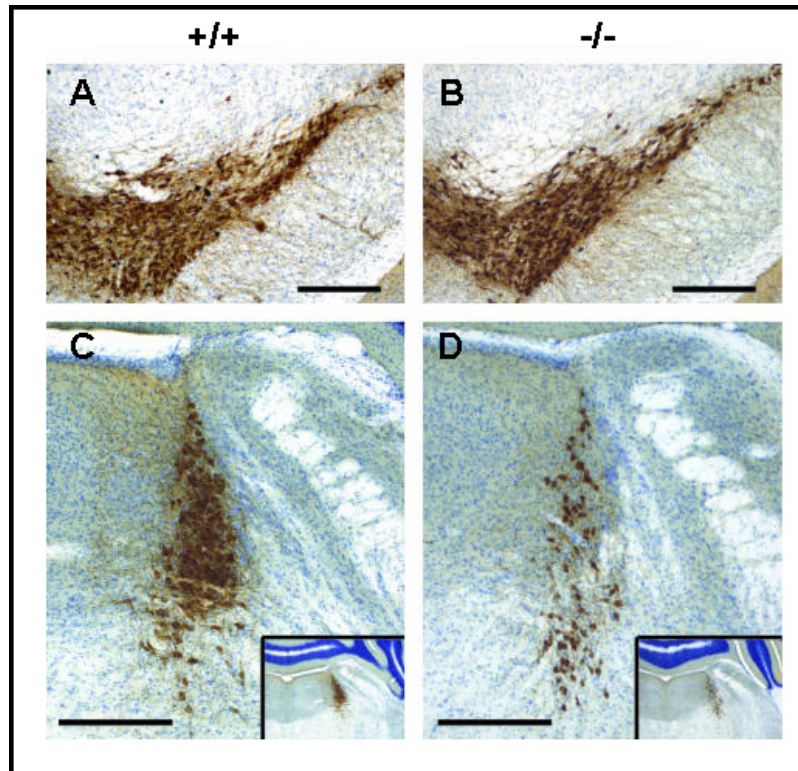
### **2.3. MUTANTES DE PARKIN EN RATÓN**

Dada la importancia de las mutaciones de falta de función de parkin, han sido varios los estudios realizados para desarrollar mutantes de este gen en animales modelo como el ratón (Goldberg y col., 2003; Itier y col., 2003; Palacino y col., 2004; Von Coelln y col., 2004) y *Drosophila* (Greene y col., 2003; Pesah y col., 2004; Cha y col., 2005). Sorprendentemente, ninguno de los mutantes desarrollados en ratón ha reproducido una de las características principales de la EP, la degeneración de neuronas DA de la SNpc. Algunos de estos mutantes padecen ligeras alteraciones tanto a nivel de comportamiento como en la neurotransmisión de dopamina y glutamato, así como un metabolismo anormal de la dopamina. Sin embargo, el número y la morfología de las neuronas DA de la SNpc no se ve alterado (Fig. I.8) (Goldberg y col., 2003; Itier y col., 2003). Por otro lado, el modelo desarrollado por von Coelln (2004) muestra una reducción en el número de neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* (Fig. I.9C y D), pero las neuronas DA de la SNpc no sufren ningún cambio (Fig. I.9A y B).





**Figura 1.8. Los mutantes *parkin*<sup>-/-</sup> de ratón no muestran degeneración de las neuronas DA de la SNpc.** De Goldberg y col. (2003). (A-B) tinciones de Nissl en secciones de cerebro de ratón a nivel de la SNpc. (C-D) inmunodetección de tirosina hidroxilasa (TH), detalle de la región enmarcada en (A) y (B). (E-F), imagen a más aumentos de la región enmarcada en (C) y (D), la morfología de las neuronas es normal. (G-J), inmunodetección de TH en el locus coeruleus, (G) y (H), y en el cuerpo estriado, (I) y (J). La barra corresponde a 0.05 mm.



**Figura 1.9. Pérdida de neuronas noradrenérgicas en mutantes *parkin* *-/-*.** Adaptada de Von Coelln y col.(2004). Inmunodetección de TH en secciones de cerebro de ratón en la SNpc, (A) y (B) y en el locus coeruleus, (C) y (D).

Por otra parte, también se observó una reducción de los niveles de proteínas de protección contra el estrés oxidativo en el cerebro de ratones mutantes *parkin* *-/-*, acompañada por una reducción de la capacidad respiratoria mitocondrial y un incremento del daño oxidativo con la edad (Palacino y col., 2004). Estos datos sugirieron un posible papel de parkin en la regulación de la función mitocondrial.

### **3. *Drosophila* COMO MODELO DE ESTUDIO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

Dado que el estudio de las enfermedades humanas resulta muy difícil debido tanto a implicaciones éticas como a problemas técnicos, el desarrollo de modelos de dichas enfermedades en otros organismos es una alternativa muy utilizada para avanzar en el conocimiento de las mismas. Entre estos organismos, la mosca *Drosophila melanogaster* se ha convertido en un modelo muy útil para estudiar y entender los mecanismos celulares y moleculares de varias patologías humanas como el cáncer (Vidal y Cagan, 2006), diversas enfermedades neurodegenerativas (Cauchi y van den

Heuvel, 2006) y cardiopatías (Wessells y Bodmer, 2007). El desarrollo en *Drosophila* de técnicas genéticas muy potentes para el estudio de la función génica, y el hecho de que comparta parte de su biología con la de los humanos, y de que su genoma contenga homólogos de aproximadamente el 75% de los genes implicados en enfermedades humanas (Reiter y col., 2001), son razones suficientes para justificar su éxito.

Un buen modelo en *Drosophila* para una enfermedad humana requiere que los procesos celulares relevantes para esa enfermedad estén razonablemente conservados entre ambos organismos. En general, se requiere que los genes implicados en la enfermedad tengan homólogos en *Drosophila*, y que su función sea similar, es decir, que mutaciones de ganancia o pérdida de función de estos genes en la mosca presenten fenotipos similares a los de la enfermedad humana. Uno de los aspectos más importante de estos modelos en *Drosophila* es que los fenotipos que recapitulan características de la enfermedad, u otros fenotipos fácilmente observables, se pueden utilizar como punto de partida para la realización de rastreos a escala genómica para la identificación de otras moléculas implicadas en la ruta de patogénesis de dichas enfermedades (revisado en Tickoo y Russell, 2002).

Los llamados desórdenes neurodegenerativos representan un subgrupo patológico, y probablemente patogénico, dentro de las enfermedades humanas. Patologías como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington se manifiestan generalmente tarde en la vida de un individuo, e implican la pérdida progresiva de poblaciones neuronales concretas. El principal objetivo de generar modelos de estas enfermedades en la mosca es la utilización de las potentes herramientas genéticas que se han desarrollado en este organismo, para identificar moléculas y rutas implicadas en la muerte neuronal que se produce en los pacientes. Para la generación de estos modelos se siguen diferentes aproximaciones:

- Selección de mutaciones con fenotipo de neurodegeneración en *Drosophila*, de manera que los homólogos humanos serán candidatos a estar implicados en desórdenes neurodegenerativos.
- Alteración de la expresión (falta de función o sobreexpresión) de homólogos en *Drosophila* de genes humanos implicados en la enfermedad.
- Expresión en la mosca de una proteína humana causante de la enfermedad, sin necesidad de manipular el homólogo en *Drosophila*.

Entre las enfermedades neurodegenerativas de las que se han desarrollado modelos en la mosca se encuentran la enfermedad de Huntington (Wyan-Ching y col., 2004), la de Alzheimer (Wittmann y col., 2001; Jackson y col., 2002), varios tipos de ataxia (Fernandez-Funez y col., 2000; Llorens y col., 2007) y la EP (ver apartado 4).

#### 4. *Drosophila* COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA EP

Dada la variedad de genes implicados en la EP, son diversos los modelos que se han generado en la mosca con el fin de desvelar los posibles mecanismos de patogénesis de ésta. Como veremos en este apartado y más adelante, para la generación de estos modelos, se han utilizado como punto de partida tanto los genes humanos responsables de las formas hereditarias de la enfermedad como sus ortólogos en la mosca, y otros genes relacionados con ellos. Como puede apreciarse en la tabla I.2, muchos de los genes asociados a la EP parecen tener homólogos en *Drosophila* (Whitworth y col., 2006).

Gen	Herencia	Homólogo en <i>Drosophila</i>	Identidad, similaridad
<i>UCH-L1</i>	AD	<i>Uch/CG4265</i>	45%, 66%
<i>PARK2</i>	AR	<i>parkin</i>	42%, 69%
<i>DJ-1</i>	AR	<i>dj-1<math>\alpha</math>, CG6646, y <math>\beta</math>, CG1349</i>	56%, 70%; 52%, 69%
<i>PINK1</i>	AR	<i>CG4523</i>	32%, 50%
<i>LRRK2</i>	AD	<i>CG5483</i>	26%, 43%

**Tabla I.2. Genes humanos asociados a la EP y sus homólogos en *Drosophila***

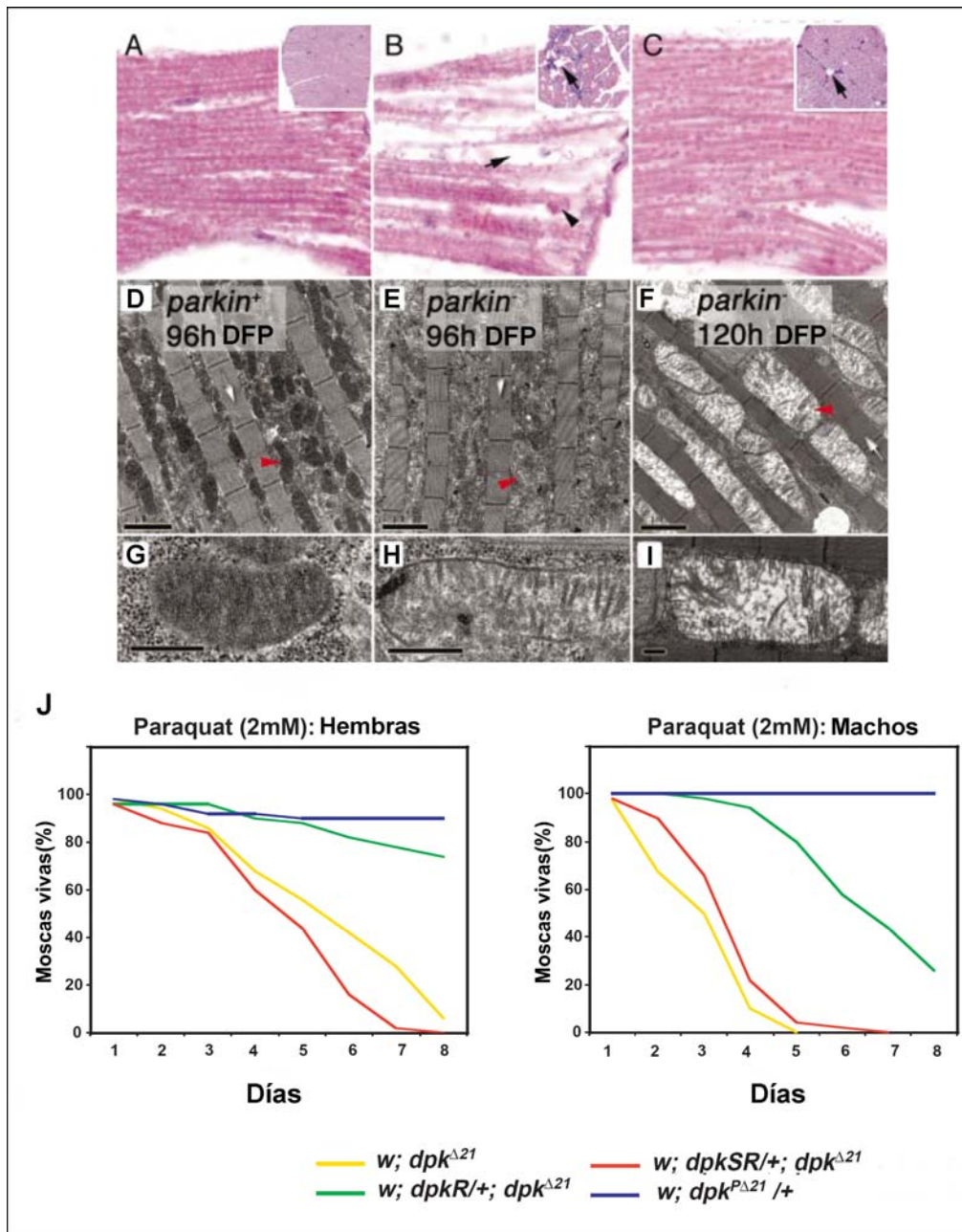
Al menos para tres de los seis genes asociados a formas hereditarias de la EP es la pérdida de función de dichos genes la que provoca la enfermedad (Tabla I.1). Debido a su simplicidad como modelo y a las herramientas genéticas desarrolladas en *Drosophila*, este organismo ha sido utilizado para el estudio de la función biológica de sus genes ortólogos en la mosca, con el fin de conocer los mecanismos por los cuales la pérdida de función de dichos genes puede desencadenar la enfermedad. Esta aproximación se ha utilizado para el estudio de los genes *parkin*, *dj-1 $\alpha$*  y  *$\beta$* , y *pink1* de *Drosophila*.

##### 4.1. ESTUDIOS SOBRE LA FALTA DE FUNCIÓN DE *parkin* EN *Drosophila*

El estudio de la función del gen *parkin* de *Drosophila* ha sido abordado en diferentes trabajos mediante la generación de mutantes (Greene y col., 2003; Pesah y col., 2004; Cha y col., 2005). El análisis del fenotipo de estos mutantes revela defectos en la habilidad motora causados por una degeneración muscular (Fig. I.10A-C). Esta degeneración muscular parece deberse a una disfunción mitocondrial (Greene y col., 2003) (Fig. 10D-I). También se puede observar en los mutantes *parkin* una reducida longevidad y esterilidad en machos derivada de un defecto en la espermatogénesis



(Greene y col., 2003; Pesah y col., 2004), así como una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (Fig. I.10J) y reducción de la masa corporal (Pesah y col., 2004).



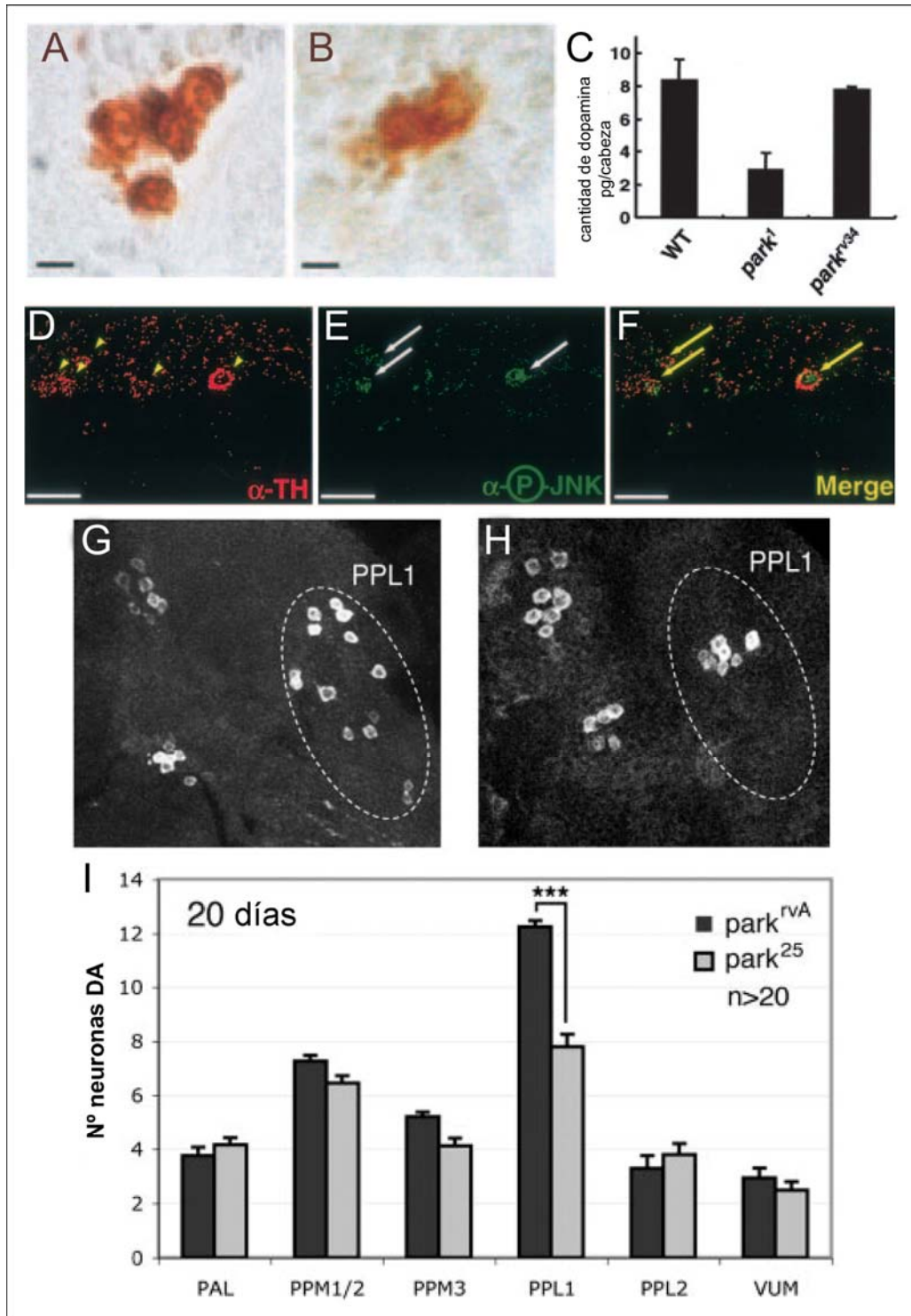
**Figura I.10. Defectos fenotípicos de los mutantes *parkin*.** (A-I), adaptada de Greene y col. (2003). (J), adaptada de Pesah y col. (2004). (A-C), tinción de hematoxilina y eosina en secciones longitudinales de los músculos indirectos del vuelo, estos músculos presentan una estructura bien preservada en controles, (A), pero no en mutantes *parkin*, (B). La sobreexpresión de Parkin en los mutantes previene esta degeneración muscular, (C). (D-I), degeneración de las mitocondrias de los músculos indirectos del vuelo a 96 y 120 horas después de la formación de la pupa (DFP). En (D) y (G), los individuos control muestran mitocondrias electrón-densas con crestas bien formadas. (E-I), los individuos mutantes presentan mitocondrias menos electrón-densas y con degeneración progresiva de las crestas. (J), sensibilidad de los mutantes al estrés oxidativo inducido por paraquat. *dpk<sup>Δ21</sup>* y *dpkSR* representan alelos nulos del gen *parkin* respectivamente, *dpkR* representa un alelo salvaje por introducción de un fragmento genómico no mutado.

Dado que la EP se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas DA, es muy significativo el hecho de que en mutantes del gen *parkin* de *Drosophila*, además de los defectos ya mencionados, también se hayan observado alteraciones en las neuronas DA de diferentes regiones del cerebro (Cha y col., 2005; Whitworth y col., 2005). Una de las regiones afectadas es el *cluster* PPM1/2 (*protocerebral posterior medium 1/2*) de neuronas DA (Fig. R.9), también conocido como *cluster* dorsomedial (DM), nomenclatura que hemos utilizado en este trabajo. Concretamente, en los mutantes *park<sup>1</sup>* estas neuronas presentan una alteración de la morfología así como una pérdida de inmunoreactividad con el anticuerpo anti-TH (Fig. I.11B) (Cha y col., 2005), indicando un claro deterioro de la integridad de estas neuronas. Además de esto, se ha visto que este efecto es dependiente de la activación de la ruta JNK (Jun N-terminal kinase), que se encuentra activada en las neuronas DA del *cluster* DM de los individuos *park<sup>1</sup>* (Fig. I.11E), y que los niveles de dopamina de estos mutantes son significativamente menores que en individuos control (Fig. I.11C) (Cha y col., 2005).

Por otra parte, se ha visto en los mutantes *park<sup>25</sup>* que la falta de función de *parkin* en *Drosophila* provoca la degeneración de las neuronas DA del *cluster* PPL1 (Whitworth y col., 2005) (Fig. I.11H). Estos resultados junto con los observados para *park<sup>1</sup>* muestran que Parkin es necesaria tanto para el mantenimiento de la integridad de las neuronas DA del *cluster* DM como para la supervivencia de este tipo de neuronas en el *cluster* PPL1. Por tanto, la falta de función de Parkin en *Drosophila* es capaz de reproducir algunos de los síntomas de la EP en humanos.

Estudios adicionales sobre estos mutantes mostraron que la neurodegeneración observada en el *cluster* PPL1 de individuos *park<sup>25</sup>* se ve agravada por la reducción de la función del enzima Glutathión S transferasa 1 (GstS1) y suprimida por su sobreexpresión (Whitworth y col., 2005). Las proteínas de la familia GST parecen estar implicados en procesos de detoxificación celular, incluyendo entre las toxinas las especies reactivas de oxígeno (Hayes y col., 2005). Estos resultados implicarían a Parkin en procesos relacionados con el estrés oxidativo.

Además de los estudios con mutantes, el estudio de la proteína Parkin de *Drosophila* ha permitido desvelar, mediante ensayos *in vitro*, que la función de ubiquitinación está conservada en la mosca (Bae y col., 2007).



**Figura I.11. Defectos neuronales en mutantes del gen *parkin*.** (A-F) Adaptada de Cha y col. (2005) y (G-I) adaptada de Whitworth y col. (2005). (A-B), neuronas DA del *cluster* DM, detección mediante tinción anti-TH. Los mutantes *park<sup>1</sup>* muestran una morfología anormal y una reducción en la intensidad de la tinción (A) respecto a los controles (B). (C), reducción de los niveles de dopamina en mutantes *park<sup>1</sup>*. (D-F), activación de la ruta JNK en neuronas DA de mutantes *park<sup>1</sup>*. La detección de la forma activada de JNK (E y F) coincide con la del anticuerpo anti-TH (D y F). (G-I), los mutantes *park<sup>25</sup>* presentan un número reducido de neuronas DA en el *cluster* PPL1 respecto a los controles *park<sup>rvA</sup>*. (G-H), detección inmunofluorescente de la TH en cerebros de mutantes *park<sup>25</sup>* (G) y controles (H). (I), representación del número de neuronas DA en los diferentes *clusters* del cerebro adulto.

## **4.2. OTROS MODELOS DE LA EP EN *Drosophila***

Además de los modelos generados en *Drosophila* con la mutación del gen *parkin*, se han desarrollado otros modelos utilizando mutantes de otros genes así como la expresión ectópica de proteínas humanas en la mosca.

### 4.2.1. Modelos basados en la falta de función de genes

#### 4.2.1.1. Mutantes de los genes *dj-1α* y *dj-1β*

El estudio de la función de los homólogos en *Drosophila* del gen *DJ-1* humano, *dj-1α* y *dj-1β*, ha sido bastante controvertido debido a discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes grupos (Kim y col., 2005; Menzies y col., 2005; Meulener y col., 2005; Park y col., 2005; Yang y col., 2005; Lavara-Culebras y Paricio, 2007). Sin embargo, a pesar de estas discrepancias, estos estudios coinciden en que los dos genes de *Drosophila*, tienen un papel en la respuesta al estrés oxidativo.

#### 4.2.1.2. Reducción en la función del gen *pink1*

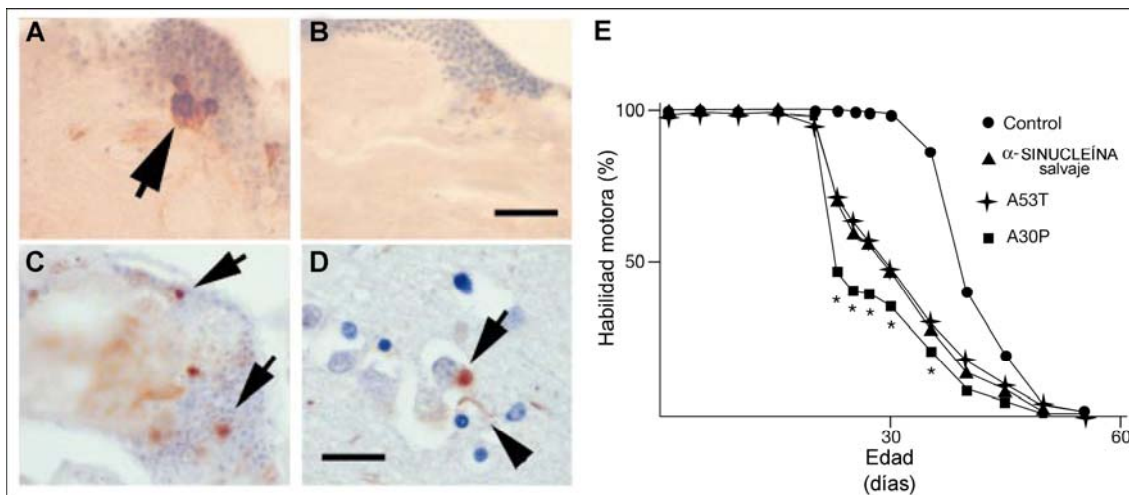
Mediante estudios de interferencia del ARN del gen *pink1* de *Drosophila* se ha podido comprobar que una reducción de la función de este gen es capaz de reproducir los fenotipos observados en los mutantes del gen *parkin*, como son la degeneración muscular y neuronal (Yang y col., 2006). Además, se ha podido comprobar que *parkin* y *pink1* interactúan genéticamente en *Drosophila* (Clark y col., 2006).

### 4.2.2. Modelos basados en la expresión de genes humanos

#### 4.2.2.1. $\alpha$ -synuclein

El gen *SNCA* fue el primero en ser asociado con la EP (Polymeropoulos y col., 1997) y también fue el primero para el cual se obtuvo un modelo en *Drosophila* (Feany y Bender, 2000). El hecho de que tanto las mutaciones en este gen como un incremento de dosis de la proteína provoquen formas dominantes de parkinsonismo indicaría que la muerte neuronal en estos pacientes puede deberse a la existencia de formas anormales de la proteína. Este primer modelo en *Drosophila* se generó con el fin de testar esta hipótesis y con él se pudo observar que la sobreexpresión tanto de la forma normal como de las formas mutadas de  $\alpha$ -synuclein, producían una degeneración de neuronas DA del *cluster* DM del cerebro adulto (Fig. I.12B) acompañada por la formación de inclusiones proteicas (Fig. I.12C) y una pérdida prematura de la habilidad motora (Fig. I.12E) (Feany y Bender, 2000).





**Figura 1.12. Pérdida de neuronas DA y correlación con la pérdida de la habilidad motora causada por la sobreexpresión de  $\alpha$ -synuclein.** Adaptada de Feany y Bender (2000). (A y B), detección inmunohistoquímica de la TH en secciones frontales de cerebro de *Drosophila* en moscas de 30 días *elav-GAL4/+*, (A), y *elav-GAL4/UAS- $\alpha$ -synuclein* (B). (C), inclusiones de  $\alpha$ -synuclein en cerebros de moscas *elav-GAL4/UAS- $\alpha$ -synuclein A30P* teñidos con un anticuerpo anti- $\alpha$ -synuclein. (D), cuerpos de Lewy en el cerebro de un paciente. (E), reducción precoz de la capacidad motora en moscas que sobreexpresan tanto la forma salvaje como las dos formas mutadas de  $\alpha$ -synuclein.

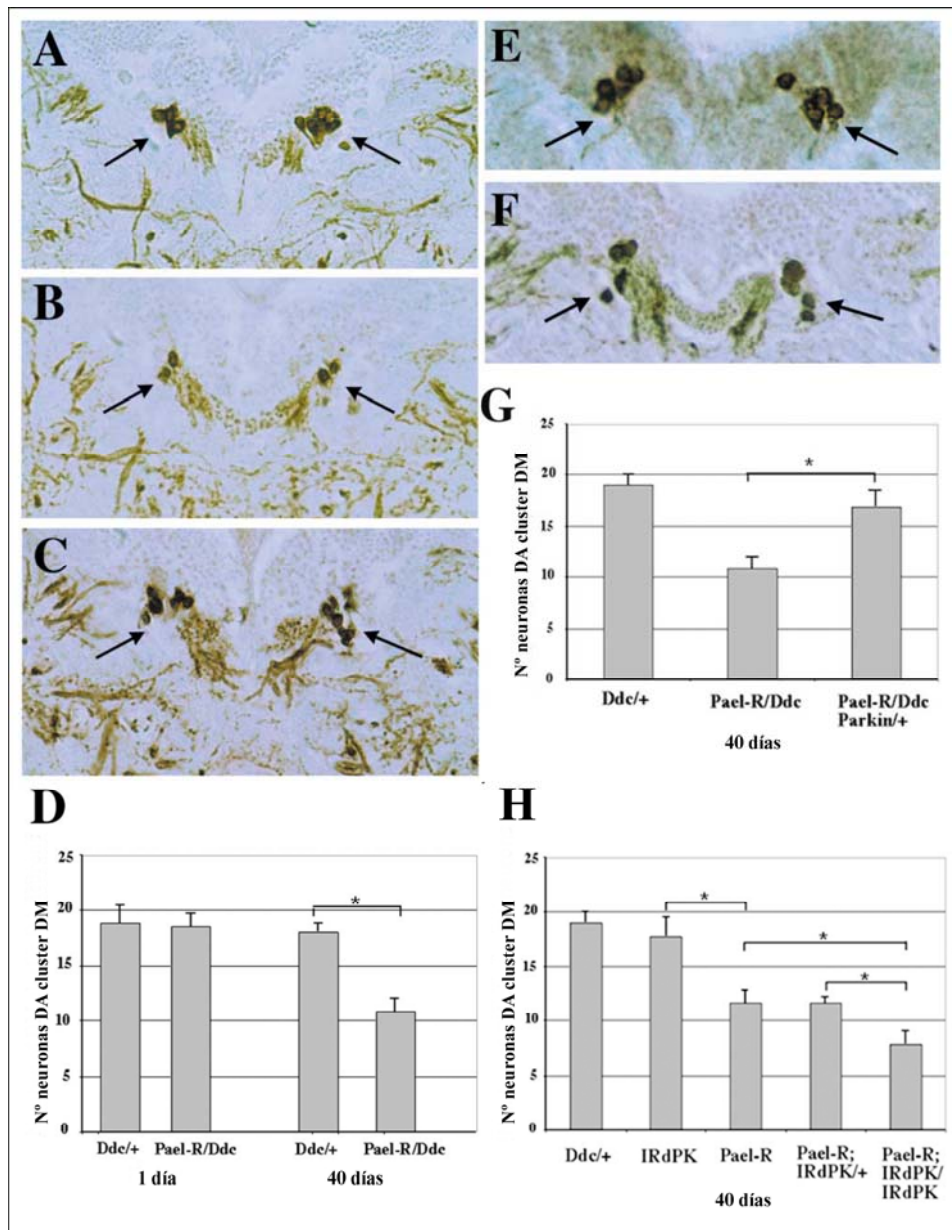
Posteriormente se ha podido observar que la sobreexpresión de la chaperona Hsp70 o de Parkin, así como la administración del compuesto geldamicina, son capaces de reducir esta toxicidad (Auluck y col., 2002; Yang y col., 2003; Haywood y Staveley, 2004). Dado que uno de los sustratos de parkin en humanos es una forma glicosilada de  $\alpha$ -synuclein, es posible que al sobreexpresar este gen en la mosca, esta proteína sea modificada de manera que la proteína Parkin de *Drosophila* es capaz de marcarla para su degradación (Haywood y Staveley, 2004).

Por otra parte, uno de los estudios sobre la toxicidad de  $\alpha$ -synuclein en las neuronas DA de *Drosophila* mostró que la diferencia en el número de neuronas del *cluster* DM observada anteriormente (Feany y Bender, 2000) se debía a una reducción en la expresión del enzima tirosina hidroxilasa, y no a una muerte neuronal como se creía inicialmente (Auluck y col., 2005).

#### 4.2.2.2. El receptor PAEL

Tal y como se ha descrito en el apartado 2.2 uno de los sustratos de parkin es el receptor PAEL (Imai y col., 2001). Según una de las hipótesis que se barajan, la acumulación de los sustratos de Parkin en los mutantes para este gen podría estar implicada en el mecanismo de patogénesis de la EP. En este contexto, se demostró que la sobreexpresión de este receptor resulta tóxica para las neuronas DA del *cluster*

DM de *Drosophila* y que esta toxicidad es dependiente de los niveles de Parkin (Yang y col., 2003) (Fig. I.13).



**Figura I.13. Degeneración de neuronas DA por sobreexpresión del receptor PAEL y efecto de la variación de los niveles de Parkin.** Adaptada de Yang y col. (2003). (A, B, C, E y F), detección inmunohistoquímica de la TH en secciones frontales de cerebro de *Drosophila* de individuos *Ddc-GAL4/+* de 40 días, (A), *Ddc-GAL4/+*; UAS-PAEL de 40 días, (B), *Ddc-GAL4/+*; UAS-PAEL de 1 día, (C), *Ddc-GAL4/+*; UAS-PAEL/UAS-parkin de 40 días, (E) y *Ddc-GAL4/+*; UAS-parkin/+ de 40 días, (F). Las flechas indican los grupos de neuronas DA. (D, G y H), diagramas que representan el número de neuronas DA en el *cluster* DM. Se puede apreciar la degeneración de estas neuronas con la edad al sobreexpresar el receptor PAEL, (D), así como la supresión de este fenotipo al coexpresar parkin, (G) y el incremento del fenotipo al reducir los niveles de Parkin mediante interferencia del ARN, (H).

### **4.3 IMPLICACIONES DE LOS MODELOS DE *Drosophila* EN EL ESTUDIO DE LA EP**

El objetivo primordial del establecimiento de modelos animales de cualquier enfermedad humana es contribuir a entender sus mecanismos de patogénesis, así como permitir establecer un punto de partida para la búsqueda de posibles dianas terapéuticas que ayuden a paliar los efectos de dichas enfermedades.

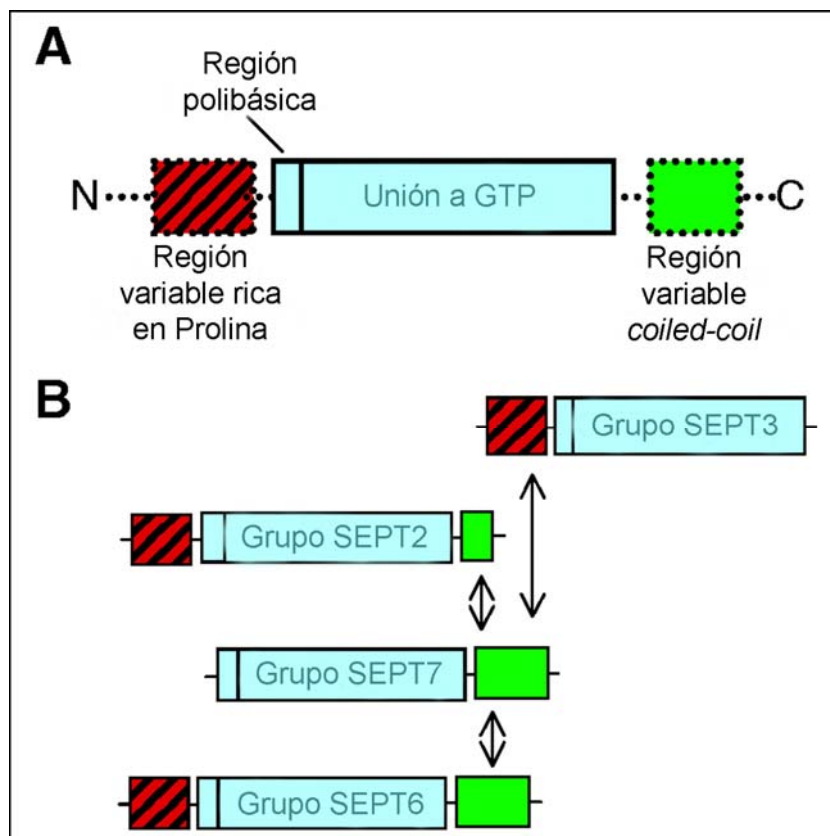
Respecto a la EP, el establecimiento de modelos en *Drosophila*, ha permitido el desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas (ver Whitworth y col., 2006, como revisión). En este sentido, los fenotipos observados en los mutantes del gen *parkin* en *Drosophila* (ver apartado 4.1 de Introducción) han abierto muchas posibilidades para la utilización de este organismo como modelo de estudio de la ruta de patogénesis de la enfermedad. Por esto, es necesario seguir empleando esfuerzos tanto en descifrar la información que los modelos ya establecidos pueden aportar como en la generación de nuevos modelos que ayuden a completar esa información y a avanzar en el conocimiento de la EP. En este sentido, la utilización de los sustratos de parkin en la mosca para generar nuevos modelos es una buena alternativa. Los modelos descritos en los apartados 4.2.2.1 y 4.2.2.2 utilizan los genes humanos *SNCA* y el del receptor PAEL, que no tienen ortólogos en la mosca, lo que podría dificultar su uso para estudios de interacciones genéticas que ayuden a elucidar la ruta de patogénesis. Por esta razón, sería interesante la generación de nuevos modelos utilizando genes de *Drosophila* que codifiquen los ortólogos de otros sustratos de la proteína parkin humana.

## **5. SEPTIN 5**

### **5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA SEPTIN 5**

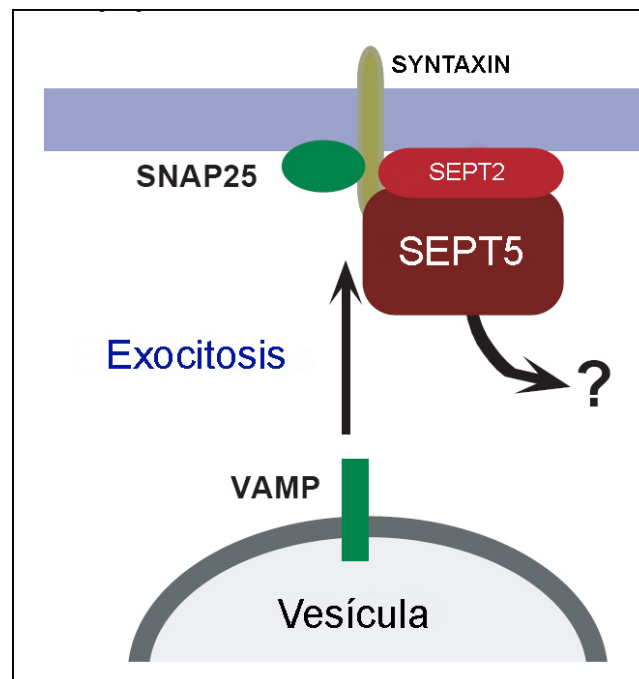
SEPT5 fue el primer sustrato de parkin identificado en humanos mediante un rastreo de dos híbridos (Zhang y col., 2000). Estos estudios demostraron que parkin regula la degradación de esta proteína mediante su ubiquitinación. SEPT5 pertenece a la familia de las septinas, que son proteínas de unión a GTP. Fueron identificadas inicialmente en levadura durante un rastreo de mutantes deficientes en citocinesis (Hartwell, 1971). Posteriormente se pudo comprobar que esta familia de proteínas se encuentra ampliamente representada en el reino animal (Longtine y col., 1996). Los estudios de las septinas de mamíferos han revelado que, además de la función original en la citocinesis por la que fueron identificadas, las septinas están implicadas en otros procesos no relacionados con la división celular como el tráfico de vesículas, endo y exocitosis, organización de la superficie celular y oncogénesis (revisado en Kartmann y Roth, 2001; y Martínez y Ware, 2004).

Estas proteínas contienen una región central conservada, que separa las regiones amino terminal y carboxilo terminal, más variables entre los miembros de esta familia (Fig. I.14A). En la región central se encuentra un motivo típico de unión a GTP/ATP. De hecho, se ha demostrado *in vitro* que algunas de las septinas de diferentes organismos se unen a GTP y tienen actividad GTPasa (Field y col., 1996; Frazier y col., 1998). Además, en esta región central también encontramos una región polibásica bastante conservada. En el extremo carboxilo terminal, suele localizarse otro motivo denominado “coiled-coil”, que podría estar implicado en interacciones proteína-proteína (Longtine y col., 1996). En la parte amino terminal, encontramos una región rica en prolinas que probablemente es la más variable. Las variaciones en las regiones amino y carboxilo terminal han permitido la clasificación de las septinas de mamíferos en cuatro grupos: SEPT2, 3, 6 y 7 (Fig. I.14B). Sin embargo, recientemente los grupos SEPT2 y SEPT7 han sido considerados como dos subgrupos dentro del mismo (Hall y col., 2005). Dentro de esta clasificación, SEPT5 pertenece al grupo SEPT2 (ver Fig. D.1).



**Figura I.14. Estructura de las septinas.** Adaptada de (Spiliotis y Nelson (2006). (A), estructura básica de los dominios que conforman las proteínas de la familia de las septinas. (B), estructura de los dominios de los diferentes grupos de septinas. Las flechas indican las regiones por las cuales podrían interactuar entre ellas o con otras proteínas.

SEPT5, al igual que otras septinas, se expresa fundamentalmente en el cerebro (Caltagarone y col., 1998; Yagi y col., 1998; Beites y col., 1999; Zieger y col., 2000; Ihara y col., 2003). Concretamente, esta proteína parece estar asociada a vesículas sinápticas (Beites y col., 1999) y se localiza en los terminales sinápticos (Kinoshita y col., 2000). Por otra parte, se ha demostrado que SEPT5 y SEPT2 interactúan con la proteína syntaxin formando un complejo (Beites y col., 1999). Syntaxin pertenece a la familia de proteínas SNARE (soluble NSF attachment receptor), que son esenciales para la unión entre la membrana de las vesículas y la membrana plasmática en el proceso de exocitosis (Sollner y col., 1993), de manera que esto sugiere una participación de estas dos septinas (SEPT5 y SEPT2) en la fusión de vesículas durante este proceso (Fig. I.15).



**Figura I.15. Esquema de la posible interacción entre las proteínas syntaxin y las septinas 5 y 2.** Adaptada de Kartmann y Roth (2001). La interacción de SEPT5 con diversas proteínas SNARE hizo que se postulara su papel en los procesos de exocitosis.

En el caso de SEPT5, se ha demostrado que no sólo interactúa con la syntaxin monomérica, sino que también lo hace con el complejo SNARE formado por syntaxin, SNAP25 y VAMP-2, siendo capaz de discriminarlo frente a otros complejos SNARE (Beites y col., 2005). Por otro lado, se ha visto que esta interacción afecta directamente a la exocitosis, ya que la sobreexpresión de SEPT5 en células HIT-T15

inhibe fuertemente la secreción. Además, una mutación dominante negativa del dominio GTPasa de SEPT5 tiene el efecto contrario, potenciando la secreción (Beites y col., 1999). Aparte de esta relación con los mecanismos de exocitosis, algunos estudios también han relacionado a SEPT5 con oncogénesis (Megonigal y col., 1998; Osaka y col., 1999).

## **5.2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE SEPTIN 5 EN RATÓN**

Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* respecto a la relación de SEPT5 con la secreción, llevaron a desarrollar ratones mutantes nulos para esta septina, en los que se pudiera comprobar esta función *in vivo* (Peng y col., 2002). El análisis fenotípico de los mutantes no mostró ninguna alteración en la transmisión sináptica. Sin embargo, sí presentaban variaciones en la expresión de otras septinas, lo que llevó a proponer la hipótesis sobre una posible redundancia de función entre las septinas, de forma que una variación en la expresión de otras proteínas de esta familia compensaría la ausencia de SEPT5 (Peng y col., 2002).

Por otra parte, otro estudio llevado a cabo por Dong y colaboradores reveló que la inyección de una construcción retroviral que produce la sobreexpresión de SEPT5 en cerebros de ratón, causa la degeneración de las neuronas DA en la SNpc (Dong y col., 2003) (Fig. I.16), así como una reducción en los niveles de dopamina y sus metabolitos. La toxicidad de SEPT5 en estas neuronas es dependiente de dopamina ya que la inhibición de la enzima tirosina hidroxilasa evita esta neurodegeneración. Además, SEPT5 inhibe la secreción de dopamina en células PC12. Todo esto apoyaría la hipótesis de que la toxicidad de SEPT5 podría deberse a que su sobreexpresión produce un bloqueo continuo de la secreción de dopamina y su acumulación en la célula (Dong y col., 2003), y sugiere que esta acumulación podría contribuir al desarrollo de la enfermedad.



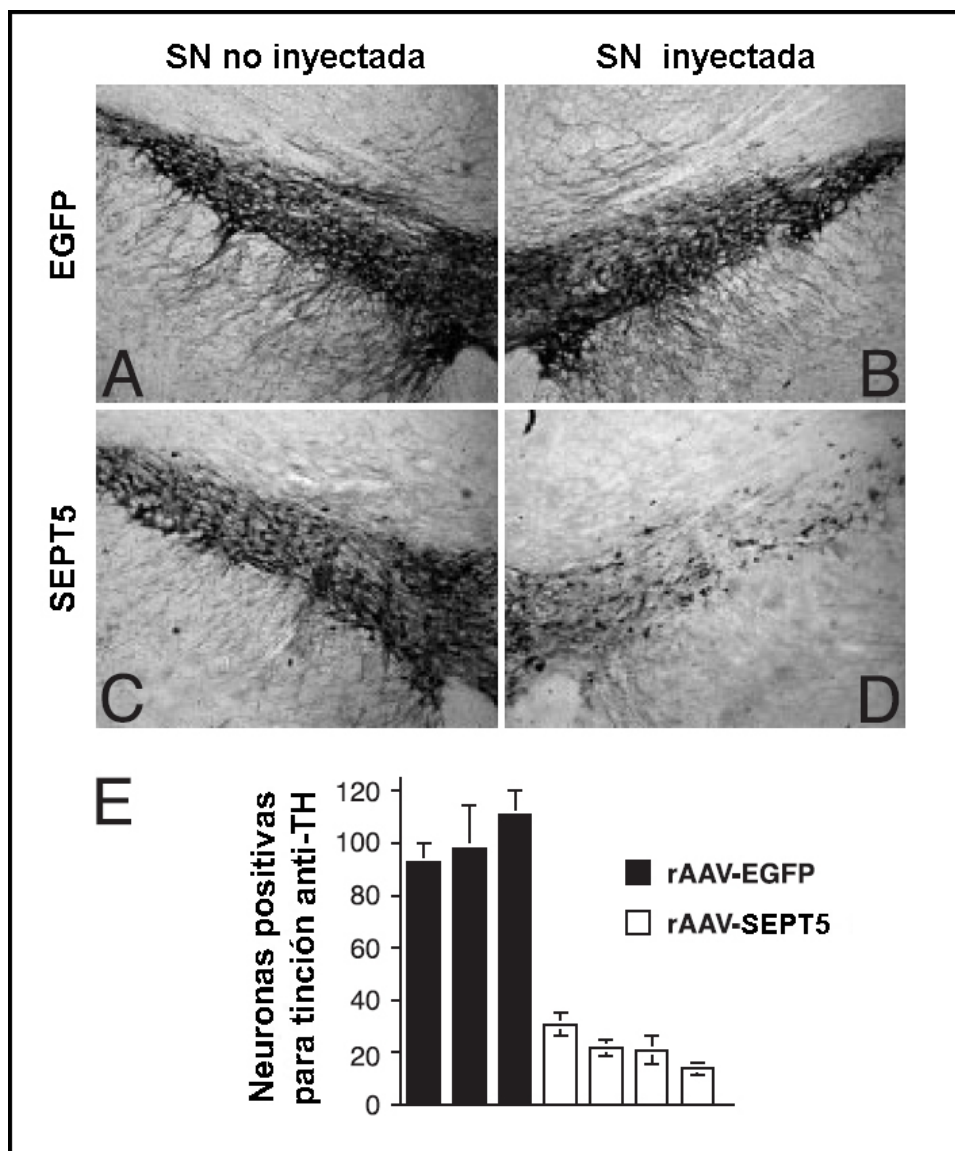


Figura I.16. Neurodegeneración de neuronas DA producida por la sobreexpresión de SEPT5. Adaptada de Dong y col. (2003). Neuronas DA en la SNpc de los hemisferios cerebrales de individuos normales, (A) y (C), o inyectados con las construcciones que producen la sobreexpresión de SEPT5, (D), o la proteína control EGFP, (B). (E), supervivencia de neuronas DA en la SNpc.

# *Objetivos*



La falta de función del gen *PARK2* es la causa de una forma hereditaria de Parkinson juvenil (ARJP). Dado que la proteína actúa como una E3 proteína-ubiquitina ligasa que marca proteínas para su degradación por el proteasoma, se ha especulado que la acumulación de los sustratos de parkin en las neuronas DA sea la responsable de la neurodegeneración en enfermos de EP. Se han descrito numerosos sustratos de parkin en humanos, entre ellos la proteína SEPT5. Por otro lado, se ha demostrado que los mutantes del gen *parkin* de *Drosophila* presentan también degeneración de las neuronas DA, apoyando el uso de este organismo como modelo para el estudio de la enfermedad. Dado que al inicio de este trabajo no se conocía ningún sustrato de Parkin en la mosca, y con el objetivo de comprobar si la hipótesis de la acumulación de sustratos como causa de la muerte neuronal en estos mutantes podría ser cierta, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Identificación y caracterización molecular del gen *septin 4* de *Drosophila*, ortólogo del gen *SEPT5* humano.
2. Análisis de la acumulación de Septin 4 en neuronas y otros tejidos
3. Estudio de la relación funcional entre *parkin* y *septin 4*
4. Búsqueda de otros genes relacionados funcionalmente con *septin 4*

# *Materiales y métodos*

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. LÍNEAS DE MOSCAS

Durante este estudio se han utilizado numerosas líneas de moscas, algunas de ellas se han generado en este mismo trabajo aunque la mayoría tienen orígenes distintos. En las siguientes tablas se describe el origen de las líneas así como sus características básicas.

Línea	Patrón expresión	Origen
<i>Ddc</i> -GAL4	Neuronas DA	(Li y col., 2000)
<i>TH</i> -GAL4	Neuronas DA	(Friggi-Grelin y col., 2003)
<i>elav</i> -GAL4	SNC	Bloomington stock center
<i>GMR</i> -GAL4	ojo	Dr. A. Ferrús
<i>ey</i> -GAL4	ojo	(Newsome y col., 2000)
<i>sev</i> -GAL4	ojo	Dr. M. Mlodzik
<i>vg</i> -GAL4	ala	Bloomington stock center
<i>nub</i> -GAL4	ala	Dr. F.J. Díaz-Benjumea
<i>c96</i> -GAL4	ala	(Gustafson y Boulianne, 1996)
<i>bs</i> -GAL4	ala	Bloomington stock center
<i>sd</i> -GAL4	ala	Dr. J.C. Sparrow
<i>ap</i> -GAL4	ala, tórax	(Calleja y col., 1996)
<i>en</i> -GAL4	ala, embrión	(Kassis y col., 1992)
<i>arm</i> -GAL4	general	(Sanson y col., 1996)
<i>act</i> -GAL4 (II)	general	Bloomington stock center
<i>da</i> -GAL4	general	Bloomington stock center

**Tabla MM.1. Líneas GAL4.**

Línea	Origen
UAS-Sep4	Generada durante este estudio
UAS-Sep4(x2)	Generada durante este estudio
UAS-Sep4, iRPark	Generada durante este estudio
UAS-Sep4, UAS-Park	Generada durante este estudio
<i>TH</i> -GAL4, UAS-Sep4	Generada durante este estudio
UAS-Sep4, <i>park</i> <sup>A21</sup>	Generada durante este estudio
UAS-Sep4; <i>da</i> -GAL4	Generada durante este estudio
UAS-SEPT5	Generada durante este estudio
iRPark	(Yang y col., 2003)

**Tabla MM.2. Líneas de moscas transgénicas UAS.**

Línea	Características	Origen
w <sup>-</sup> ; TM3/TM6	Equilibrador cromosoma 3	
w <sup>-</sup> ; BL2/CyO	Equilibrador cromosoma 2	
w <sup>-</sup> ; sp <sup>1</sup> /FM6	Equilibrador cromosoma 1	
<i>noc<sup>1</sup> Sb<sup>1</sup>/CyO</i> TM3	Equilibrador compuesto 2 y 3	Bloomington stock center
<i>park<sup>Δ21</sup></i>	Mutante gen <i>parkin</i>	(Pesah y col., 2004)
<i>pnut<sup>XP</sup></i>	Mutante gen <i>peanut</i>	Bloomington stock center
<i>Df(3L)PcMk</i>	Deficiencia cromosómica que cubre el gen <i>parkin</i>	Bloomington stock center
<i>OrR</i>		
<i>w<sup>1118</sup></i>		
<i>y<sup>-</sup>, w<sup>-</sup></i>		
<i>GstS1<sup>k08805</sup></i>	Mutante de <i>GstS1</i> por inserción de un elemento P	Bloomington stock center
<i>GstS1<sup>k09303</sup></i>	Mutante de <i>GstS1</i> por inserción de un elemento P	Bloomington stock center
<i>nedd4<sup>T119FS</sup></i>	Mutante gen <i>nedd4</i>	(Sakata y col., 2004)

**Tabla MM.3. Otras líneas de moscas utilizadas.**

## 1.2. CEPAS DE *E. coli*

La transformación de plásmidos para su replicación en *E. coli* se ha llevado a cabo en diferentes cepas dependiendo del plásmido utilizado.

Para la realización de las subclonaciones en pUAST, pGEX y pQ32 se utilizó la cepa XL1-Blue de *E. coli* cuyo genotipo es: *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(rk-,mk+) supE44, relA1, λ- Δ(lac){f'proAB lacIqZ ΔM15 Tn10(tetR)}*.

Por otro lado, para la inducción de la expresión de la proteína de fusión GST-Sep4 se utilizó la cepa BL21 de *E. coli*. Su genotipo es: F<sup>-</sup>, *ompT, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal*. Esta cepa está recomendada para la expresión de proteínas de fusión a GST por su baja actividad proteasa. Sin embargo, la transformación con estas células es difícil, por esta razón, para las clonaciones previas en pGEX se optó por una cepa alternativa (XL1-Blue). Para la expresión de la proteína de fusión His-Park se utilizó la cepa XL1-Blue, ya que la transformación del plásmido en las células BL21 no fue posible.

## 2. CLONES DE ADNc

Tanto para la generación de líneas transformantes que se utilizaron en los diferentes apartados de este estudio, como para la preparación de sondas para los estudios de expresión y para la clonación en diferentes vectores, se utilizaron clones de ADNc procedentes del *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP) o clones

IMAGE en el caso de ADNc humano, que contenían la secuencia codificante de los genes *septin 4*, *parkin*, *septin 1*, *rp49* y *SEPT5*. Los códigos identificativos de cada uno de ellos aparecen en la tabla MM.4:

<b>Clon</b>	<b>Gen</b>	<b>Organismo</b>
BDGP LP06017	<i>septin 4</i>	<i>Drosophila</i>
BDGP LD35479	<i>septin 1</i>	<i>Drosophila</i>
BDGP SD01679	<i>parkin</i>	<i>Drosophila</i>
IMAGE 4622368	septin 5	Humanos

**Tabla MM.4. Códigos de identificación de los clones de ADNc utilizados.**

### **3. VECTORES**

El vector **pUAST** (Fig. MM.1A) se utilizó para generar construcciones capaces de inducir la sobreexpresión de los genes de interés mediante el sistema UAS/GAL4 (ver resultados). Este vector permite la clonación de insertos de ADN entre unas secuencias UAS de levadura y una secuencia terminadora de la transcripción, respectivamente, de manera que en presencia del factor de transcripción GAL4, el cual se une a las secuencias UAS, se activa la transcripción del inserto clonado. Tanto el vector **pOT2** como el **pOTB7** se utilizaron para la generación de sondas de ARN. El vector **pGEX** (Fig. MM.1B) se ha utilizado para la generación de una proteína de fusión a GST, mientras que el vector **pQE32** (Fig. MM.1C) se utilizó para la generación de una proteína marcada con una cola de seis histidinas.



**Figura MM.1. Representación esquemática de los vectores utilizados para distintas aplicaciones en este trabajo.** (A) Vector pUAST, utilizado para la generación de líneas transgénicas. Se puede ver ampliada la región de las secuencias UAS, así como la caja TATA y el sitio de clonación múltiple. (B) Vector pGEX 5X-1, utilizado para la generación de una proteína de fusión a GST. En la secuencia ampliada se puede observar la pauta de lectura que se debe seguir para una correcta clonación. (C) Vector pQ32, utilizado para generar una proteína marcada con una cola de seis histidinas. Se ha ampliado la región de clonación, dónde puede apreciarse la pauta de lectura que se debe seguir.

#### 4. CEBADORES

Para la clonación de algunos fragmentos de ADN fue necesaria su amplificación por PCR a partir de ADN molde. Mediante estas reacciones se pretendía añadir pequeñas secuencias de nucleótidos en los extremos del fragmento de ADN que se quería clonar, las cuales contenían las dianas de restricción necesarias para la clonación del fragmento de ADN en una pauta de lectura determinada. Este fue el caso de la clonación en los vectores pGEX y pQE32. También para comprobar la correcta clonación de los fragmentos de ADN mediante secuenciación automática se utilizaron cebadores específicos. Los cebadores que se utilizaron en cada caso se describen en la tabla MM.5.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>	<b>Uso</b>
Sep4 dir	5'-CGG AAT TCA CCA TGA AGC ATC AGC CG-3'	66.4°C	Clonación en pauta del ADNc de Septin 4 en el vector pGEX
Sep4 rev	5'-CCA CTC GAG CTA GAC GTC GAT CAC GCT C-3'	71°C	Clonación en pauta del ADNc de Septin 4 en el vector pGEX
dPark dir (his)	5'-CCC AAG CTT GGA GGA TTA GCC GAA CCA GTG-3'	72.2°C	Clonación en pauta del ADNc de Parkin en el vector pQE32
dPark rev (his)	5'-CCG CTC GAG GAA GGA TTA GCC GAA CCA GTG-3'	72.2°C	Clonación en pauta del ADNc de Parkin en el vector pQE32
pUAST dir	5'-CAC CAC AGA AGT AAG GTT CC-3'	52°C	Secuenciación de insertos clonados en pUAST
pUAST rev	5'-CTG CAA CTA CTG AAA TCT GCC-3'	52°C	Secuenciación de insertos clonados en pUAST
pGEX 5'	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'	62°C	Secuenciación de insertos clonados en pGEX
pGEX 3'	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3	62°C	Secuenciación de insertos clonados en pGEX
pQE32 5'	5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'	48°C	Secuenciación de insertos clonados en pQE32
pQE32 3'	5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'	49°C	Secuenciación de insertos clonados en pQE32

**Tabla MM.5. Relación de los cebadores utilizados y sus aplicaciones.**

## 5. ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se recogen en la tabla MM.6, así como su procedencia y la concentración a la cual fueron utilizados. Algunos de los anticuerpos se utilizaron a diferentes concentraciones dependiendo del protocolo experimental a seguir o porque se quería determinar la validez del anticuerpo. Esto se indica en la tabla mediante un rango.

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración de uso</b>	<b>Origen</b>
<b>Primarios</b>	Anti-TH	1:125-1:250*	Immunostar
	Anti-SEPT5 monoclonal JL33	1:500-1:1500**	Cedido por el Dr. Constantino Martínez
	Anti-SEPT5 policlonal	1:250-1:500**	Cedido por el Dr. Constantino Martínez
	Anti-GST	1:5500	Sigma
	Anti-His	1:100	Amersham Biosciences
	Anti- $\alpha$ -tubulina	1:5000	Sigma
	Anti-DIG	1:2000	Roche
<b>Secundarios</b>	Anti-Ig ratón biotinilado	1:200	Pierce
	Anti-Ig ratón Fitc	1:500	Calbiochem
	Anti-Ig conejo POD	1:3000	Sigma
	Anti-Ig ratón POD	1:5000	Sigma

**Tabla MM.6. Lista de anticuerpos utilizados en este estudio.** \*, diferentes concentraciones utilizadas para distintas aplicaciones. \*\*, rango de concentraciones utilizadas para comprobar la validez del anticuerpo. Fitch= fluorescein isothiocyanate, POD= peroxidasa.

## 6. MÉTODOS MOLECULARES

### 6.1. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala a partir de cultivos de *E. coli*, se utilizó el método de la lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (Sambrook, 2001), si éste iba a ser utilizado para realizar subclonaciones o análisis de restricción. Para marcajes de sondas de ARN o para comprobar la secuencia de un ADN clonado por secuenciación automática la extracción se realizó utilizando los kits de extracción *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, ref. 1 754 785), cuando era a pequeña escala, y *Genopure Plasmid Midi Kit* (Roche, ref. 3 143 414) para extracciones a mediana escala.



## **6.2. EXTRACCIÓN DE ARN**

Para la extracción de ARN de diferentes estadios de desarrollo y tejidos de *Drosophila*, se utilizó TRI reagent (Sigma, ref. T9424) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la extracción, el ARN fue resuspendido en agua. Una vez extraído, el ARN fue cuantificado mediante espectrofotometría y su integridad fue comprobada mediante un gel de agarosa-paraformaldehído (ver apartado 6.3.2 de Materiales y métodos). Todo esto se llevó a cabo en condiciones libres de RNasas (ver apartado 7 de Materiales y métodos).

## **6.3. ELECTROFORESIS**

### **6.3.1. Electroforesis de ADN**

Para la separación y visualización de fragmentos de ADN se utilizaron geles de agarosa a diferentes concentraciones oscilando entre 0.8 y 2% en función del tamaño esperado de los fragmentos. La agarosa se preparó en tampón TBE (Tris-borato EDTA) y para la posterior visualización de los fragmentos, se añadió bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Este mismo tampón se utilizó para realizar la electroforesis a un voltaje constante de alrededor de 100 V, variando también según el tamaño de los fragmentos a separar. Para cargar las muestras en el gel, éstas se prepararon en tampón de carga (glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0.5% y EDTA pH 8.0 100mM) y para hacer una estima del tamaño de los fragmentos analizados se utilizaron marcadores de peso molecular de diferentes rangos de tamaño (Roche). Una vez finalizada la electroforesis, la visualización de los fragmentos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda 312 nm.

### **6.3.2 Electroforesis de ARN**

Para la separación de ARN total se utilizaron geles de agarosa 1.2%-paraformaldehído al 2% en tampón MOPS 1X. Las muestras se prepararon en una proporción de volumen 1:2 de ARN y tampón de carga (250 µl formamida, 83 µl paraformaldehído al 37%, 50 µl MOPS 10X). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 10 min a 65°C e inmediatamente se enfriaron en hielo. Después, se les añadió 0.1 µl de azul de bromofenol, y se cargaron en el gel. En caso de querer visualizar la integridad del ARN, se añadió también 1 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml) a las muestras. La electroforesis se realizó en tampón MOPS 1X a un voltaje constante de 60-80 V. Todo este proceso se realizó en condiciones libres de RNasas (ver apartado 7 de Materiales y métodos) para evitar la degradación del ARN.

### 6.3.3. Electroforesis de proteínas

Para la separación de proteínas se utilizó un sistema de electroforesis vertical (Bio-Rad), y geles de acrilamida/bisacrilamida discontinuos. El gel empaquetador se preparó, siguiendo las indicaciones del proveedor (Bio-Rad), con la siguiente concentración de componentes:

- 5% acrilamida/bisacrilamida
- 0.08 M Tris-HCl pH 6.8
- 0.1% SDS
- 0.05% APS
- 0.125% TEMED

El gel separador se preparó con la siguiente concentración de componentes:

- 10% acrilamida/bisacrilamida
- 0.4 M Tris-HCl pH 8.8
- 0.1% SDS
- 0.05% APS
- 0.05% TEMED

Para la realización de la electroforesis, los geles correctamente polimerizados se montaron en la cubeta siguiendo las indicaciones del fabricante (Bio-Rad) y se siguieron los siguientes pasos:

- Preparar la muestra de proteínas mezclando el mismo volumen de proteínas que de tampón de carga 2X. Para preparar 10 ml de tampón de carga 2X se mezclan lo siguientes componentes:

Agua estéril	3.55 ml
Tampón del gel empaquetador	1.25 ml
Glicerol	2.50 ml
SDS 10%	2.00 ml
Azul de bromofenol 0.5%	0.20 ml
$\beta$ -mercaptoetanol	0.50 ml

El  $\beta$ -mercaptoetanol se añade inmediatamente antes de preparar la muestra con las proteínas.

- Desnaturalizar las proteínas hirviendo las muestras durante 7 min.
- Cargar las muestras en el gel. Es conveniente, para que la electroforesis se desarrolle uniformemente, que todas las muestras tengan un volumen similar y que los pocillos libres se rellenen con agua estéril y tampón de carga.

- Desarrollar la electroforesis en tampón Tris 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1%, a un amperaje constante entre 14 y 20 mA según tengamos 1 ó 2 geles en la cubeta.

### **6.4. DIGESTIÓN DE ADN**

Para cortar fragmentos de ADN en sitios determinados, se utilizaron enzimas de restricción. Las reacciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l y se utilizaron 10 U del enzima o enzimas correspondientes, e incubando a la temperatura recomendada por el fabricante durante al menos 2-3 h. En el caso de digestiones dobles se eligieron aquellas condiciones que más se ajustaran a las condiciones recomendadas para cada enzima, incluyendo el tampón de la reacción. La visualización de los fragmentos generados se hizo mediante una electroforesis en gel de agarosa (ver materiales y métodos 6.3.1).

### **6.5. PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE AGAROSA**

Para purificar fragmentos de ADN generados por restricción o PCR, y separados mediante electroforesis en gel de agarosa, se utilizó el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, ref. 27-9602-01), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se comprobó mediante una nueva electroforesis en gel de agarosa.

### **6.6. CLONACIÓN DE INSERTOS DE ADN EN UN VECTOR**

#### **6.6.1. Clonación en el vector pUAST**

Para la clonación direccional de los ADNc en el vector pUAST, se siguió el esquema descrito en la figura MM.2A. El ADNc, clonado en otro plásmido, se aisló del mismo mediante digestión con enzimas de restricción. Estos mismos enzimas fueron utilizados para digerir el vector en el que se deseaba clonar el ADNc. Posteriormente, ambos ADNs se purificaron a partir de un gel de agarosa, y se sometieron a una reacción de ligación en un volumen total de 10  $\mu$ l:

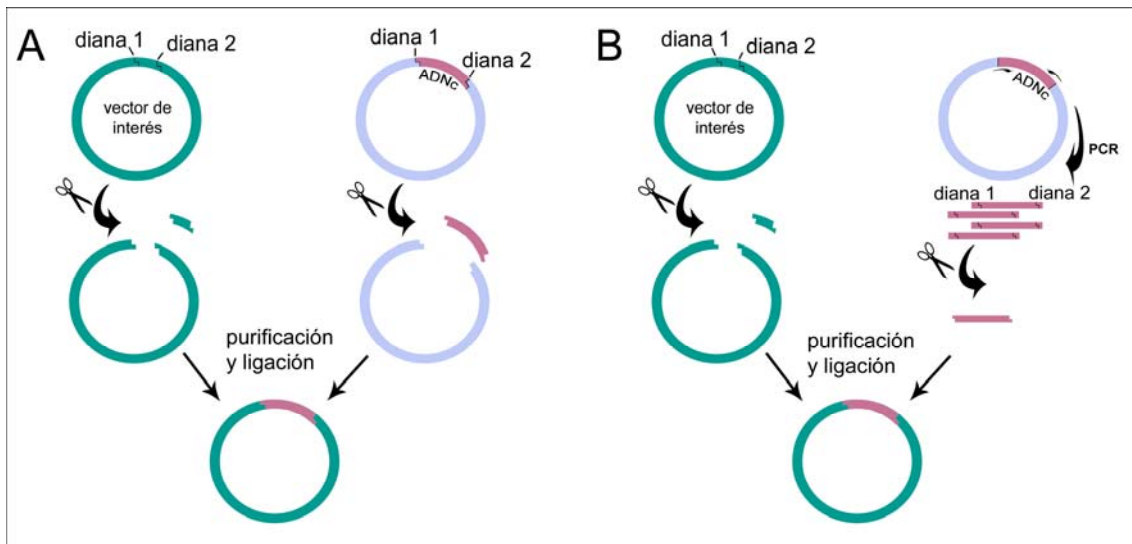
- Inseto y vector en una relación de concentración 3:1
- 1  $\mu$ l T4 ADN ligasa (Roche, ref. 716 359)
- 1  $\mu$ l Tampón 10X

La reacción se incubó durante toda la noche a 4°C.

#### **6.6.2. Clonación en los vectores pGEX y pQE32**

Para la clonación en los vectores de expresión pGEX y pQE32 se siguió el esquema descrito en la figura MM.2B. Los fragmentos que contenían el ADNc a

expresar se amplificaron mediante una reacción de PCR (ver materiales y métodos 6.7) utilizando cebadores que incluían las dianas de restricción necesarias para clonar el ADNc amplificado en fase con la secuencia codificante de proteína del vector (ver tabla MM.5). Tanto los insertos como los vectores se sometieron a digestión con los mismos enzimas y la ligación se realizó como se ha descrito en el apartado 6.6.1 de esta sección.



**Figura MM.2. Representaciones del esquema de clonación seguido según el tipo de vector.** (A) Clonación en el vector pUAST. (B) Clonación en vectores de expresión de proteínas.

### 6.7. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR

Como se ha comentado anteriormente, para la correcta clonación de algunos fragmentos de ADN en los vectores correspondientes, fue necesaria la introducción de sitios de restricción. Para ello, se optó por la amplificación de los fragmentos deseados mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. En primer lugar se diseñaron los cebadores necesarios en cada caso, que contienen las dianas de restricción (Tabla MM.5). Las condiciones de la amplificación se ajustaron en función de los cebadores utilizados. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l y se utilizaron las siguientes cantidades o concentraciones finales de los reactivos:

ADN molde	50-100 ng
dNTPs	200 $\mu$ M
cebador 5'	0.2 $\mu$ M
cebador 3'	0.2 $\mu$ M
tampón	1X
Polimerasa	1U de Pwo (Roche, ref. 11644947001)
Agua estéril hasta	50 $\mu$ l

El programa utilizado para la amplificación fue el siguiente, siendo T la temperatura de anillamiento utilizada para cada pareja de cebadores, las cuales aparecen en la tabla MM.7:

Un ciclo:

5 min a 94°C

35 ciclos:

1 min a 94°C

30 s a T

2 min a 72°C

Un ciclo:

10 min a 72°C

∞ a 4°C

<b>Pareja de cebadores</b>	<b>T (°C)</b>
Sep4 dir- Sep4 rev	68.2
dPark dir (his)- dPark rev (his)	72.4
34579dir-3459rev	50.0

**Tabla MM.7. Temperaturas de anillamiento de las diferentes parejas de cebadores utilizadas para las clonaciones.**

### **6.8. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli***

Para la preparación de células competentes de *E. coli* de la cepa XL1-Blue se siguió el procedimiento descrito por Sambrook y Russell (Sambrook, 2001). Para la cepa BL21 se siguió el protocolo descrito en el manual *GST Gene fusion system* (Pharmacia biotech).

### **6.9. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

#### **6.9.1. En XL1-Blue**

Para la transformación en esta cepa se siguió el método de choque térmico. Para ello, se descongela una alícuota de células (que se mantienen a -80°C) en hielo y se sigue el siguiente protocolo:

- Añadir un máximo de 100 ng de ADN a las células en condiciones de esterilidad.
- Agitar suavemente y mantener en hielo durante 20 min.
- Incubar a 42°C durante 1 min.

- Mantener en hielo durante 1–2 min.
- Añadir 4 volúmenes de LB en condiciones de esterilidad e incubar en agitación a 37°C durante 1 h
- Sembrar las células en una placa de LB-agar con el antibiótico correspondiente según la resistencia conferida por el vector empleado.
- Incubar la placa toda la noche a 37°C.

#### 6.9.2. En BL21

Para la transformación en esta cepa se siguió el protocolo descrito en el manual *GST Gene fusion system*, con ligeras modificaciones. Para ello, se descongela una alícuota de células (que se mantienen a –80°C) y se siguen los siguientes pasos:

- Transferir las células a un tubo estéril de 50 ml
- Añadir 1 ng de ADN a las células en condiciones de esterilidad.
- Agitar suavemente y dejar en hielo durante 45 min.
- Incubar a 42°C durante 2 min.
- Enfriar brevemente en hielo.
- Transferir 200-300 µl de las células transformadas a un nuevo tubo de 50 ml y añadir 900 µl de LBG (LB + glucosa 20 mM), mantener en agitación a 37°C durante 1 h.
- Sembrar las células en una placa de LBG-agar con el antibiótico correspondiente según la resistencia conferida por el vector empleado.
- Incubar la placa toda la noche a 37°C.

#### **6.10. SELECCIÓN DE COLONIAS TRANSFORMANTES**

La selección de aquellas colonias que habían incorporado el plásmido recombinante se realizó mediante extracción del ADN plasmídico de las mismas, análisis de restricción y posterior comprobación de los plásmidos por secuenciación automática con los cebadores correspondientes (ver tabla MM.5). La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa *Sistemas Genómicos*.

### **7. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES**

En todos los métodos descritos en esta sección se trabaja con ARN. El ARN es una molécula muy lábil y los enzimas que pueden degradarlo (ARNasas) se encuentran en la mayoría de superficies y objetos así como en la propia piel. Por esta

razón, y con el objetivo de minimizar la degradación del ARN, es necesario tomar una serie de precauciones que incluyen:

- Eliminación de ARNasas del material a utilizar mediante diferentes tratamientos, según el tipo de material:
  - Material de vidrio y metal: mantener a 180°C en un horno Pasteur durante una noche. Alternativamente se puede utilizar el producto “RNase Erase” (Roche, ref. 2440-204) siguiendo las instrucciones del fabricante.
  - Plástico: tratar toda la noche con absolve 2% y enjuagar con agua libre de ARNasas o utilizar “RNase Erase”.
  - Disoluciones: preparar los tampones a partir de reactivos que no hayan estado en contacto con ARNasas y, una vez preparados, pasarlos por filtros con poro de 0.22 µm o tratar con DMPC a una concentración final del 0.1% a 37°C durante 1 h, autoclavando posteriormente el tampón para destruir el DMPC. El tratamiento con este compuesto no se podrá aplicar a tampones que contengan grupos amino.

Utilizar guantes durante todo el proceso para evitar la contaminación con ARNasas propias.

### **7.1. MARCAJE DE SONDAS DE ARN**

Tanto para la realización de *Northern blot* como para hibridaciones *in situ*, las sondas de ARN fueron marcadas con digoxigenina utilizando como molde los correspondientes ADNc. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- Aproximadamente 2.5 µg de ADN lineal se utilizaron para llevar a cabo la reacción de marcaje, la cual se preparó con los siguientes componentes y cantidades correspondientes del kit “SP6, T3, T7 transcription labeling DIG” (Roche):

ARN polimerasa correspondiente	1 µl
Tampón de transcripción 10X	1 µl
dNTPs marcados 10X	1 µl
Inhibidor de ARNasas	1 µl
DTT	1 µl

El volumen final de la reacción fue de 10 µl y ésta se llevó a cabo a 37°C durante 2 h.

- Una vez transcurrido el tiempo de incubación añadimos 15 µl de agua y 25 µl de tampón carbonato 2X a la mezcla de reacción, y se incubó a 65°C durante 20 min.

- La reacción se detuvo con 2 µl de EDTA 0.2 M pH 8.
- Posteriormente las sondas se purificaron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y fueron precipitadas con 2 volúmenes de etanol 100%, 15 µl de LiCl 4M y 5 µl de tRNA de levadura 10 µg/µl, a -20°C durante varias horas.
- Después de centrifugar a 4°C, el precipitado se lavó con etanol 70% y una vez seco se resuspendió en solución de hibridación (ver apartado 7.3 de esta sección).

En el caso de sondas para *Northern blot*, no se añadió tampón carbonato ni EDTA, pasando directamente a la purificación de la sonda.

## **7.2. NORTHERN BLOT**

En cada caso, 20 µg de ARN total fueron separados en un gel 1.2% de agarosa-paraformaldehído. Después de equilibrar el gel en SSC 20X el ARN fue transferido a una membrana de nylon (Boehringer Mannheim) por capilaridad durante toda la noche y a 4°C. El ARN se fijó a la membrana mediante la incubación de ésta en un horno Pasteur a 120°C durante 30 min. Para los pasos de prehibridación e hibridación se siguió el protocolo descrito en *The DIG System User's guide for filter hybridization* (Boehringer Mannheim, 1993). Las sondas, marcadas con digoxigenina, se utilizaron a una concentración aproximada de 100 ng/ml. Para detectar los híbridos, se utilizó un anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina. Para la detección de la señal se utilizó el reactivo CDP-*Star* (Disodium 2-cloro-5-(4-metoxyspiro {1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)-1-fenil fosfato, Roche, ref. 1 685 627). La desfosforilación de este sustrato quimioluminiscente por la fosfatasa alcalina, da como resultado la estabilización de un anión dioxenato que al descomponerse emite luz a 466 nm, que puede impresionar películas fotográficas. En nuestro caso se utilizaron las películas *Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film* (Roche, ref. 11 666 916001). Para la impresión de las películas se utilizó un cassette de autorradiografía (*Curix cassette*; Agfa-Gevaert 18x24), y el revelado se realizó en una máquina de revelado (modelo Curix 60 de Agfa).

## **7.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* DE EMBRIONES DE *Drosophila***

Para la determinación de la expresión de genes en embriones de *Drosophila*, se recolectaron embriones de 0 a 24 h a partir de placas de puesta y se transfirieron a un tamiz dónde se les aplicaron los siguientes tratamientos:

- Lavar abundantemente con agua para eliminar posibles restos de levadura.



- Decorionización con lejía al 50% durante 3-4 min.
- Eliminar la lejía y lavar con agua hasta eliminar los restos.
- Incubar los embriones en Triton X-100 al 0.1% durante 1 min.
- Eliminar los restos de Triton, lavando abundantemente con agua.

Fijación:

- Transferir los embriones a una mezcla 1:1 de heptano:paraformaldehído 10% (preparado en Hepes pH 6.9 0.1 M, MgSO<sub>4</sub> 2 mM y EGTA 1 mM) e incubar en agitación a temperatura ambiente durante 25 min, procurando que el mayor número posible de embriones esté en la interfase entre el heptano y el paraformaldehído.
- Eliminar la fase inferior, correspondiente al paraformaldehído, y añadir el mismo volumen de metanol 100%. Agitar vigorosamente para desvitelinizar los embriones.
- Dejar reposar hasta que los embriones desvitelinizados caigan al fondo del tubo.
- Desechar el sobrenadante y lavar con metanol 100%.
- Lavar tres veces con etanol absoluto. Los embriones se pueden conservar en etanol absoluto a -20°C durante largos períodos de tiempo.

Una vez los embriones están fijados, se procede con los pretratamientos y el protocolo de hibridación *in situ*, basado en el anteriormente descrito por Tautz y Pfeifle con ligeras modificaciones (Tautz y Pfeifle, 1989). Si no se indica lo contrario, los embriones se mantienen en rotación durante los diferentes tratamientos:

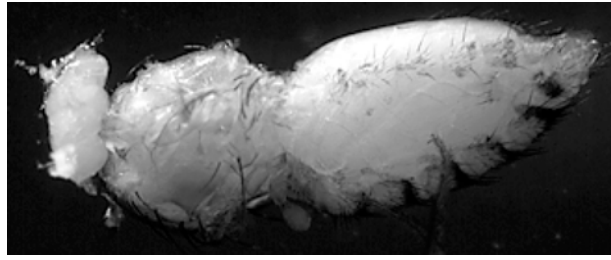
- Lavar los embriones dos veces con metanol.
- Incubar en 1 ml de una mezcla 1:1 de metanol y paraformaldehído al 4% en PBT (Tween 20 al 0.1% en PBS) durante 5 min.
- Eliminar la mezcla e incubar en 1 ml de paraformaldehído al 4% en PBT durante 25 min.
- Realizar tres lavados con 1 ml de PBT, uno rápido, uno de 10 min y otro rápido para eliminar los restos de paraformaldehído.
- Incubar en 1 ml de proteinasa K (50 µg/ml) durante 2.5 min, balanceando suavemente los embriones. En este tratamiento el tiempo es crítico y, debe ser determinado de nuevo cada vez que se prepara una nueva disolución de proteinasa K.
- Eliminar la proteinasa K y lavar dos veces con 1 ml de glicina a 2 mg/ml (JT Baker, ref. 1504) en PBT, durante 1 min cada vez, para detener la digestión con la proteinasa.

- Realizar tres lavados con 1 ml de PBT, dos rápidos y uno de 5 min.
- Incubar en 1 ml de paraformaldehído al 4% durante 25 min.
- Realizar tres lavados con 1 ml de PBT, uno rápido, uno de 10 min y otro rápido para eliminar los restos de paraformaldehído.
- Incubar los embriones en 1 ml de una mezcla 1:1 de PBT y solución de hibridación durante 10 min. La solución de hibridación está compuesta de: formamida desionizada al 50% (la formamida [Merck, ref. 109684] se desioniza con resina AG 501-X8 (D)[Bio-Rad ref. 142-6425], para ello, se mezclan 5 g de resina por cada 100 ml de formamida y se agita durante 1h a temperatura ambiente, a continuación se filtra y se guarda a -20°C), SSC 5X (Roche, ref. 1 666 681), ARNt de *E.coli* 200 µg/ml (Roche, ref. 10 109 541 001), ADN de esperma de salmón sonificado 222 µg/ml, solución de Denhardtts 5X (Sigma, ref. D-9905) y Tween 20 al 0.1%.
- Lavar los embriones con 1 ml de solución de hibridación.
- Incubar con 1 ml de solución de hibridación a 55°C durante 1-2 h. Mantener en agitación para evitar que los embriones se apelmacen.
- Diluir la sonda en solución de hibridación hasta una concentración de entre 1:10 y 1:50, y desnaturalizarla a 80°C durante 4-5 min. Enfriar inmediatamente en hielo.
- Incubar los embriones en 75 µl aproximadamente de la sonda desnaturalizada, a 55°C y sin agitación, durante toda la noche.
- Lavar dos veces con 1 ml de solución de hibridación y, a continuación, realizar dos incubaciones con la misma solución a 55°C y en agitación durante 1h cada incubación.
- Realizar dos incubaciones, con 1 ml de una mezcla 1:1 de solución de hibridación y PBT, de 15 min cada una.
- Realizar tres lavados con 1 ml de PBT, uno rápido, uno de 10 min y otro rápido para eliminar los restos de paraformaldehído..
- Incubar con 1 ml de BSA al 0.1% en PBT durante 15-30 min.
- Incubar con anticuerpo el anti-DIG (*Antidioxigenin fab fragments*, Roche, ref. 1 093274) a una concentración de 1:2000 diluido en PBT-BSA al 0.1% a 4°C durante toda la noche. El anticuerpo debe estar preabsorbido (para ello se incuba durante varias horas la dilución del anticuerpo con otra alícuota de embriones fijados y previamente lavados una vez con metanol y varias veces con PBT). Este anticuerpo reconoce las moléculas de Digoxigenina unidas al dUTP en la sonda marcada.

- Realizar tres lavados con 1 ml de PBT, uno rápido, uno de 1 h y otro rápido para eliminar el anticuerpo.
- Transferir los embriones a un recipiente en el que se puedan observar a la lupa, e incubar con solución de detección (Genius 3: Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M y MgCl<sub>2</sub> 0.05 M) durante 5 min sin agitación.
- Para la detección de la señal se utilizó un método colorimétrico. El anticuerpo anti-DIG está conjugado al enzima fosfatasa alcalina, de manera que si añadimos el sustrato adecuado del enzima se produce una reacción de color. En este caso se han utilizado NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche, ref. 1 383 213) y X-fosfato (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine Salt, Roche, ref. 1 383 221). La fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo cataliza la eliminación de un grupo fosfato del X-fosfato. El producto resultante dimeriza y se oxida, provocando la reducción del NBT que forma un visible precipitado azul allí donde la sonda se ha unido a su diana. Para desarrollar la reacción de color se prepara una mezcla, añadiendo 45 µl de NBT (100 mg/ml en dimetilformamida al 70%) y 35 µl X-fosfato (50 mg/ml en dimetilformamida) por cada 10 ml de Genius-3 y se le añade a los embriones. Los embriones se incubaron en esta mezcla en oscuridad y sin agitación. El tiempo de aparición de la señal es variable, por eso es conveniente comprobar periódicamente la reacción.
- Para detener la reacción de color, se realizan varios lavados con PBT de 15-30 min.
- Posteriormente, eliminar el PBT y añadir glicerol al 80%. Mantener en reposo hasta que los embriones caigan al fondo.
- Montar los embriones en glicerol al 80%.

#### **7.4. HIBRIDACIÓN *IN SITU* DE CEREBROS ADULTOS**

Para la determinación de la expresión de genes en cerebros adultos de *Drosophila* es necesaria la disección de la cápsula de la cabeza, para dejar el cerebro al descubierto (Fig. MM.3). Para ello se anestesian las moscas y se les cortan las alas y las patas. Después de darles un baño de etanol, las moscas son transferidas a un vidrio de disección que contiene PBS. Con la ayuda de unas microtijeras (Fine Science Tools, ref. 15008-08) se disecciona la probóscide, los ojos y el resto de la cápsula de la cabeza, con mucha precaución de no dañar el cerebro y procurando que éste permanezca unido al cuerpo. Así es difícil perder los cerebros en los siguientes pasos de la hibridación.



**Figura MM.3. Individuo adulto con la cápsula de la cabeza diseccionada.** El cerebro queda al descubierto pero unido al cuerpo, quedando así expuesto a diferentes tratamientos.

Una vez diseccionados los cerebros se sigue el siguiente procedimiento, manteniendo las moscas en rotación si no se indica lo contrario:

- Fijar los cerebros en 1 ml de paraformaldehído al 4% durante 30 min.
- Lavar 3 veces con PBT (Tween 20 al 0.1% en PBS) durante 5 min cada lavado.
- Incubar en una solución de proteinasa K (4  $\mu\text{g/ml}$ ), balanceando suavemente las muestras durante 3 min.
- A partir de este punto el procedimiento que se sigue es idéntico a la hibridación en embriones, excepto por la composición de la solución de hibridación, que no contiene ADN de esperma de salmón y la concentración de tRNA es de 500  $\mu\text{g/ml}$ .
- Una vez en glicerol al 80%, los cerebros se separan del resto del cuerpo de la mosca y se montan también en ese mismo tampón.

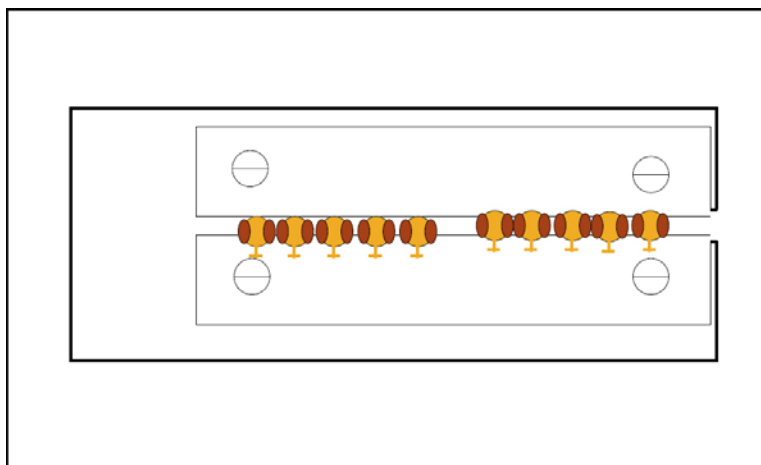
## **8. MÉTODOS HISTOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS**

### **8.1. INCLUSIÓN DE CEREBROS ADULTOS DE *Drosophila* EN PARAFINA**

Para la inclusión de cerebros adultos en parafina se utilizaron unos collares (Fig. MM.4) especialmente diseñados para facilitar la posterior orientación de las cabezas de mosca, y poder así realizar secciones del cerebro con la orientación deseada.

Las moscas se anestesiaron y se ensartaron en los collares, dejando el cuerpo dentro del collar y la cabeza fuera. La probóscide de las moscas fue diseccionada para facilitar la entrada del fijador, los alcoholes y la parafina. Una vez preparadas las moscas, se pasó a la fijación, deshidratación e inclusión del tejido. Para ello seguimos los siguientes pasos:

- Incubar los collares con las moscas en PBS 1X manteniendo el recipiente en rotación suave durante 10 min.
- Fijación del tejido con paraformaldehído al 4% durante 15-30 minutos.
- Incubar en PBT (Triton al 0.3% en PBS) manteniendo el recipiente en rotación suave durante 10 min.
- Incubar en etanol al 70% manteniendo el recipiente en rotación suave durante toda la noche.
- Incubar en etanol al 96% manteniendo el recipiente en rotación suave durante 10 min.
- Incubar en etanol absoluto manteniendo el recipiente en rotación suave durante 10 min.
- Incubar en tolueno durante 6-7 minutos.
- Eliminar el tolueno e introducir los collares en un recipiente con parafina líquida a 60°C durante 1 hora.
- Cambiar la parafina y dejar como mínimo durante una noche.

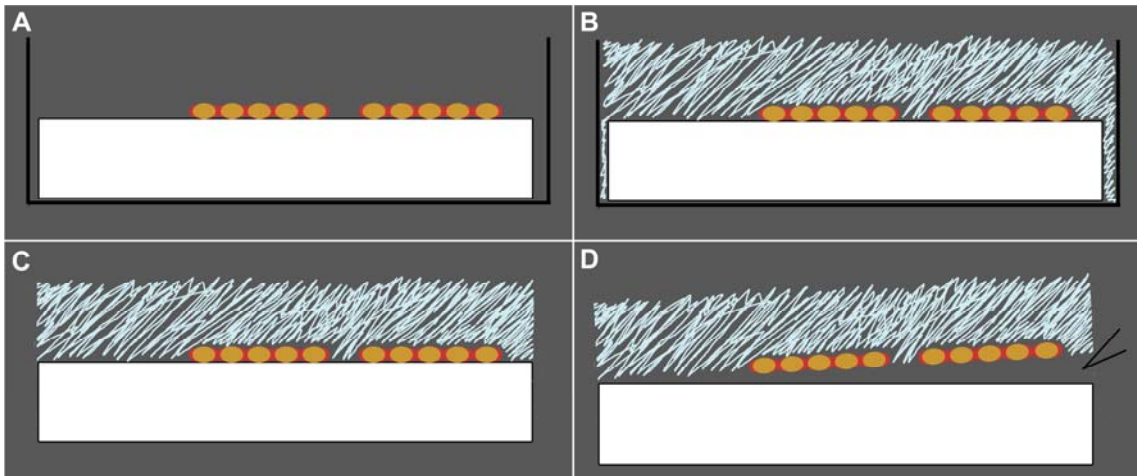


**Figura MM.4. Representación de la parte frontal de un collar.** Las moscas se ensartan por la apertura de la derecha con la cabeza hacia el exterior.

### **8.2. PREPARACIÓN DE SECCIONES FRONTALES DE CEREBRO**

Los collares con las moscas incluidas en parafina se colocaron en el fondo de moldes, de manera que las cabezas de las moscas quedaron boca arriba (Fig. MM.5A). Los moldes se llenaron con parafina líquida y se dejaron enfriar a temperatura ambiente al menos durante dos horas (Fig. MM.5B). Una vez solidificada, se separaron el bloque de parafina del molde y, haciendo palanca con la ayuda de una cuchilla, la parte del bloque que contenía las cabezas incluidas se separó del collar y

del resto del cuerpo de las moscas (Fig. MM.5C y D). Estos bloques se utilizaron para obtener las secciones frontales, que se realizaron con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura MM.5. Orientación de los collares en moldes para la obtención de bloques de parafina con las cabezas de mosca orientadas frontalmente.**

### 8.3. TINCIÓN DE SECCIONES DE CEREBRO DE *Drosophila*

Para la tinción de neuronas en secciones de cerebro se siguió el siguiente protocolo:

- Desparafinar y rehidratar las secciones de la siguiente manera:
  - Incubar los portas en xileno durante 20 min.
  - Realizar dos incubaciones en etanol absoluto durante 10 min cada una.
  - Realizar dos incubaciones en etanol al 96% durante 10 min.
  - Realizar dos incubaciones en etanol al 70% durante 10 min.
  - Incubar en agua durante 10-15 min.
- Hervir en el microondas, en citrato sódico 10 mM pH 6.6, durante 8-10 min y dejar enfriar.

A partir de este paso, los tratamientos se realizan sobre el porta en una superficie horizontal:

- Incubar en tampón de bloqueo (leche desnatada al 5% y Triton al 0.3% en PBS) durante una hora.
- Incubar con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Para evitar utilizar volúmenes excesivos de anticuerpo, se cubren las muestras con un cubreobjetos.
- Para eliminar el cubreobjetos y los restos de anticuerpo no unido, se realizan 3 lavados con PBT (Triton al 0.3% en PBS) de 5 min cada uno.
- Las secciones se incuban entonces con el anticuerpo secundario biotinilado a temperatura ambiente durante 2 h.

- Para eliminar el anticuerpo secundario no unido se realizan 3 lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Incubar en la mezcla ABC (Avidina-biotina) durante 1 h y 30 min. Esta mezcla se preparó añadiendo 1  $\mu$ l de cada uno de los componentes (A y B) del kit Vectastain Elite ABC kit (Vectastain, PK6100) por cada 100  $\mu$ l de PBS, al menos 30 min antes de su utilización.
- Realizar 3 lavados con PBT de 5 min cada uno.
- Revelar la tinción incubando la muestra en DAB a 0.5 mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.06% en PBS.
- Una vez se observe la señal de la tinción lavar abundantemente con agua destilada.
- Deshidratar las muestras con incubaciones en concentraciones crecientes de etanol de 5 min cada una y una incubación final de 15 min en xileno.
- Montar las preparaciones en medio de montaje (p.e: DPX)

### **8.4. TINCIÓN DE CEREBROS ENTEROS DE *Drosophila***

Al igual que para la hibridación *in situ*, durante la tinción de cerebros enteros adultos de *Drosophila* es necesario dejar el cerebro al descubierto (ver apartado 7.4 de esta sección). Una vez diseccionados los cerebros, se procede de la siguiente forma, manteniendo siempre las moscas en agitación suave si no se indica lo contrario:

- Fijar en 1 ml de PLP (Paraformaldehído al 4%, Lisina 40mM) pH 7.2, durante 30-45 min.
- Realizar 3 lavados con PBT (Triton al 0.3% en PBS) de 5 min cada uno.
- Incubar en 1 ml de PAXDG (PBS + BSA al 1% + Triton al 0.3% + desoxicolato sódico al 0.3% + suero de cabra al 5%) durante 1 h.
- Incubar, con el anticuerpo primario diluido en PAXDG, a 4°C durante toda la noche.
- Lavar tres veces con PBT, durante 5 min cada lavado.
- Incubar con el anticuerpo secundario diluido en PAXDG, durante 2 h. Dado que el anticuerpo secundario está conjugado a una molécula fluorescente, a partir de aquí todos los pasos se realizan en oscuridad.
- Lavar tres veces con PBT, con lavados de 5 min cada uno.
- Post-fijar en PLP durante 30 min. Esto evita que la fluorescencia se extinga con demasiada rapidez.
- Lavar tres veces con PBT, con lavados de 5 min cada uno.
- Incubar en glicerol al 50% durante 1 h.

- Incubar en una mezcla 1:1 de PBS y medio de montaje para muestras fluorescentes (Dako, ref. S3023) durante 15-20 min. Este medio ayuda a preservar la fluorescencia durante más tiempo.
- Separar los cerebros del cuerpo de la mosca y montarlos en medio de montaje.
- Observar las muestras en un microscopio óptico de fluorescencia o en un microscopio confocal.

### **8.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE MOSCAS**

Para la obtención de extractos proteicos totales de *Drosophila*, se homogeneizaron individuos adultos en Tris-HCl 50 mM pH 8. El homogenado se centrifugó 5 min a 4°C y el sobrenadante recuperado se volvió a centrifugar de igual manera. El sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación es el extracto final. Para la cuantificación de la concentración de proteína total se siguió el método de Bradford (Pierce comassie reagent 23200).

### **8.6. WESTERN BLOT**

Esta técnica se ha utilizado para la detección de proteínas tanto a partir de extractos de *Drosophila* como a partir de soluciones con proteínas purificadas. Para ello se siguió el siguiente proceso:

- Preparar las muestras mezclando el mismo volumen de proteínas que de tampón de carga 2X. Para preparar 10 ml de tampón de carga 2X se mezclan los siguientes componentes:

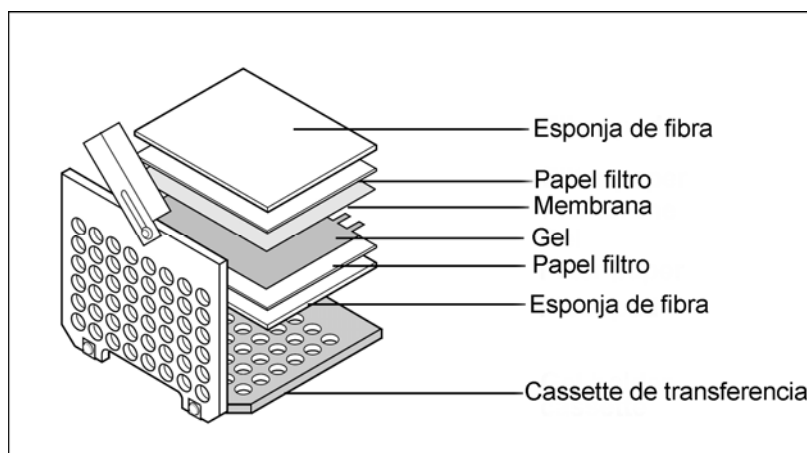
Agua estéril	3.55 ml
Tampón del gel empaquetador	1.25 ml
Glicerol	2.50 ml
SDS 10%	2.00 ml
Azul de bromofenol 0.5%	0.20 ml
$\beta$ -mercaptoetanol	0.50 ml

El  $\beta$ -mercaptoetanol se añade inmediatamente antes de preparar la muestra con las proteínas.

- Desnaturalizar las proteínas hirviendo las muestras durante 7 min.
- Cargar las proteínas en el gel y separarlas mediante electroforesis en gel de acrilamida, tal como se ha descrito en el apartado 6.3.3 de Materiales y métodos.
- Una vez finalizada la electroforesis, equilibrar el gel en tampón de transferencia (Trisbase 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037%).



- Para transferir las proteínas a una membrana PVDF, el gel y la membrana, previamente activada con metanol, enjuagada en agua destilada y equilibrada en tampón de transferencia durante unos segundos, se colocan en un cassette de transferencia (Bio-Rad) siguiendo el esquema indicado en la figura MM.6.



**Figura MM.6. Esquema del montaje del cassette para transferencia de proteínas según el sistema de la casa Bio-Rad.** Adaptada del Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Instructions Manual (BioRad).

- Introducir el cassette en una cubeta de electroforesis/transferencia siguiendo las instrucciones del fabricante y realizar la transferencia en tampón de transferencia a un amperaje constante de aproximadamente 300 mA y a 4°C durante 1 h.
  - Después de la transferencia, lavar la membrana abundantemente con agua destilada varias veces.
  - Teñir la membrana con solución Ponceau preparada en el momento (Ponceau S 0.5% [Sigma, ref. P3504], ácido acético glacial 1%, en agua destilada) para comprobar la transferencia.
  - Lavar con agua destilada hasta que se visualicen las bandas. Posteriormente, seguir lavando hasta que la membrana quede blanca de nuevo.
  - Incubar la membrana en solución de bloqueo (leche desnatada al 5% y Triton al 0.3% en PBS) a temperatura ambiente durante 1 h o a 4°C durante toda la noche.
  - Incubar con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h o a 4°C durante toda la noche.
  - Lavar con PBT (Triton al 0.3% en PBS), 3 lavados de 5 minutos cada uno.
  - Incubar con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 30 min.
- En nuestro caso se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa.

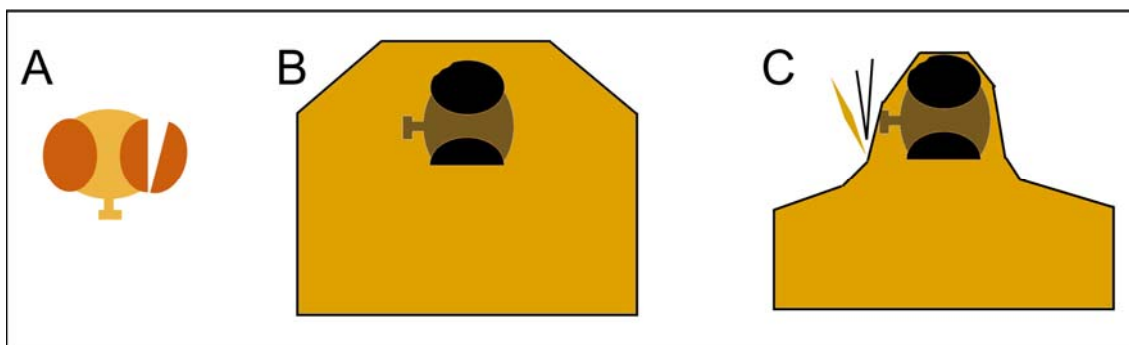
- Lavar con PBT, 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- La reacción de detección se realizó utilizando el reactivo ECL (Pierce, ref. 32209) siguiendo las instrucciones del fabricante. La impresión en película se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos.

## **8.7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA ESTRUCTURA DE LA RETINA EN OJO ADULTO**

Este protocolo se realizó siguiendo las instrucciones descritas en (Tomlinson y Ready, 1987). Básicamente consiste en:

- Dormir las moscas y colocarlas de lado, con el ojo que nos interese hacia arriba.
- Cortar la cabeza y el ojo que ha quedado en la parte inferior con un bisturí, de esta manera facilitamos la entrada del fijador (Fig. MM.7A).
- Transferir la cabeza a un tubo con glutaraldehído (Fluka, ref. 49623) al 2% en tampón fosfato 0.1M recién preparado. Mantener en hielo mientras cortamos el resto de las cabezas.
- Añadir un volumen equivalente de tetraóxido de osmio (Polysciences Inc., ref. 0972A) al 2% preparado en tampón fosfato 0.1 M, e incubar en hielo durante 30 min.
- Eliminar la mezcla de glutaraldehído y tetraóxido de osmio, y sustituir por tetraóxido de osmio al 2%. Incubar en hielo durante 1-2 h.
- Eliminar la solución de osmio y proceder con la deshidratación del tejido, aplicando una serie de etanol a concentraciones crecientes. Concretamente se realizan lavados de 5 min con etanol al 30%-50%-70% (los tres en hielo) y, a continuación, con etanol al 90%-100%-100% (a temperatura ambiente).
- Hacer dos lavados con óxido de propileno (Fluka, ref. 82320) de 10 min cada uno.
- Eliminar el óxido de propileno y añadir una mezcla de óxido de propileno y resina (1:1). Incubar a temperatura ambiente toda la noche. La resina, de tipo epoxi Durcupan blanda, se prepara mezclando los siguientes componentes: resina (Fluka, ref. 44611), endurecedor (Fluka, ref. 44612), acelerador (Fluka, ref. 44613) y plastificante (Fluka, ref. 44614) y debe estar previamente fundida por calor.
- Sustituir la mezcla de óxido de propileno y resina por resina pura, e incubar a temperatura ambiente durante al menos 4 h.
- Transcurrido este tiempo, colocar las cabezas en los moldes (Polysciences Inc., ref. 23257) a los que previamente se les ha añadido resina.

- Rellenar totalmente los moldes con resina nueva y orientar las cabezas tal y como se indica en la figura MM.7B para hacer cortes tangenciales.
- Incubar a 70°C en un horno Pasteur durante toda la noche para que la resina polimerice.
- Desmoldar y preparar los ojos, eliminando el máximo de resina posible alrededor del ojo con una cuchilla (Fig. MM.7C), para posteriormente hacer secciones tangenciales de 1.5  $\mu\text{m}$  en un ultramicrotomo con cuchilla de diamante (Diatome, HI2983).
- Las secciones se montan en medio de montaje DPX (Fluka, ref. 44581) y se observan en un microscopio óptico de contraste de fases.



**Figura MM.7. Inclusión de ojos adultos y preparación para seccionar.** (A) Disección de uno de los ojos para dejar que penetren los diferentes tratamientos. (B) Orientación del ojo en el molde para la realización de cortes tangenciales. (C) Preparación de los ojos para la realización de secciones.

### **8.8. PREPARACIÓN DE OJOS ADULTOS PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Para el análisis de la estructura externa de la retina de ojos adultos de *Drosophila*, estos se pueden preparar de diferentes formas, para este trabajo se optó por el método del secado al punto crítico (Wolff, 2000), para el cual se siguen los siguientes pasos:

- Fijar las moscas en una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 8% en PBS durante 2 h, añadiendo Triton X-100 hasta una concentración final de 0.2% para reducir la tensión superficial y favorecer que las moscas queden completamente sumergidas en el fijador.
- Eliminar el fijador y lavar con agua estéril.
- Deshidratar las moscas mediante incubaciones de 12 h en series crecientes de etanol (una incubación en etanol al 25%, 50% y 75% y dos en etanol absoluto)

- A continuación se procede con el secado al punto crítico y sombreado en una mezcla de oro-paladio, ambas partes fueron realizadas por el Servicio de Microscopía de la Universitat de Valencia. Seguidamente, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-4100 o S-2500).

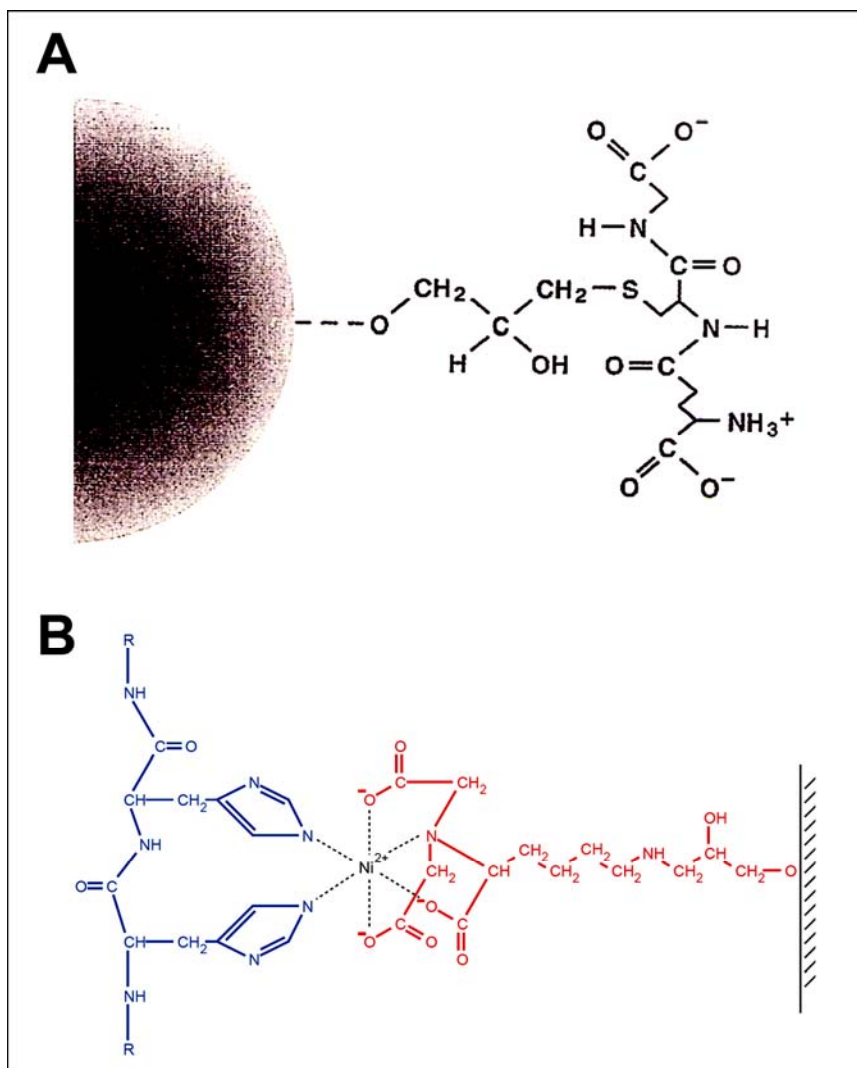
## **9. MÉTODOS BIOQUÍMICOS**

### **9.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN**

Para la expresión de proteínas en *E. coli* es recomendable la utilización de cepas con baja actividad proteasa, de esta manera se reduce la degradación de proteína. Tanto para la expresión de proteínas fusionadas a GST como a cola de histidinas se utilizó la cepa BL21.

La estrategia seguida para la purificación de ambos tipos de proteínas de fusión se basa en la cromatografía de afinidad. Para ello se utiliza una matriz capaz de reconocer y unir una etiqueta (en este caso la GST o la cola de histidinas) y de retener en ella aquellas proteínas que vayan unidas a esta etiqueta. Además, mediante este tipo de purificación se obtienen proteínas que conservan su funcionalidad y antigenicidad. En el caso de la proteína GST-Sep4 se ha utilizado una matriz Glutión sefarosa 4B (GE Healthcare, ref. 17-0756-01). En esta matriz la molécula de glutión queda anclada a la sefarosa dejando libre un sitio de unión complementario al sitio de unión de la glutión S-transferasa (Fig. MM.8A). Para las proteína His-Park, se utilizó una matriz Ni-NTA Agarosa (Qiagen, ref. R10-22-40-42143), en la cual la molécula de ácido nitrilotriacético (NTA) está unida a sefarosa y además ocupa cuatro de los seis sitios de unión a ligando del ion  $Ni^{2+}$ , dejando otros dos libres que pueden interaccionar con residuos de Histidina en una unión muy estable (Fig. MM.8B).

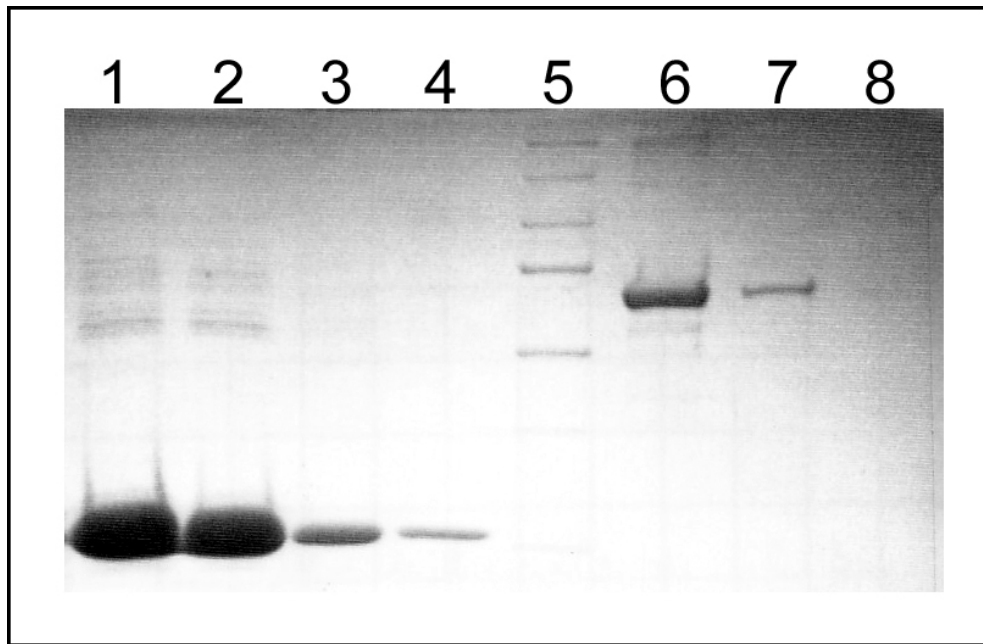
La expresión y purificación de la proteína GST-Sep4 se realizó siguiendo las instrucciones descritas en el manual *GST Gene fusion system* (Pharmacia Biotech). Para la expresión de esta proteína las células transformadas se crecieron a 30°C hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 0.5-2 y la expresión de la proteína se indujo con IPTG 0.1 mM a una temperatura de 25°C durante 4-6 h. Para la purificación se optó por el procedimiento "batch".



**Figura MM.8. Sistemas de purificación de proteínas de fusión.** (A) Molécula de glutatión unida a una matriz de sefarosa. Adaptada del manual *GST Gene fusion system* (Pharmacia Biotech). (B) Interacción entre dos de las histidinas de una proteína fusionada a una cola de 6 histidinas y el Ni<sup>2+</sup> contenido en una molécula de ácido nitrilotriacético unida a una matriz de sefarosa.

La expresión y purificación de His-Park se llevó a cabo según las instrucciones para purificación en condiciones nativas del manual *The QIAexpressionist™* (Qiagen). Las células se crecieron a 37°C hasta que alcanzaron una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0.6. La inducción se llevó a cabo añadiendo a las células IPTG hasta 0.1 mM, e incubando a 30°C durante 4-6 h. Para la purificación se utilizó un tampón de lisis con una concentración de imidazol de 2.5 mM.

En todos los casos el nivel de expresión y la purificación se visualizaron mediante electroforesis de proteínas y tinción de Comassie. La cuantificación de proteínas se realizó en gel mediante comparaciones con concentraciones conocidas de la proteína BSA (Fig. MM.9). Para confirmar que las proteínas purificadas eran las esperadas, se hicieron análisis *western blot* con anticuerpos anti-GST o anti-His según el caso.

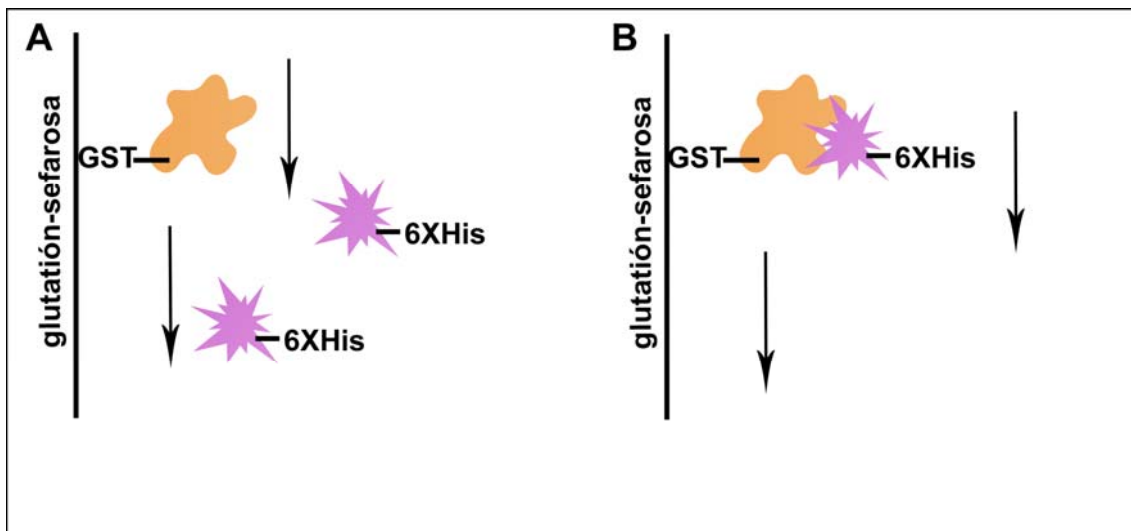


**Figura MM.9. Cuantificación de proteínas mediante tinción de Comassie.** Las carreras 1 a 4 corresponden a diferentes purificaciones de la proteína GST. Las carreras 6 a 8 muestran diferentes diluciones de la proteína BSA que sirve como patrón de concentraciones. La carrera 5 corresponde al marcador de pesos moleculares.

## 9.2. ENSAYO DE COPRECIPITACIÓN

Para determinar si existía una interacción física entre las proteínas Septin 4 y Parkin, se optó por un ensayo de coprecipitación, en el cual una de las proteínas se fija a una matriz y la otra se incuba posteriormente en la mezcla matriz-proteína. Si existe una interacción física entre ambas proteínas, la segunda proteína quedará también retenida (Fig. MM.10B). Para realizar este ensayo se siguieron los siguientes pasos:

- Incubar 25  $\mu$ g de la proteína fusionada a GST, o de proteína GST sola, con 200  $\mu$ l de matriz glutatión sefarosa 4B a 4°C durante 2 h y en rotación.
- Sedimentar la matriz por centrifugación y lavar cinco veces con 300  $\mu$ l de PBS.
- Incubar con 25  $\mu$ g de la segunda proteína (en este caso unida a cola de histidinas) a 4°C durante toda la noche.
- Sedimentar la matriz por centrifugación y lavar cinco veces con 300  $\mu$ l de PBS.
- Resuspender en 100  $\mu$ l de PBS.
- Separar las proteínas de los diferentes ensayos por duplicado en un gel de acrilamida.
- Realizar análisis *western blot* con los anticuerpos anti-GST y anti-His.



**Figura MM.10. Ensayo de coprecipitación.** (A) La proteína marcada con cola de histidinas no interacciona con la marcada con GST que está fijada a la matriz. (B) Ambas proteínas interaccionan y la proteína marcada con cola de histidinas queda retenida también en la matriz.

## 10. MÉTODOS GENÉTICOS

### 10.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS

A lo largo de este trabajo, una de las herramientas más utilizadas ha sido la inducción de la expresión de genes en tejidos concretos. Esta expresión se ha dirigido bien a tejidos dónde el gen ya se expresa de forma natural, provocando así una sobreexpresión del gen en ese tejido, o bien a tejidos dónde normalmente no se expresa, produciendo una expresión ectópica del gen. Dicha expresión se ha llevado a cabo mediante la técnica UAS/GAL4 (Brand y Perrimon, 1993) (ver apartado 3.1 de Resultados). Mediante una variación de esta técnica se puede conseguir también la reducción de la expresión de los genes de interés por ARN de interferencia (ver apartados 4.2 de Resultados).

Para la aplicación de esta técnica hubo que generar líneas de moscas transgénicas portadoras de las secuencias UAS y los ADNc de los genes de interés. Para ello, el ADNc de los genes *septin 4* y *parkin* de *Drosophila* y *SEPT5* humano se clonaron en el vector pUAST tal y como se ha descrito en el apartado 6.6.1 de esta sección. Estas construcciones fueron utilizadas para la generación de las diferentes líneas transgénicas tal y como se indica a continuación.



#### 10.1.1. Microinyección de embriones de *Drosophila*

Para la obtención de líneas transgénicas es necesaria la incorporación del ADN de interés en el genoma de *Drosophila* de una manera estable, de forma que se pueda transmitir a la descendencia. Esto se consigue mediante la inserción de las construcciones de interés en la línea germinal de embriones de *Drosophila* lo cual es posible gracias a la estructura del vector pUAST, basada en el elemento P, que permite la inserción de secuencias de ADN en el genoma en presencia de una transposasa. Por esto, los plásmidos con las construcciones de interés deben microinyectarse en la línea germinal de los embriones junto con otro plásmido denominado “helper” que aporta la transposasa necesaria para la integración de nuestra construcción en el genoma, pero que, sin embargo, ha perdido la capacidad de integrarse él mismo. Para conseguir esto se realizaron los siguientes pasos:

##### Preparación de la mezcla de microinyección

Mezclar 50 µg del plásmido con la construcción de interés y 5 µg del plásmido “helper” y añadir agua estéril hasta un volumen de 100 µl. Se precipita con etanol y NaCl 3 M pH 5.2, en una proporción 24:1, a -20°C. Después de centrifugar durante 15 min a 14000 rpm, lavar el precipitado con etanol al 70% y NaCl 0.2 M, y después con etanol al 70%. Secar el precipitado y resuspenderlo en 50 µl de tampón de microinyección (tampón fosfato 10 mM pH 7.8, KCl 5 mM).

##### Preparación de los embriones

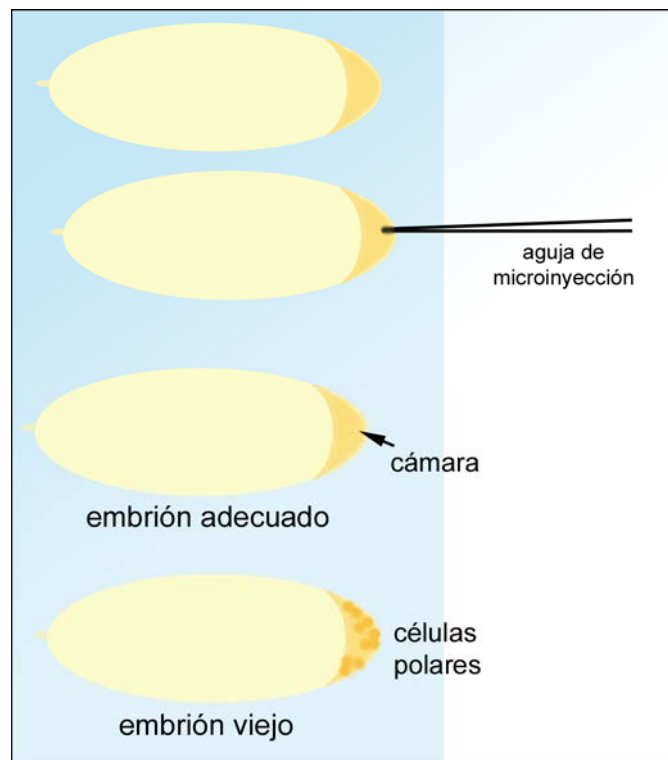
Se utilizan embriones  $w$  o  $yw$  para posteriormente poder distinguir los transformantes (ver apartado 10.1.2 de esta sección). Los embriones deben ser lo suficientemente jóvenes para que las células polares todavía no se hayan formado. Para ello se sigue el siguiente proceso, siempre a 18°C:

- Mantener los adultos en un sistema de puesta con una placa de agar que se cambia cada hora, así nos aseguramos de tener embriones de 0 a 60 min.
- Decorionizar los embriones haciéndolos rodar sobre celo de doble cara y alinearlos sobre el borde de un portaobjetos impregnado con un pegamento preparado con heptano y celo. Se deben colocar con la parte posterior hacia el exterior del portaobjetos para facilitar la microinyección.
- Finalmente, antes de pasar a la microinyección deben mantenerse en una cámara de secado durante 10 min aproximadamente (este tiempo debe determinarse experimentalmente). La cámara de secado consiste en un recipiente que contiene sulfato cálcico anhidro (T.J. Baker, ref. 01673230020).



### Microinyección

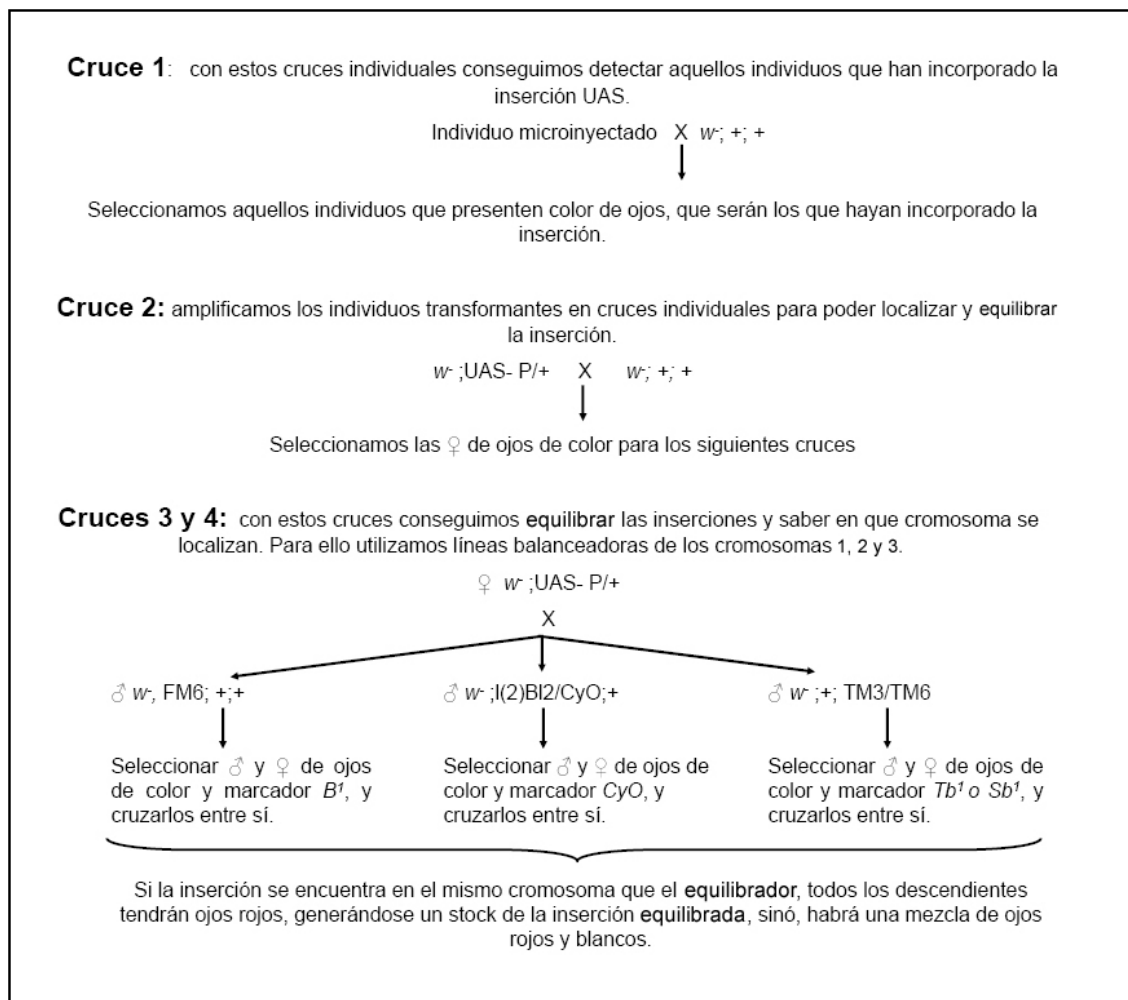
Una vez secos los embriones se cubren con aceite halocarbonado (Sigma, ref. H8898), previamente oxigenado, y se pasa inmediatamente a microinyectar la mezcla de ADN preparada anteriormente. Este proceso se realiza también a 18°C, y para ello se utiliza un micromanipulador acoplado a un microscopio invertido. Con la ayuda de una aguja de microinyección (Eppendorf, ref. 5242 952.008) se va introduciendo la mezcla de ADN en la cámara que se forma en el lugar donde posteriormente se desarrollarán las células polares del embrión (Fig. MM.11). Los embriones no aptos para microinyectar deben destruirse. Una vez microinyectados, transferir el portaobjetos a una placa de agar, asegurándose de que los embriones estén bien cubiertos de aceite, y dejar a 25°C hasta que eclosionen y se desarrollen las larvas.



**Figura MM.11. Representación de embriones preparados para microinyectar.** En la parte inferior se puede observar un embrión demasiado viejo en el cual ya se están formando las células polares y que por tanto no es apto para microinyectar. En la parte posterior del resto de los embriones se puede apreciar la cámara donde se debe depositar la mezcla de microinyección.

10.1.2. Selección de transformantes y localización y equilibrado de inserciones

Los embriones que hayan incorporado la construcción en las células de la línea germinal podrán transmitirla a su descendencia una vez se desarrollen hasta adultos. Para comprobar esta incorporación, las larvas que eclosionan después de la microinyección se transfieren a tubos con comida para que se desarrollen hasta adultos. Estos adultos se cruzan individualmente con moscas  $w^-$  o  $y^-w^-$  según la cepa escogida para la microinyección y la selección de transformantes, la localización de las inserciones y el equilibrado de las cepas se realiza siguiendo el esquema de la figura MM.12.

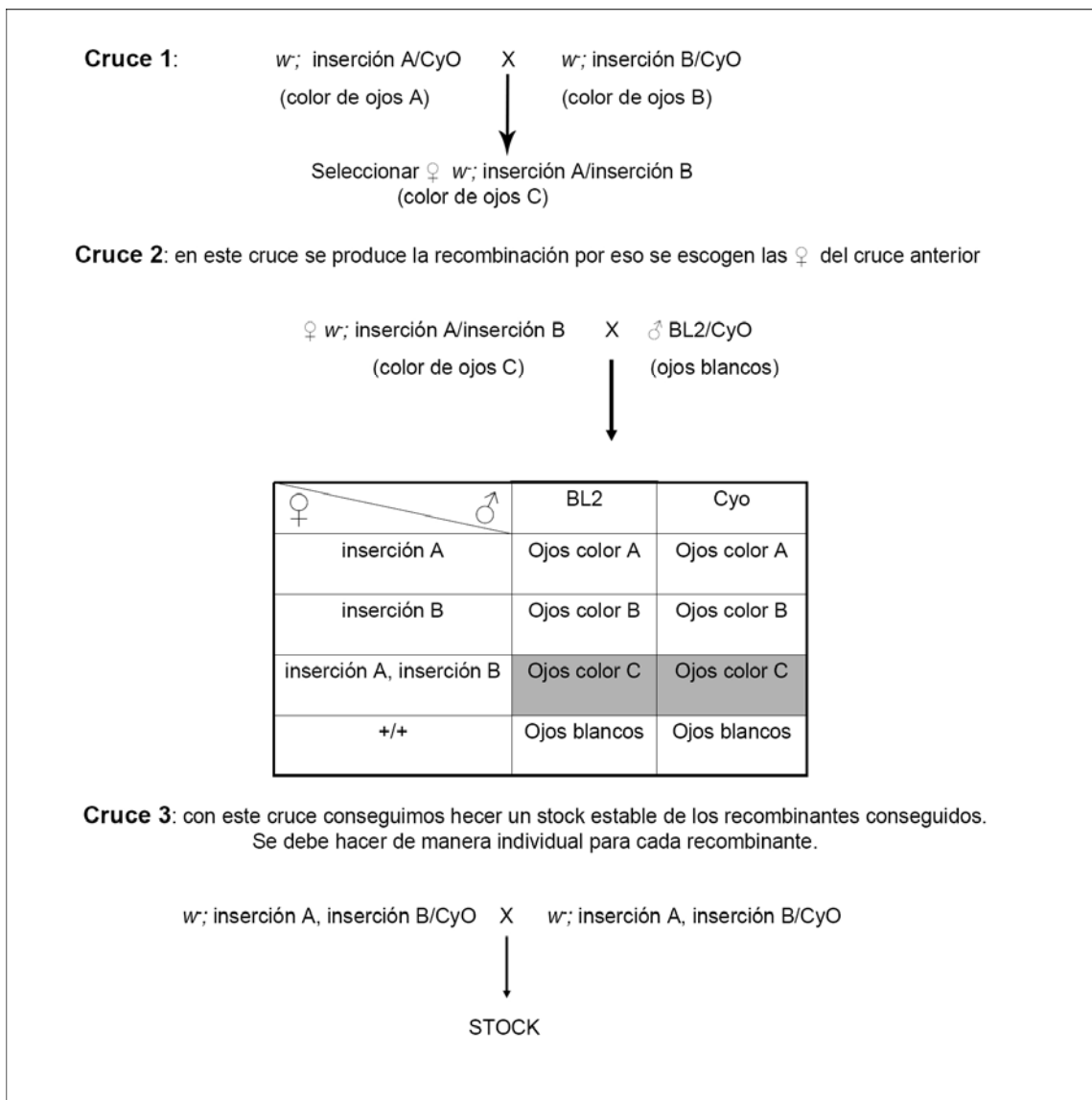


**Figura MM.12. Esquema de los cruces realizados para la selección de individuos transformantes y localización y equilibrado de sus inserciones.**

## 10.2. GENERACIÓN DE LÍNEAS RECOMBINANTES DE *Drosophila*

### 10.2.1. Generación de líneas recombinantes para dos inserciones

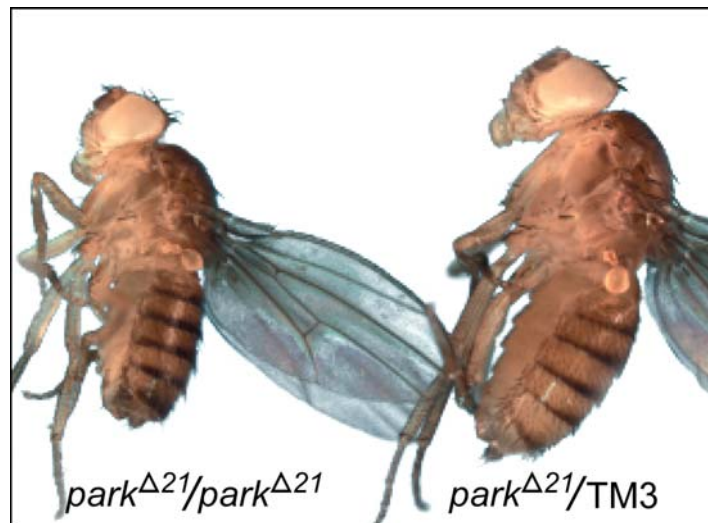
Para obtener líneas transgénicas con dos inserciones independientes en el mismo cromosoma se siguió el esquema de cruces de la figura MM.13. Para hacer este tipo de recombinantes nos fijamos en el color de ojos de las moscas, ya que las que contienen una sola inserción tienen un color de ojos diferente al que presentan las moscas con las dos inserciones. Sin embargo, si alguna de las cepas de moscas con inserciones independientes, o ambas, tiene un color de ojos intenso, este procedimiento puede ser problemático.



**Figura MM.13. Esquema de cruces seguido para generar recombinantes a partir de dos líneas transgénicas.**

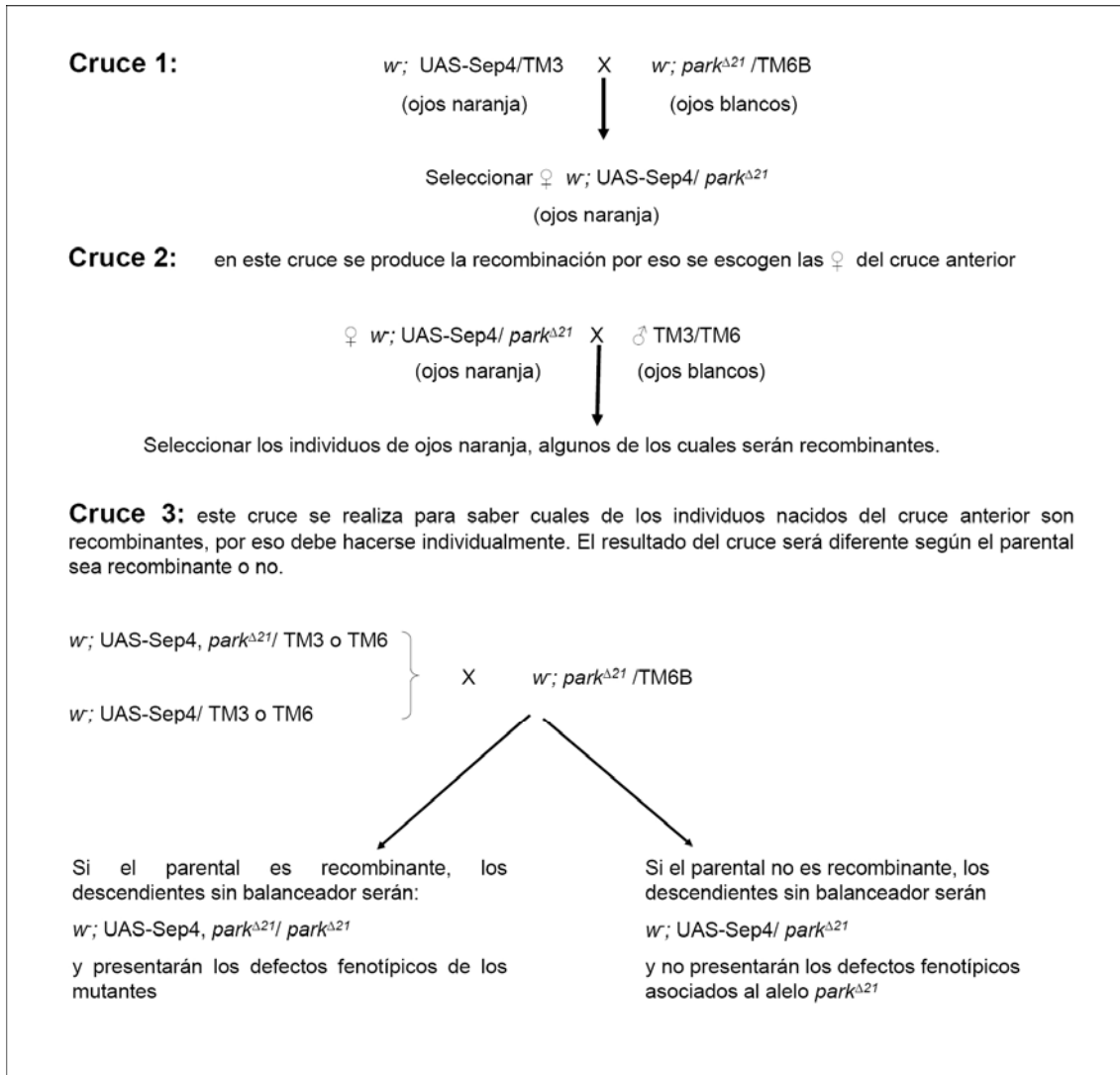
10.2.2. Generación de líneas recombinantes para una inserción UAS-Sep4 y la mutación *park*<sup>Δ21</sup>

Para generar estos recombinantes se seleccionaron algunas de las características fenotípicas externas de los mutantes *park*<sup>Δ21</sup>, como son la reducida masa corporal (Fig. MM.14) y la posición anormal de las alas. También nos fijamos en el color de los ojos debido a la inserción UAS.



**Figura MM.14. Fenotipo de los mutantes *park*<sup>Δ21</sup> y comparación con individuos heterocigotos para esta mutación.** Adaptada de Pesah y col. (2004). La posición anormal de las alas se debe a la anestesia con CO<sub>2</sub>, el fenotipo de estas moscas incluye una posición caída de las alas.

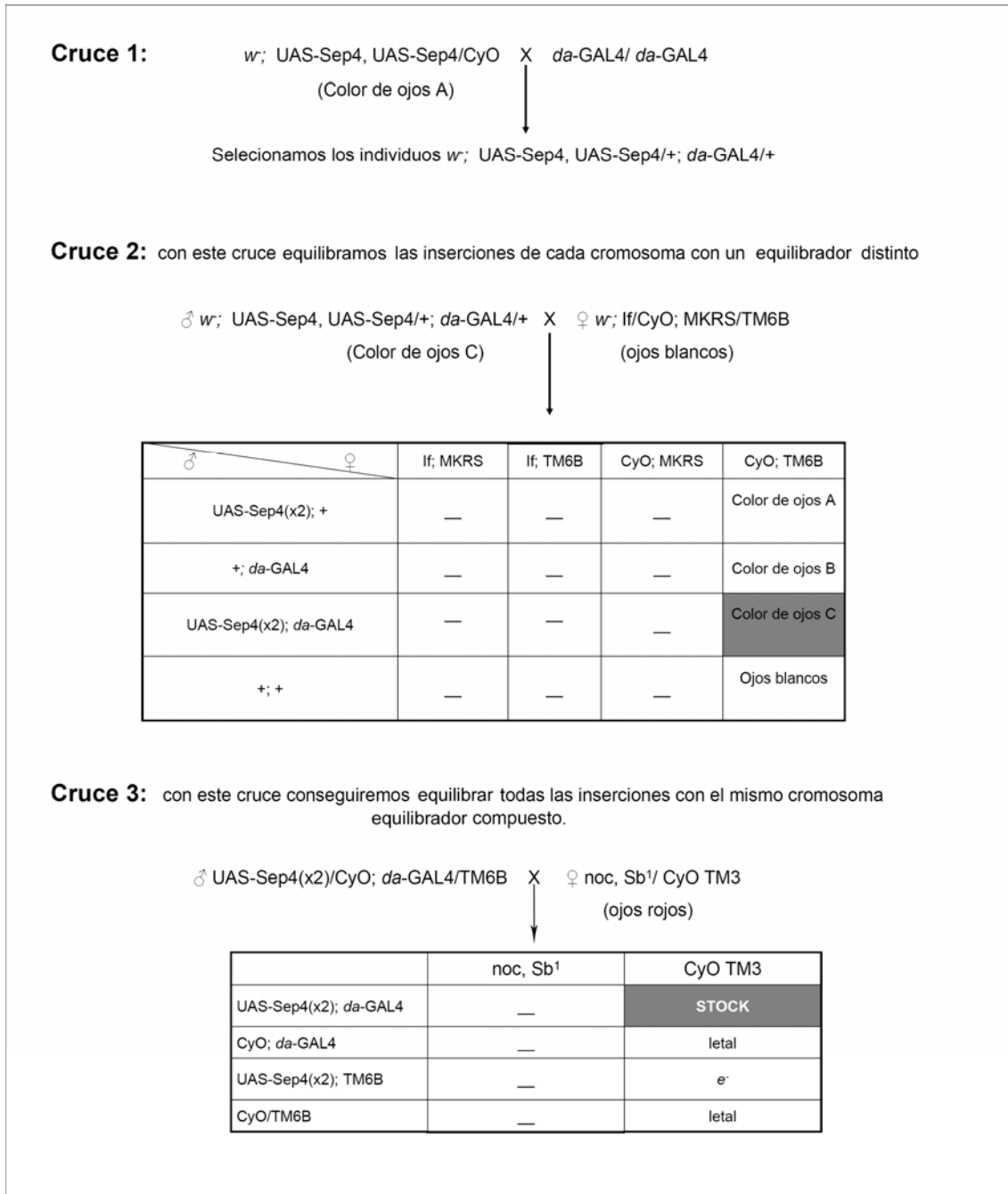
Para la obtención de estos recombinantes se siguió el esquema de la figura MM.15. El análisis de la descendencia del tercer cruce se hizo pesando cinco hembras y cinco machos de ojos naranja y sin balanceador. Los homocigotos de las líneas que se seleccionaron como recombinantes tenían un peso menor al de los no recombinantes y, como ocurre en los mutantes *park*<sup>Δ21</sup>, presentaban mayor letalidad y mostraban una posición anormal de las alas.



**Figura MM.15.** Esquema de cruces seguido para generar recombinantes  $\text{UAS-Sep4}, \text{park}^{\Delta 21}$ .

### 10.3. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA ESTABLE CON LOS ELEMENTOS $\text{UAS-SEP4}$ Y $\text{da-GAL4}$ PARA LA REALIZACIÓN DE UN RASTREO GENÉTICO

Para la generación de esta línea se partió de un recombinante que contenía dos inserciones  $\text{UAS-Sep4}$  en el cromosoma 2 y de una línea con el elemento  $\text{da-GAL4}$  en el cromosoma 3. Dado que se encontraban en cromosomas diferentes se optó por generar una línea con un cromosoma equilibrador compuesto 2-3. Esto permite tener todas las inserciones de interés equilibradas por un mismo cromosoma. El esquema de cruces que se siguió se describe en la figura MM.16.

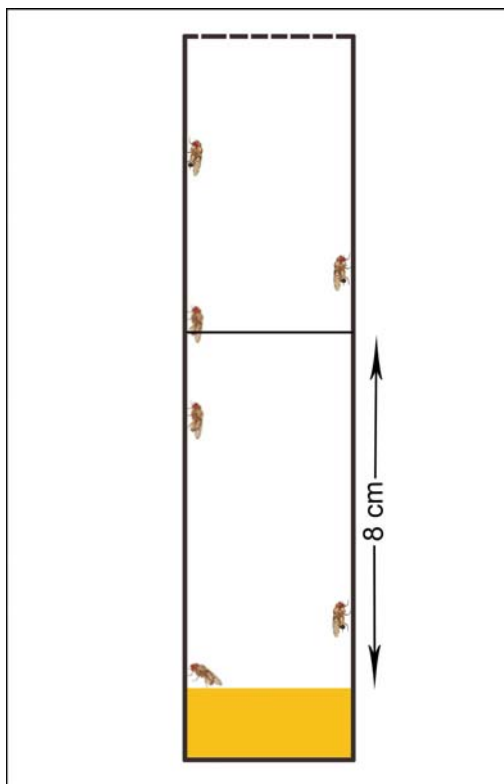


**Figura MM.16. Esquema de cruces seguido para obtener la línea  $UAS-Sep4(x2), da-GAL4/CyO, TM3$ .** Las celdas con líneas indican individuos de la descendencia que por los marcadores que presentaban podían ser descartados.

## 11. TEST DE ESCALADA

Para la cuantificación de la habilidad motora se utilizó un test de escalada basado en el comportamiento geotáctico negativo de las moscas (Feany y Bender, 2000). Para ello se introducen 30 moscas en un vial de aproximadamente 20 cm con comida (Fig. MM.17). Mediante unos golpes secos se hicieron caer las moscas al fondo del vial y pasados 18 s se contabilizaron las moscas que se encontraban por encima de una

línea situada a 8 cm de la comida. Esto se repite 10 veces para cada vial de moscas. El ensayo se realizó cada 2-3 días transfiriendo las moscas a viales con comida fresca cada vez. Las moscas que morían se sustituyeron por otras de la misma edad, con la precaución de dejar pasar 24 h antes de realizar el test dejando así que se recuperaran por completo de la anestesia. Todos los tests se llevaron a cabo a 25°C y con las mismas condiciones de iluminación. Para cada genotipo se realizaron dos repeticiones.



**Figura MM.17. Representación del sistema utilizado para la realización de los test de escalada.**

## **12. TEST DE LETALIDAD**

Para los análisis de letalidad, los cruces se realizaron en botellas, de manera que fuera posible recontar al menos unos 500 individuos de la descendencia. La administración del compuesto L-dopa (Sigma, ref. D9628) se realizó añadiendo la cantidad deseada directamente a la comida en la cual se desarrollaron los cruces (Pendleton y col., 2002).

### **13. TEST DE LONGEVIDAD**

Para analizar la longevidad de las moscas se introdujeron 40 individuos nacidos el mismo día en un vial de aproximadamente 20 cm de diámetro con comida. Cada 2-3 días las moscas se transfirieron a viales nuevos y se realizó el recuento de las moscas vivas. Las moscas se mantuvieron a 25°C durante todo el experimento. Para cada genotipo se realizaron tres réplicas.

### **14. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS**

El desarrollo desde hace años de un gran número de herramientas informáticas ha facilitado en muchos casos el trabajo en la investigación. Para la realización de este trabajo se han utilizado algunas de estas herramientas tanto para extraer información como para la obtención y análisis de resultados.

#### **14.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS DE CAPTACIÓN DE IMÁGENES**

- Leica Application Suite: programa de captación y tratamiento de imágenes en microscopio óptico.
- Leica Confocal Software (LCS Lite): programa de captación y tratamiento de imágenes en microscopio confocal.
- 1D Manager (T.D.I. sa): programa de captación y análisis de imágenes a partir de geles y membranas.

#### **14.2. RECURSOS EN LA RED:**

##### 14.2.1. Páginas sobre *Drosophila*

- <http://flybase.bio.indiana.edu/>: esta es la página web más importante dedicada a *D. melanogaster*; en ella se puede encontrar extensa información acerca de:
  - genes y alelos
  - datos moleculares
  - vectores e inserciones de transposones
  - aberraciones cromosómicas y cromosomas equilibradores
  - líneas de moscas
  - referencia bibliográficas
  - investigadores de *Drosophila*
  - otras páginas especializadas en aspectos concretos de *Drosophila*
- <http://www.fruitfly.org/>: es la página web del Proyecto Genoma de *Drosophila* de Berkeley (BDGP); contiene información sobre datos moleculares incluyendo:



- clones genómicos
- mapas genómicos
- ADNc de proyectos de ESTs
- Datos de expresión
- líneas con inserciones de elemento P del BDGP *Gene Disruption Project* entre otros proyectos
- <http://flystocks.bio.indiana.edu/>: esta es la página web del centro de cepas de *D. melanogaster* en Bloomington, en el cual se pueden encontrar un gran número de cepas de diferentes tipos:
  - inserciones
  - deleciones
  - líneas GAL4
  - mutantes
  - balanceadores
  - etc
- <http://flybrain.neurobio.arizona.edu/>: en esta página se puede encontrar información detallada sobre el cerebro de *Drosophila*:
  - imágenes de secciones y 3D de las diferentes regiones del cerebro obtenidas mediante diferentes técnicas.
  - protocolos
  - bibliografía
- <http://www.sdbonline.org/fly/atlas/00atlas.htm>: en esta página podemos encontrar representaciones esquemáticas de los diferentes estadios de *Drosophila* y el proceso de desarrollo de los diferentes tejidos.

### 14.2.2. Páginas para el análisis de secuencias

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/>
- <http://www.infobiogen.fr/>
- <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>: permite realizar análisis de restricción de secuencias nucleotídicas.
- <http://align.genome.jp/>: esta página nos permite el alineamiento de secuencias.

### 14.2.3. Otras direcciones

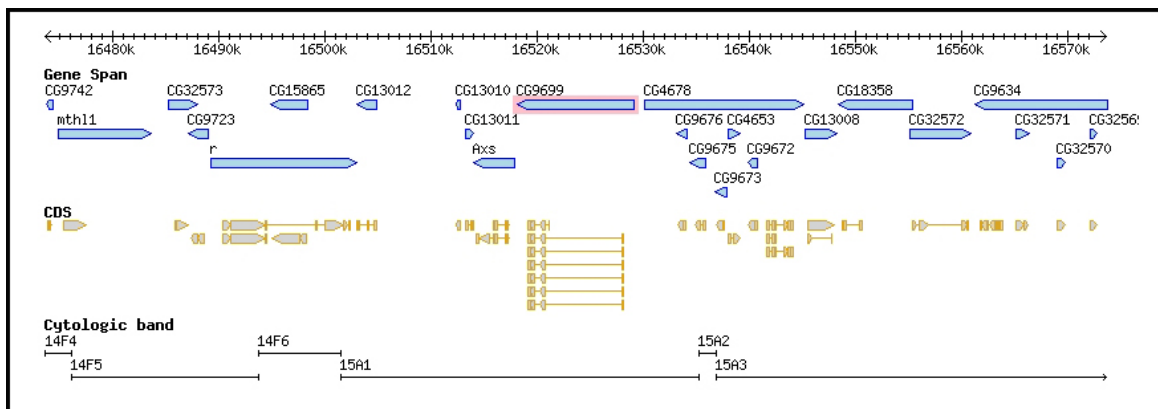
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>: esta página nos permite una rápida búsqueda de información bibliográfica.

# *Resultados*

## 1. BÚSQUEDA DEL GEN ORTÓLOGO DEL HUMANO SEPTIN 5 EN *Drosophila melanogaster*

Tal y como se ha comentado en la Introducción, la proteína SEPT5 fue el primer sustrato de parkin que se describió (Zhang y col., 2000). El hecho que SEPT5 perteneciera a una familia proteica ampliamente representada en el reino animal nos hizo plantearnos que sería interesante identificar un homólogo del gen *SEPT5* en *Drosophila*, el cual podría servir, tal y como se ha descrito también en ratón (Dong y col., 2003), para determinar el efecto de la acumulación de sustratos de Parkin. Para ello, comparamos la secuencia de la proteína SEPT5 con las bases de datos de secuencias proteicas del genoma de *Drosophila*, utilizando la herramienta Blastp del “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”. Según esta búsqueda, la proteína de *Drosophila* que más se parece a SEPT5 es la proteína codificada por el gen *CG9699*. El resultado de este análisis mostró que esta proteína presenta una identidad de secuencia del 59% y una similitud del 78% con SEPT5.

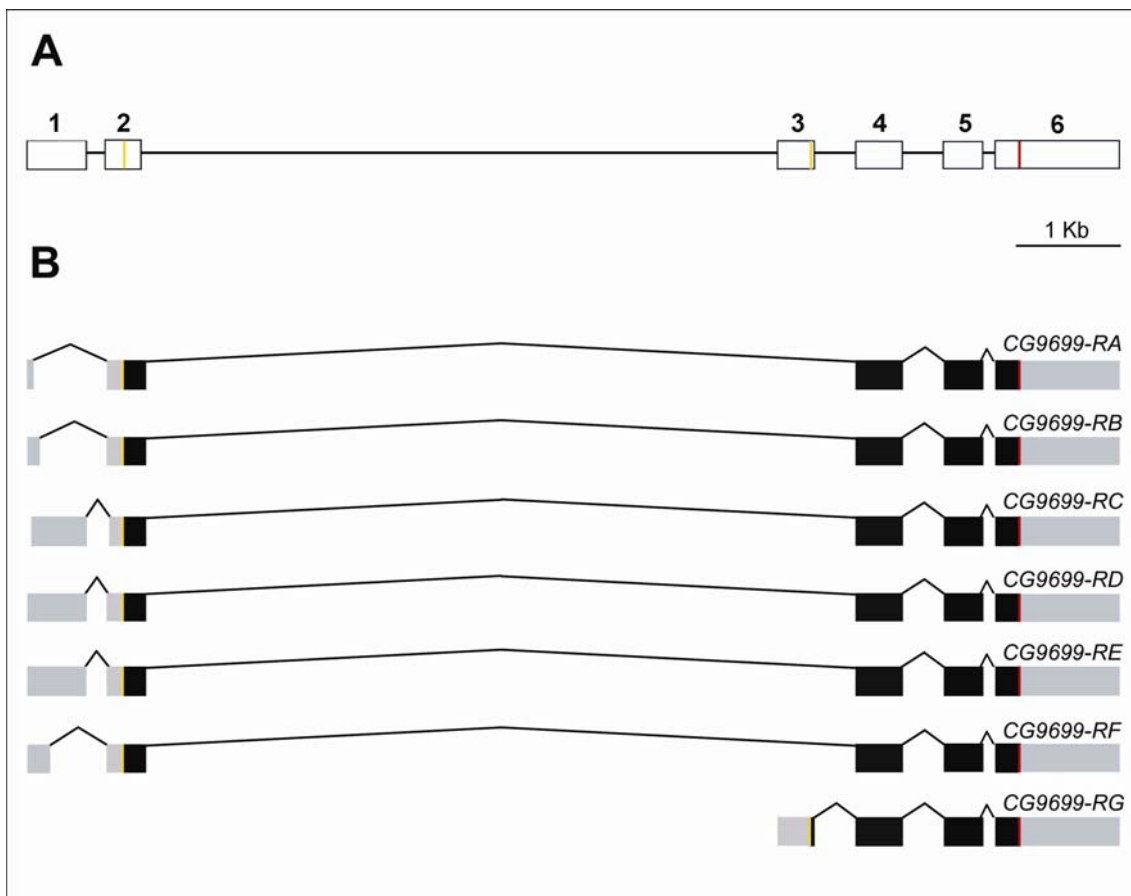
Según la base de datos del genoma de *Drosophila* (Flybase), el gen *CG9699* se localiza en la región 15A1 del cromosoma X (Fig. R.1) y consta de 6 exones (Fig. R.2A).



**Figura R.1. Localización cromosómica del gen *CG9699*.** Representación de la región cromosómica en la que se localiza el gen *CG9699*, el cual aparece resaltado en color rosa. En la parte inferior de la figura se puede apreciar la división en regiones cromosómicas.

Búsquedas en la Flybase nos permitieron identificar 7 transcritos diferentes derivados de este gen, designados como *CG9699-RA*, *RB*, *RC*, *RD*, *RF* y *RG* (Fig. 2B), los cuales se pueden generar por un mecanismo de procesado alternativo. Los transcritos *A*, *B*, *C*, *D*, y *E*, se diferencian básicamente en los extremos 3' y 5' del exón 1 y en el extremo 3' del exón 2, aunque estas diferencias son, en ocasiones, solamente de algunos pares de bases y quedan todas por delante del sitio de inicio de la traducción (Fig. R.2B). El transcrito *G*, por otro lado, es el que más diferencias

presenta, ya que es el único que contiene el exón 3, además de carecer de los exones 1 y 2 (Fig. R.2B). A pesar de esta diversidad de transcritos, todos ellos codifican la misma proteína de 427 aminoácidos excepto el transcrito *CG9699-RG* que da lugar a una proteína más corta que carece de los primeros 54 aminoácidos del extremo amino terminal (Fig. R.2B). Según los datos encontrados en Flybase, esta proteína contiene motivos de unión a GTP y por su secuencia ha sido clasificada como componente del anillo de septinas y del citoesqueleto (Goldstein y Gunawardena, 2000) y se le atribuye, como a otras septinas, un papel en los procesos de mitosis y citocinesis, aunque no existe ningún estudio funcional sobre ella.



**Figura R.2. Estructura del gen *CG9699* y de sus transcritos.** (A), representación de la estructura de exones del gen *CG9699*. Las líneas amarillas de los exones 2 y 3 representan dos sitios alternativos de inicio de la traducción. La línea roja del exón 6 señala el codón de final de la traducción. (B), representación de la estructura de los diferentes transcritos predichos para el gen *CG9699*. Las regiones no traducidas aparecen en color gris mientras que las regiones que se traducen aparecen en negro.

Curiosamente, en la región 15A1-A2 se indicaba la existencia de un gen con el nombre de *septin 4*. Los únicos datos sobre este gen disponibles en la base de datos Flybase eran que codificaba una GTPasa posiblemente implicada en citocinesis. Debido a que el gen *CG9699* está localizado en la misma región cromosómica y

codifica una proteína con las mismas características, asumimos que ambos genes son en realidad el mismo. De esta forma, a partir de ese momento denominamos *septin 4* al gen CG9699.

En el genoma de *Drosophila* existen otros genes que codifican proteínas de la familia de las septinas además de *septin 4*: *septin 1*, *septin 2*, *septin 5* y *peanut*. Algunas de ellas parecen estar relacionadas y, como ocurre en mamíferos, son capaces de formar complejos (Field y col., 1996; Shih y col., 2002). Anteriormente se había identificado al gen *peanut* (*pnut*) de *Drosophila* como el homólogo del gen humano *SEPT5* en la mosca (Zieger y col., 1997). Sin embargo, la secuenciación completa del genoma de *Drosophila* (Adams y col., 2000) nos ha permitido realizar un análisis más exhaustivo y comprobar que esto no es así, ya que *SEPT5* y *Peanut* presentan una identidad del 49% y una similitud del 70%. Si comparamos este resultado con el obtenido para *Septin 4*, vemos que el porcentaje de similitud es mayor. En la figura R.3 se muestra un alineamiento de las tres proteínas con el programa CLUSTALW.

Asumiendo que el porcentaje de similitud existente entre proteínas ortólogas es mayor que el que presentan con cualquier otra proteína del organismo con el que se compara, formando lo que se denominan *SymBets* (Koonin, 2005), y con el objetivo de determinar si *Septin 4* y *SEPT5* son realmente proteínas ortólogas, realizamos el análisis contrario, es decir, se tomó la secuencia de la proteína *Septin 4* de *Drosophila* y se utilizó para realizar un Blastp con las bases de datos de proteínas del genoma humano. Mediante este análisis observamos que la proteína humana con mayor similitud a *Septin 4* era la proteína *SEPT5*, confirmando nuestra hipótesis. Por otro lado, también observamos que la proteína humana *septin 4* (*SEPT4*) compartía con *Septin 4* un nivel de identidad similar al que presentaba *SEPT5*. Además, determinamos que la proteína de *Drosophila* con mayor similitud a *SEPT4* era también *Septin 4*. Mediante un alineamiento de las tres proteínas con el programa CLUSTALW observamos que las dos septinas humanas presentan un 75% de identidad (Fig. R.4). Sin embargo, este análisis también nos permitió determinar que *Septin 4* presenta mayor identidad con *SEPT5* (57%) que con *SEPT4* (50%).

Estos resultados indican que el gen *septin 4* es el gen ortólogo de *SEPT5*, por lo que decidimos centrar el trabajo en este gen. Nuestro objetivo era averiguar si la homología entre estos genes era únicamente de secuencia, o si presentan además una homología funcional, con el fin de analizar el efecto de la acumulación de un potencial sustrato de Parkin en *Drosophila*.



SEPT4	MDRSLGWQNSVPEDRTEAGIKRFLDITDDGELSKFVKDFSGNASCHPPEAKTWASRPQVPEPRPQAPDLYDDDDLEFRPPSRPQSSDNDQ
SEPT5	-----
Sep4_A-F	-----MKHQPPPPPLPSQPPTMGATAAGGVASVIS
SEPT4	QYFCAPAPLSPARPRSPWGKLDPYDSEDDKEYVGFATLPNQVHRKKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVNSLFLTDLYDRKLLGAEE
SEPT5	-----MSTGLRYKSKLATPEDKQIDIKQYVGFATLPNQVHRKKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVHSLFLTDLYKDRKLLSAEE
Sep4_A-F	TMNGSSSGIEAVKCRPIIYKPKTPSFDKDRDYIGFATLPEQVHRKKSVKRGFEFTLMVVGESGLGKSTLINSFLGLDLYKNRQMPNVEE
SEPT4	RIMQTVETKHAVDIEEKGVRLRLTIVDTPGFGDANNTECWPVABYIDQQFEQYFRDESGLNRRKNIQDNRVHCCLYFISPFHGLRPL
SEPT5	RISQTVETLKHITVDIEEKGVKLLTIVDTPGFGDANNTECWPITDYVDQQFEQYFRDESGLNRRKNIQDNRVHCCLYFISPFHGLRPL
Sep4_A-F	RIEKTTKVEKKTMDIEERGVRLRLTVVDTPGFGDANNTECWSRVCTQYIDEQFRQYFTDESGLNRRNIQDNRVHCCLYFVPPWGHSLRQM
SEPT4	DVEFMKALHQRVNIVPILAKADTLTPPEVDHKKRIRIEIEHFGIKIYQPPDCDSDEDEDFKLQDQALKESIPFAVIGSNTVVEARGRRV
SEPT5	DVGFMKALHEKVNIVPLIAKADCLVPSEIRKLERIRIEIDKFGIHVYQFPECDSDDEDEDFKQDRELKESAPFAVIGSNTVVEAKGQRV
Sep4_A-F	DLDLIRRLHLKVNIVLVIGKADCLNKQEVKRLKERILQDLEDNHIQLYQFPECDSDDEDDDFKQDRELKASIPFAVIGSNTVVEAGKKV
SEPT4	RGRLYPWGIVEVENPGHCFVKLRLTMLVTRTHMQDLKDVTRETHYENYRAQCISQSMTRLVVKERNRKLKLTRESGTFPIPAVPPGT-DPET
SEPT5	RGRLYPWGIVEVENQAHCDFVKLRLNMLIRTHMHLKDVTCDVHYENYRAHCIIQQT-----SKLTQDSRMESPIPLPLTPDAET
Sep4_A-F	RGRQYPWGVVNVEDPQHSDFIKLRTFLISTHMQLKDTTQDVHYENFRAQCISQISQHALRERGLKLRDSISSSTNG-----FDAAISET
SEPT4	EKLIREKDEELRRMQEMLHKIQKQMKENYKLIKIREKDEELRRMQEMLHKIQKQMKENY
SEPT5	EKLIRMKDEELRRMQEMLQRMKQMQDQ-----
Sep4_A-F	DRLLLQKDEEIRRMQDMLTQMQEKLKQTHLMEKKNDSVIDV-----

Figura R.2. Alineamiento entre las secuencias de la proteína Septin 4 de *Drosophila* y las proteínas SEPT4 y SEPT5 humanas.



## **2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN *septin 4***

Para determinar si las proteínas Septin 4 de *Drosophila* y SEPT5 humana podrían estar actuando en procesos similares, era interesante conocer dónde y cuando se expresa el gen *septin 4*. Con este objetivo determinamos el patrón de expresión de este gen en diferentes estadios del desarrollo y también en diferentes tejidos siguiendo dos aproximaciones diferentes, *Northern blot* e hibridación *in situ*.

### **2.1. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN TEMPORAL**

La expresión de *septin 4* en diferentes momentos del desarrollo se determinó mediante *Northern blot*, tal y como se ha descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos. Para ello, se realizó la extracción y posterior análisis del ARN total de embriones de 0 a 24 horas, así como de larvas de tercer estadio e individuos adultos de la cepa *OrR*. Mediante este análisis se detectaron dos transcritos de aproximadamente 2.4 y 2.7 Kb. Además, se pudo observar que estos dos transcritos se expresan de diferente manera en los distintos estadios analizados. En embriones y adultos ambos transcritos están presentes. Sin embargo, ninguno de los dos es detectable en el tercer estadio larvario, bien porque no se está expresando o bien porque los niveles a los que lo hace son demasiado bajos (Fig. R.5).

Por otra parte, también se pudo comprobar que los dos transcritos no se detectan con la misma intensidad en todos los estadios del desarrollo en los que están presentes. Mientras que en adultos los dos transcritos aparecen con la misma intensidad, en embriones la señal del transcrito de 2.7 Kb es aproximadamente 1.3 veces menor que la del de 2.4 Kb. Además, se puede ver que ambos transcritos se detectan con bastante mayor intensidad en adultos que en los estadios embrionarios (Fig. R.5).



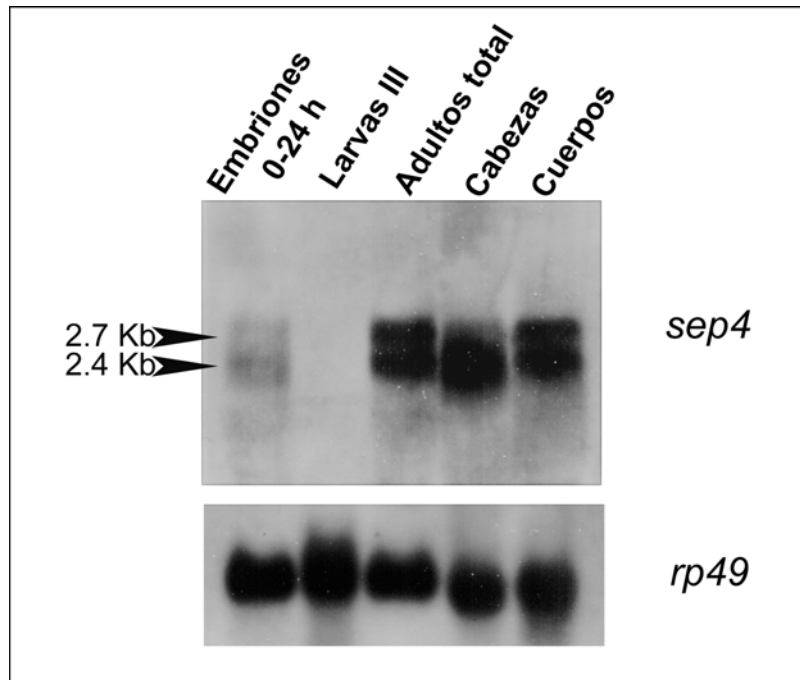


Figura R.5. Análisis *Northern blot* de la expresión del gen *septin 4* en diferentes estadios del desarrollo y en diferentes tejidos. El tamaño de los dos transcritos detectados se encuentra señalado en la parte izquierda de la figura. El gen *rp49* fue utilizado como control de carga.

## 2.2. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN ESPACIAL

### 2.2.1. En embriones

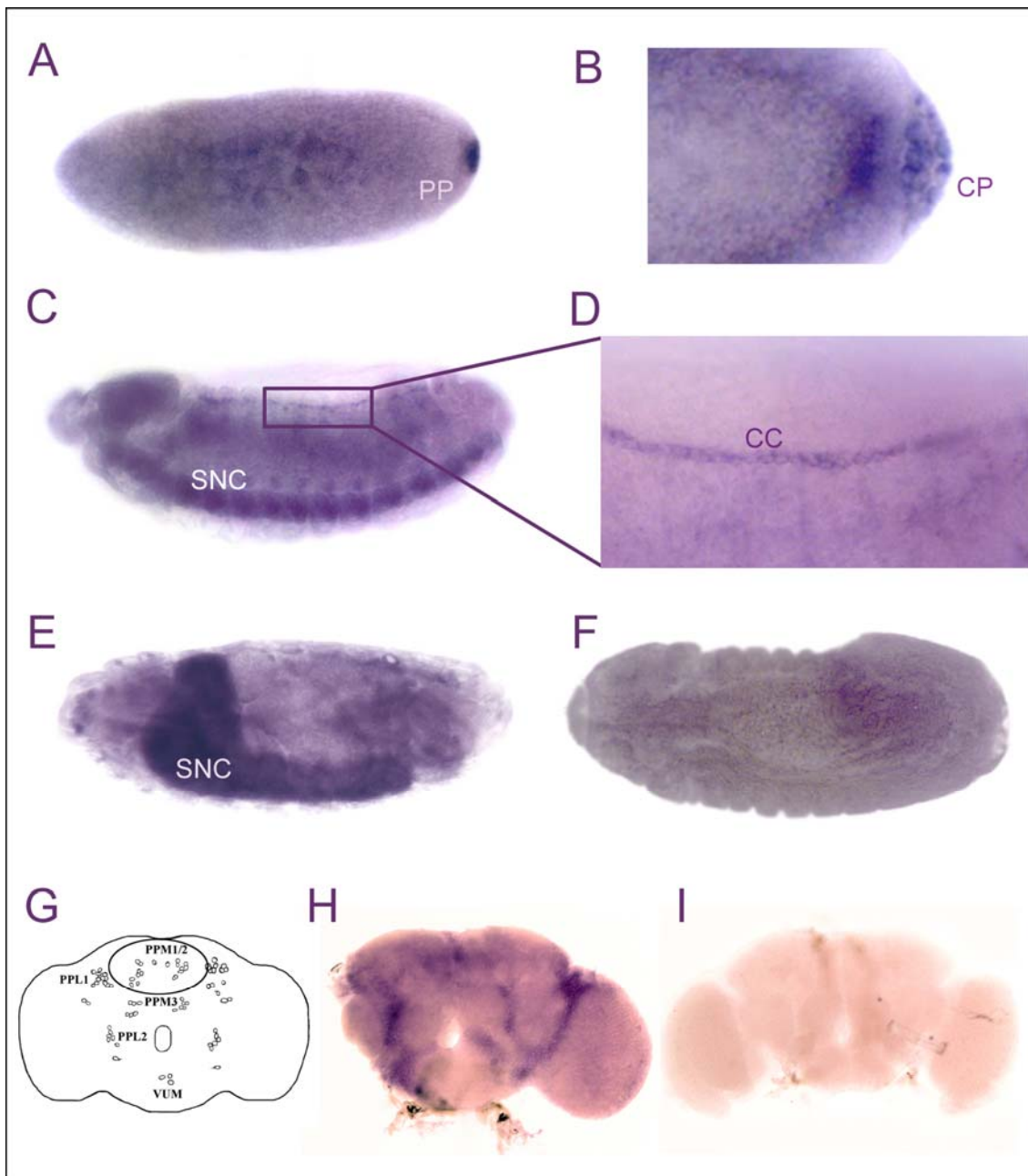
Para la determinación del patrón de expresión de *septin 4* en los diferentes tejidos embrionarios, se recolectaron embriones de 0 a 24 horas y se sometieron a una hibridación *in situ* con una sonda complementaria al ARN del gen (ver apartado 7.3 de Materiales y métodos). Paralelamente, y como control negativo, se realizó el mismo análisis con una sonda que contenía la misma secuencia que el ARNm del gen *septin 4*. Nuestros resultados indican que *septin 4* se expresa desde estadios del desarrollo muy tempranos, puede que por contribución materna, aunque de una forma bastante débil. En estos primeros estadios *septin 4* se expresa en el plasma polar y posteriormente en las células polares (Fig. R.6A y B). Más adelante puede observarse su expresión en neuroblastos aunque ésta continúa siendo débil. A partir del estadio 11-12 y hasta el final del desarrollo embrionario, la expresión es más intensa y se localiza en el sistema nervioso central (SNC) (Figs. R.6C y E) y en las células cardíacas (Figs. R.6C y D), las cuales pasarán posteriormente a formar parte del corazón adulto. Este patrón de expresión es similar al que presenta su homólogo humano *SEPT5*, el cual también se expresa en cerebro y en corazón (Zieger y col.,

2000). Estos datos sugieren que las proteínas SEPT5 y Septin 4 podrían estar actuando en procesos similares en humanos y en *Drosophila*.

### 2.2.2. En adultos

Dado que *SEPT5* se expresa mayoritariamente en el SNC, realizamos un estudio más detallado de ese tejido en *Drosophila*. La mayor parte de la cabeza de las moscas adultas está ocupada por el cerebro, el cual, a su vez, es el componente mayoritario del SNC adulto. Por esto analizamos la expresión de *septin 4* en el cerebro y la comparamos con la del resto de tejidos adultos. Para conseguirlo analizamos la expresión de los diferentes transcritos en cabezas y en cuerpos por separado mediante *Northern blot*. Según los resultados obtenidos en el análisis mediante esta técnica, ambos transcritos, de 2.7 y 2.4 Kb, se detectan tanto en cabezas como en cuerpos, sin embargo, su expresión presenta variaciones. En cuerpos los dos transcritos presentan unos niveles de expresión similares. Sin embargo, en cabezas el nivel de expresión del transcrito de 2.4 Kb es aproximadamente 1.5 veces mayor que el del transcrito de 2.7 Kb según el análisis densitométrico. Este análisis también mostró que el transcrito de 2.4 Kb es más abundante en cabezas que en cuerpos, mientras que el transcrito de 2.7 Kb, aparece mayoritariamente en cuerpos (Fig. R.5).

Posteriormente, para determinar en que zonas del cerebro se expresa *septin 4*, realizamos una hibridación *in situ* en cerebros adultos enteros utilizando una sonda del gen. El control negativo se realizó del mismo modo que en la hibridación *in situ* de embriones. Mediante esta segunda aproximación, pudimos comprobar que *septin 4* se expresa en zonas específicas del cerebro, las cuales, curiosamente, parecen coincidir con el patrón de disposición de algunos de los *clusters* de neuronas dopaminérgicas (DA), incluyendo el *cluster* dorsomedial (DM) (comparar Figs. R.6G y H).



**Figura R.6. Expresión del gen *septin 4* en embriones y cerebro adulto de *Drosophila*.** (A-E), expresión en embriones de diferentes estadios, en todos los casos los embriones están orientados con la parte anterior a la izquierda y la parte dorsal arriba. (A-B), embriones tempranos, (C-D), embriones de estadio 13, (E), embrión de estadio 17. (F), control negativo de la expresión de *septin 4* con la antisonda del gen. (G), representación esquemática de los diferentes grupos de neuronas DA en el cerebro adulto. El grupo de neuronas dentro de la elipse corresponde la *cluster DM*. (H), expresión de *septin 4* en el cerebro adulto de *Drosophila*. (I), control negativo de la expresión en cerebros. PP, plasma polar, CP, células polares, SNC, sistema nervioso central, CC, células cardíacas, PPM, *protocerebral posterior medium*, PPL, *protocerebral posterior lateral*, VUM, *ventral unpaired medium*.

Dado que partimos de la hipótesis que Septin 4 podría ser también un sustrato de Parkin en la mosca, el hecho de que este patrón de expresión coincida con el encontrado para el gen *parkin* de *Drosophila* (Cha y col., 2005) es un dato significativo,

ya que para que Parkin pueda ubiquitinar a Septin 4, ambas proteínas deben estar presentes en el mismo tejido.

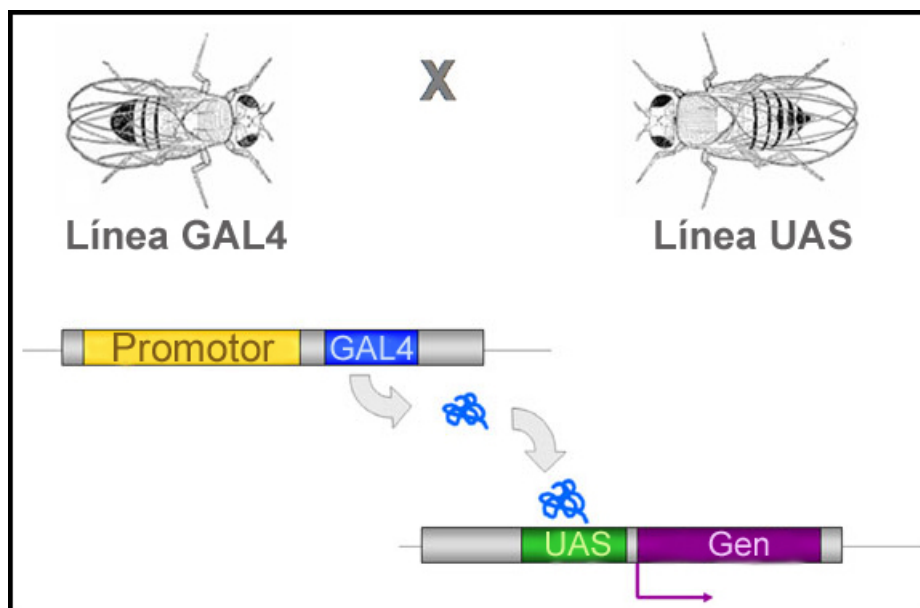
### **3. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SEPTIN 4**

Los resultados tanto de homología de secuencia como de expresión sugieren que *septin 4* podría presentar también una homología funcional con *SEPT5*, y que, al igual que en humanos, podría codificar un sustrato de Parkin. Si esto fuera así, una sobreexpresión de Septin 4 podría ser tóxica, ya que los niveles de Parkin podrían no ser suficientes para marcar a Septin 4 para su degradación. En anteriores estudios se ha demostrado que la sobreexpresión de la homóloga en ratón de *SEPT5* en neuronas DA resulta tóxica, produciendo la degeneración de estas neuronas (Dong y col., 2003). De manera que decidimos analizar el efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en la mosca. Suponiendo que Septin 4 y *SEPT5* presentan homología funcional, el análisis de la acumulación de un potencial sustrato de Parkin en *Drosophila* abriría nuevas posibilidades para el estudio de la ruta de patogénesis de la EP, aprovechando las facilidades que comporta el trabajo con *Drosophila* y las potentes herramientas desarrolladas en este organismo.

#### **3.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS UAS-Sep4**

La técnica UAS/GAL4 (Brand y Perrimon, 1993) supuso un gran avance para los estudios en *Drosophila* y ha servido desde entonces para la generación de nuevas herramientas de trabajo con la mosca y de numerosos modelos, algunos de los cuales han permitido el estudio de ciertas enfermedades neurodegenerativas (ver apartado 3 de Introducción). El éxito de este sistema consiste en la posibilidad de dirigir la expresión de genes a tejidos concretos. Además, se trata de un sistema sensible a la temperatura, la cual permite regular el nivel de expresión del gen de interés. Para ello, como se puede ver en la figura R.7, se necesitan dos líneas de moscas transgénicas. La primera de ellas, llamada "driver" o línea GAL4, expresa el factor de transcripción GAL4 siguiendo el patrón determinado por el promotor de un gen concreto. La segunda línea contiene una inserción en la cual el gen de interés se sitúa aguas abajo de una serie de secuencias UAS de levadura. De esta manera, si cruzamos ambas líneas, en la descendencia, el factor GAL4 se une a las secuencias UAS consiguiendo así la transcripción del gen siguiendo el patrón de expresión del promotor de la línea GAL4. Así podemos expresar cualquier gen en un tejido o momento del desarrollo concreto. Por tanto, el sistema UAS/GAL4 nos permite analizar el efecto de la expresión ectópica de un gen, pero también nos permite el análisis de la acumulación

excesiva de su proteína por sobreexpresión en un tejido en el cual se expresa de forma natural.



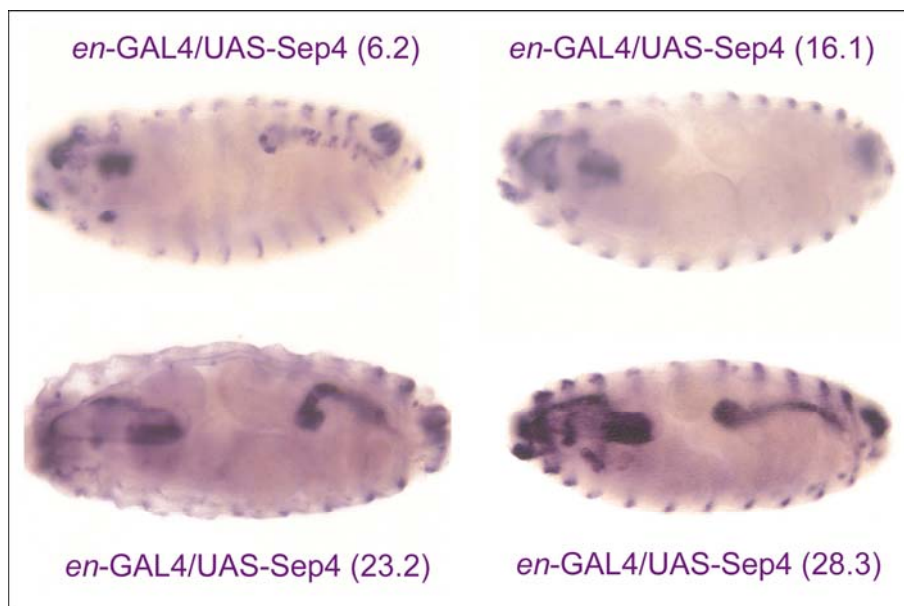
**Figura R.7. Esquema del sistema UAS/GAL4 de *Drosophila*.**

Dadas sus características, utilizamos el sistema UAS/GAL4 para analizar el efecto que pudiera tener la sobreexpresión de Septin 4 en neuronas DA. Para ello, necesitábamos una línea GAL4 que dirigiera la expresión a estas neuronas (ver apartado 3.2 de Resultados) y una línea UAS que permitiera la expresión del gen *septin 4* en presencia del factor GAL4. Con este objetivo, generamos una serie de líneas transgénicas independientes UAS-Sep4 según se ha descrito en el apartado 10.1 de Materiales y métodos. Una vez generadas estas líneas se localizó el cromosoma en el cual se había insertado la construcción y las equilibramos siguiendo el esquema descrito en la figura MM.12. Durante este proceso se descartaron aquellas líneas que, debido a la aparición de varios colores de ojo, parecían presentar más de una inserción. Las líneas obtenidas, así como el cromosoma donde se localizó cada inserción, se resumen en la tabla R.1.

Línea	Cromosoma
UAS-Sep4 (6.2)	2
UAS-Sep4 (16.1)	3
UAS-Sep4 (23.2)	2
UAS-Sep4 (28.3)	3

**Tabla R.1. Líneas transgénicas UAS-Sep4 y localización de las inserciones.**

El nivel de expresión de los transgenes depende en gran medida de la zona donde se haya insertado la construcción, de manera que cada línea de moscas derivada de una inserción independiente tendrá diferentes niveles de expresión utilizando una misma línea GAL4. Para determinar el nivel de expresión relativa de las diferentes líneas generadas, éstas se cruzaron con la línea *engrailed*-GAL4 (*en*-GAL4), la cual tiene un patrón de expresión bien determinado, en el compartimento posterior de cada segmento (Fjose y col., 1985; Kornberg y col., 1985), y que resulta fácil de visualizar en embriones. Los embriones de estos cruces se sometieron, bajo idénticas condiciones, a una hibridación *in situ* con la sonda del gen *septin 4*, y la reacción de color utilizada para detectar la expresión se detuvo simultáneamente en todos los genotipos. El resultado de la hibridación nos permitió determinar que la línea que expresaba *Septin 4* con mayor intensidad era UAS-Sep4 (28.3) (Fig. R.8). De manera que esta línea fue seleccionada para los posteriores análisis de sobreexpresión realizados en este trabajo.



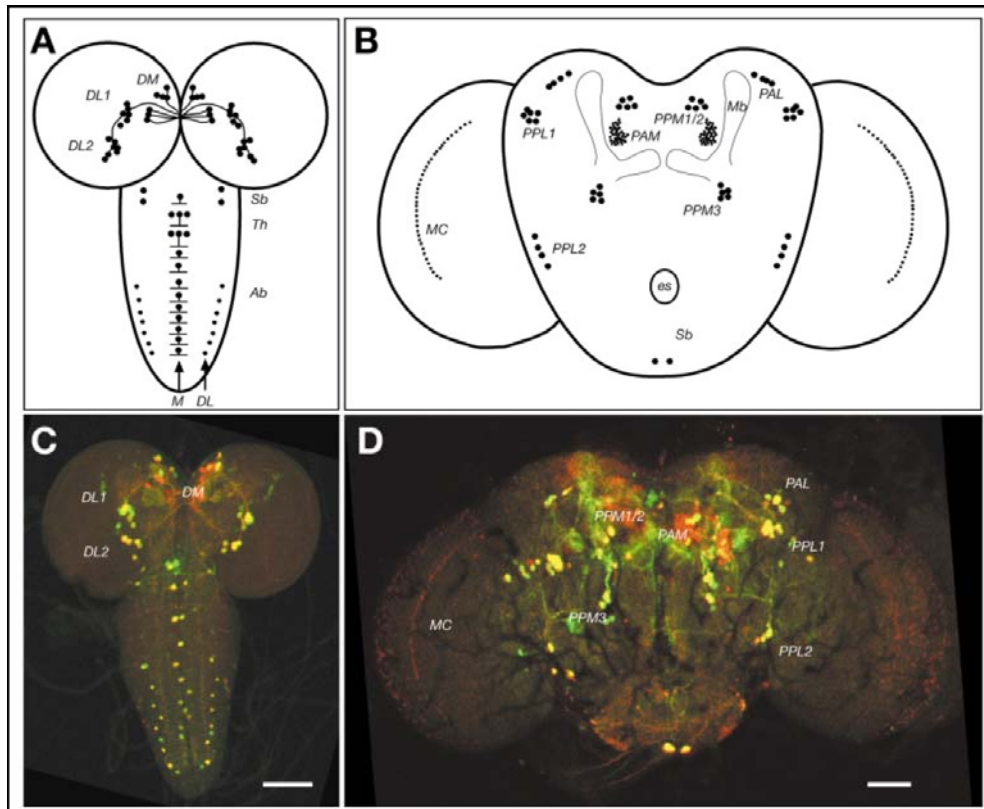
**Figura R.8. Expresión del gen *septin 4* con el patrón de la línea *en*-GAL4 utilizando diferentes líneas UAS-Sep4.** Los embriones están orientados de manera que en la figura se puede apreciar la parte dorsal de éstos. La parte anterior de los embriones se encuentra a la izquierda en todos los casos.

### 3.2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SEPTIN 4 EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

En *Drosophila*, las neuronas DA se organizan en varios grupos o *clusters*. Estas neuronas se encuentran tanto en el cerebro larvario como en el adulto (Fig. R.9). El



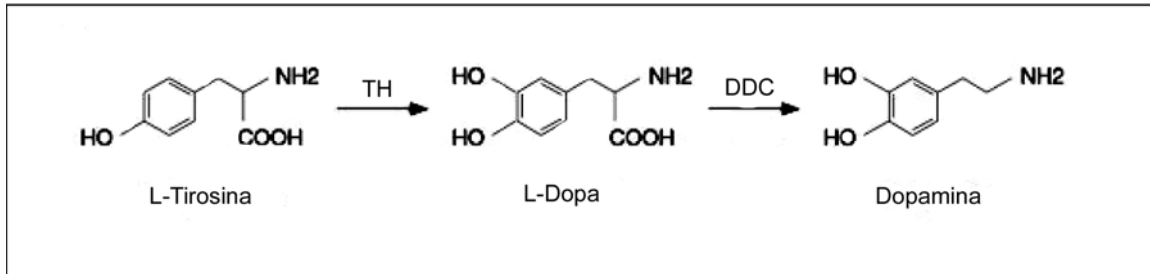
número de neuronas de cada *cluster*, así como su distribución en el cerebro, se ha caracterizado muy bien en estudios anteriores (Budnik y White, 1988; Lundell y Hirsh, 1994), lo cual permite detectar fácilmente una posible alteración en el número de estas neuronas.



**Figura R.9. Distribución de las neuronas DA en el cerebro larvario y adulto de *Drosophila*.** De Friggi-Grelin y col. (2003). Representación esquemática de los diferentes grupos de neuronas en el cerebro larvario, A, y en el adulto, B. En C y D, cerebros de individuos que expresan la proteína GFP bajo el control de la línea *TH-GAL4* teñidos además con el anticuerpo anti-TH. Las neuronas DA aparecen en amarillo por combinación del verde de la proteína GFP y el rojo de la tinción con anti-TH.

Para dirigir la expresión de genes a las neuronas DA se han descrito dos líneas GAL4: la línea *TH-GAL4* (Friggi-Grelin y col., 2003), que contiene el promotor del gen que codifica para el enzima tirosina hidroxilasa, y la línea *Ddc-GAL4* (Li y col., 2000), que contiene el promotor del gen que codifica para el enzima dopamina decarboxilasa. Ambos enzimas funcionan en la ruta de biosíntesis de la dopamina (Fig. R.10) y por esta razón, tanto *TH-GAL4* como *Ddc-GAL4*, son lo bastante específicas como para dirigir la expresión a las neuronas DA (Fig. R.9C y D). Aunque se ha comprobado que la expresión dirigida por la línea *TH-GAL4* no coincide exactamente con el patrón de

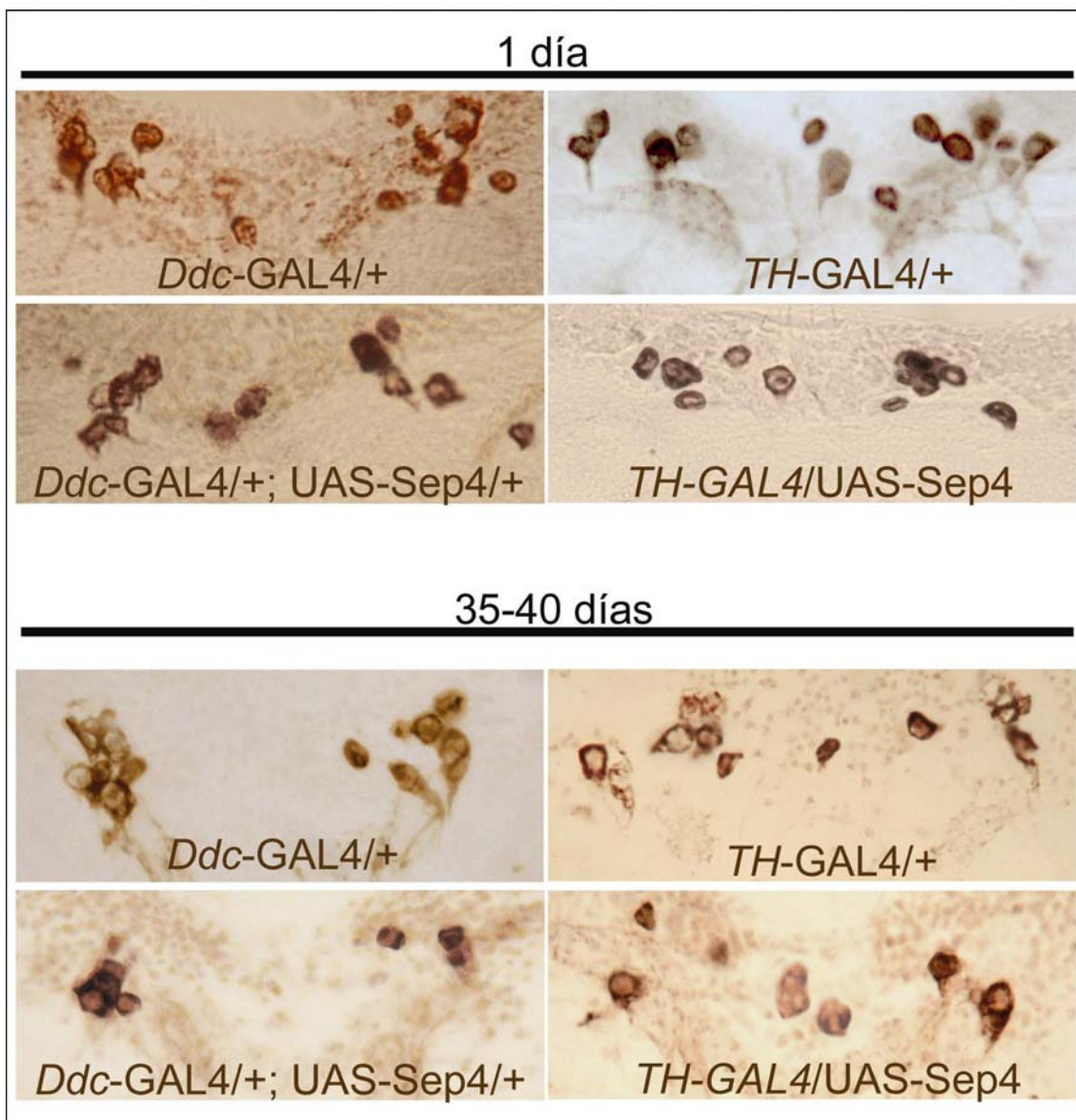
expresión del enzima tirosina hidroxilasa (Whitworth y col., 2005), ésta y la línea *Ddc-GAL4* han sido ampliamente utilizadas en otros estudios de neurodegeneración de las neuronas DA en *Drosophila*.



**Figura R.10. Ruta de biosíntesis de la dopamina.** Esquema de los pasos de la ruta de biosíntesis del neurotransmisor en los que intervienen los enzimas tirosina hidroxilasa y dopamina decarboxilasa.

En este estudio, se han utilizado ambas líneas GAL4 para producir la sobreexpresión del gen *sepin 4* en las neuronas DA. Para ello se cruzaron moscas *TH-GAL4* y *Ddc-GAL4* con individuos *UAS-Sep4(28.3)* y los cruces se desarrollaron a 25°C. Posteriormente se analizaron los descendientes de estos cruces. En la EP, la pérdida de neuronas es progresiva y dependiente de la edad. Un efecto similar ha sido encontrado en varios modelos de la EP en *Drosophila* (Feany y Bender, 2000; Yang y col., 2003). Para determinar si en las moscas *Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+* y *TH-GAL4/UAS-Sep4* ocurre esta degeneración dependiente de la edad, se analizó el número de neuronas DA de estos individuos 1 día y 40 días después de la eclosión. Un análisis similar se realizó en individuos *Ddc-GAL4/+* y *TH-GAL4/+*. Para determinar el número de neuronas DA se realizaron secciones frontales de cerebros de moscas embebidas en parafina y, posteriormente, se tiñeron utilizando el anticuerpo específico de neuronas DA, anti-TH, que reconoce el enzima tirosina hidroxilasa (Fig. R.11). Posteriormente se hizo un recuento de las neuronas DA del *cluster* DM, el cual, tal y como se ha visto en diversos trabajos, parece ser especialmente sensible a la acumulación de proteínas tóxicas (Feany y Bender, 2000; Yang y col., 2003). El recuento de neuronas se realizó al menos en 5 individuos para cada genotipo y edad.





**Figura R.11. Efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en el *cluster* DM de neuronas DA a diferentes edades.** Detección inmunohistoquímica de neuronas DA con el anticuerpo anti-TH en secciones frontales de cerebro adulto. Las neuronas DA que se muestran, corresponden al *cluster* DM tanto de individuos jóvenes como de edad avanzada de los genotipos señalados.

Nuestros resultados muestran que en moscas recién nacidas que sobreexpresan Septin 4, el número de neuronas DA del *cluster* DM es similar al de las moscas control, observándose el mismo resultado para las dos líneas GAL4 testadas (Fig. R.12 y Tabla R.2). Sin embargo, el mismo análisis realizado en moscas envejecidas hasta los 35-40 días de edad a 25°C mostró que el número de neuronas en el *cluster* DM es significativamente menor en aquellas que sobreexpresan Septin 4 que en individuos control (Fig. R.12 y Tablas R.2 y R.3).

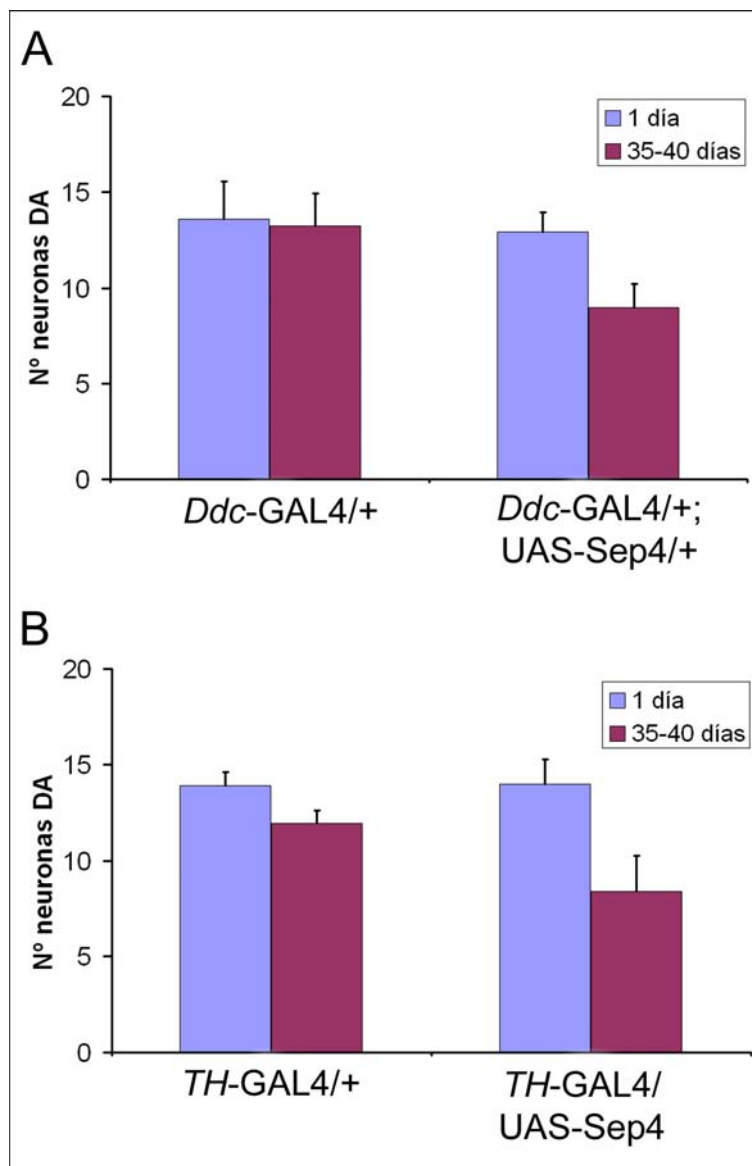
Genotipo	Edad	Nº neuronas DA, <i>cluster</i> DM	n
<i>Ddc</i> -GAL4/+	1 día	13.6 ± 1.9	5
	35-40 días	13.3 ± 1.7	6
<i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS- Sep4/+	1 día	12.9 ± 1.0	8
	35-40 días	9.0 ± 1.3	12
<i>TH</i> -GAL4/+	1 día	13.9 ± 0.7	11
	35-40 días	11.9 ± 0.7	7
<i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4	1 día	14.0 ± 1.3	6
	35-40 días	8.4 ± 1.9	10

**Tabla R.2. Recuentos del número de neuronas DA en el *cluster* DM.** n= número de cerebros analizados para cada genotipo.

Para determinar si la diferencia en el número de neuronas detectadas en moscas que sobreexpresaban Septin 4 con respecto a moscas control era estadísticamente significativa, se aplicó una prueba *t* de Student en todos los casos (Tabla R.3). Los resultados obtenidos indican que, inicialmente, las neuronas DA se forman correctamente en individuos que sobreexpresan Septin 4, ya que en moscas jóvenes el número de neuronas no varía significativamente respecto al de los controles con ninguna de las dos líneas GAL4 analizadas. Sin embargo, la acumulación de Septin 4 en las neuronas DA a lo largo del tiempo produce una reducción del número de dichas neuronas que se detectan en el *cluster* DM.

Genotipos comparados	Edad	<i>p</i> -valor
<i>Ddc</i> -GAL4/+ y <i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4/+	1 día	0.51
<i>Ddc</i> -GAL4/+ y <i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4/+	35-40 días	0.0006
<i>TH</i> /+ y <i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4	1 día	0.9
<i>TH</i> /+ y <i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4	35-40 días	0.00015

**Tabla R.3. Resultado del análisis estadístico de las diferencias en el número de neuronas DA del *cluster* DM.** Los *p*-valor correspondientes a cada comparación se obtuvieron mediante la aplicación de una prueba *t* de Student.

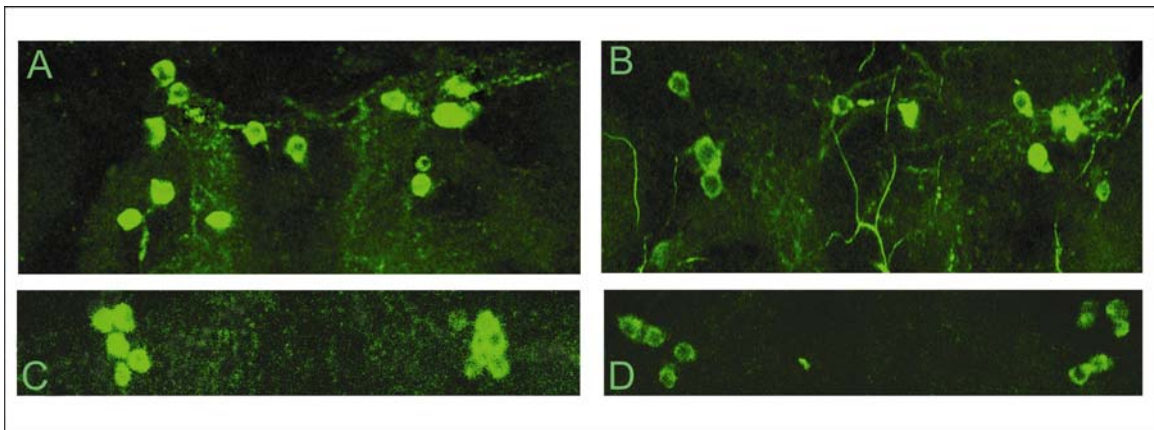


**Figura R.12. Representación gráfica del número de neuronas DA observadas en el *cluster* DM.** Número de neuronas de individuos que sobreexpresan Septin 4 con la línea *Ddc-GAL4* (A) o con la línea *TH-GAL4* (B), respecto a individuos control.

Para confirmar estos resultados utilizamos una técnica más sensible, que consiste en realizar una tinción fluorescente con el anticuerpo anti-TH en cerebros enteros de individuos *Ddc-GAL4/+* y *Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+*, y analizar los resultados mediante microscopía confocal (Fig. R.13). Este análisis confirmó que en moscas envejecidas de 35-40 días, el número de neuronas en el *cluster* DM es menor en individuos que sobreexpresan Septin 4 ( $12.3 \pm 0.7$ ) que en individuos control ( $14.6 \pm 1.8$ ) (Fig. R.13A y B). Esta diferencia es significativa ( $p\text{-valor}=0.014$ ), sin embargo, el número de neuronas que se detectan en individuos que sobreexpresan Septin 4 es

mayor que con el método anterior. Esto sugiere que Septin 4 es tóxica para las neuronas DA del *cluster* DM, de manera que afecta a su integridad pero sin llegar a producir su muerte. Por esta razón, algunas de estas neuronas no son detectables con el método de inclusión en parafina. Resultados similares a los que hemos obtenido se han descrito en otros trabajos realizados con los genes *parkin* y *SNCA* (Auluck y col., 2005; Cha y col., 2005).

La inmunodetección de neuronas DA con fluorescencia nos permitió además realizar el recuento de las neuronas de otros *clusters* más difíciles de analizar con secciones de parafina, como son los *clusters* PPL1 y 2 (*protocerebral posterior lateral 1 y 2*), PPM3 (*protocerebral posterior medium 3*), VUM (*ventral unpaired medium*) y PAL (*protocerebral anterior lateral*) (ver Figs. R.6G y R.9B y D). Sin embargo, el número de neuronas en estos otros *clusters* en moscas que sobreexpresan Septin 4 no mostró ninguna diferencia significativa respecto a los controles (Fig. R. 13C y D y R. 14). Esto sugiere que el *cluster* DM podría ser más sensible a la acumulación de Septin 4 que el resto de *clusters* dopaminérgicos, como se ha visto ya para otras proteínas (Feany y Bender, 2000; Yang y col., 2003). Por otra parte, también pudimos comprobar que esta reducción en el número de neuronas DA ya se detecta a los 20 días, momento en el cual los individuos que sobreexpresan Septin 4 muestran un número de neuronas similar al observado en moscas más viejas ( $12.3 \pm 2.2$ ).



**Figura R.13. Efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en diferentes *clusters* de neuronas DA.** Imágenes de microscopía confocal de neuronas DA en cerebros enteros de individuos *Ddc-GAL4/+* (A y C) y *Ddc-GAL4/UAS-Sep4* (B y D) de 40 días de edad detectadas con un anticuerpo anti-TH. En el *cluster* DM (A y B) puede observarse una reducción del número de neuronas en individuos que sobreexpresan Septin 4. En el *cluster* PPM3 (C y D) no se observa ninguna diferencia en el número de neuronas.

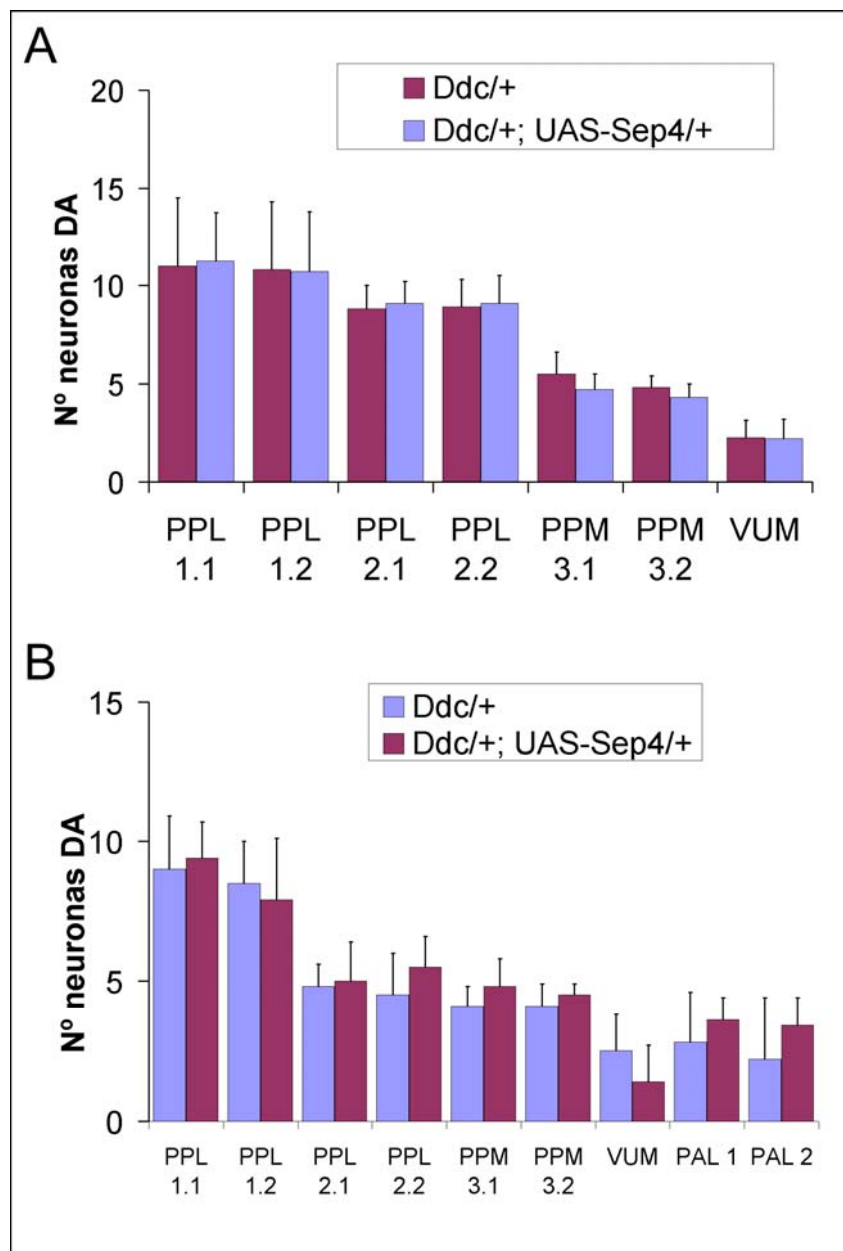


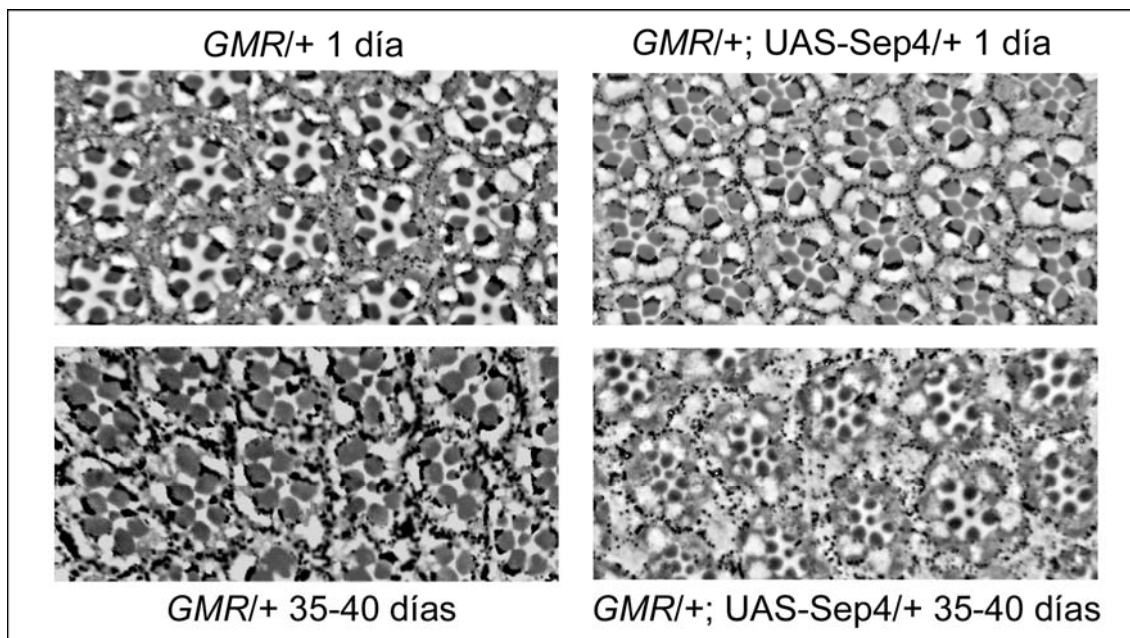
Figura R.14. Representación gráfica del número de neuronas de los *clusters* dopaminérgicos diferentes al DM. (A) individuos de 1 día de edad. (B), individuos de 35-40 días de edad.

### 3.3. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE SEPTIN 4 EN OTRAS NEURONAS

Una de las principales características de la EP es que en esta enfermedad se produce una degeneración específica de las neuronas DA. Con el fin de comprobar si la acumulación de Septin 4 es o no tóxica en otros tipos de neuronas, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en el ojo de *Drosophila* utilizando diferentes líneas GAL4 como son *sev-GAL4*, *ey-GAL4* y *GMR-GAL4*. Si la acumulación de Septin 4 es también tóxica para los fotorreceptores, se producirá la degeneración de este tipo neuronal, lo que permitirá observar un número menor de fotorreceptores por omatidio



en los ojos adultos. En ocasiones las alteraciones internas en el número u organización de los fotorreceptores pueden detectarse externamente porque el ojo adquiere un aspecto rugoso. El análisis externo de la retina de individuos *sev*, *ey* o *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/+* tanto recién nacidos como de 40 días de edad reveló que, únicamente los individuos *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/+* presentaban ojos muy ligeramente rugosos desde la eclosión (Fig. R. 30A). Por esta razón realizamos el análisis microscópico de la retina de estos individuos tal y como se ha descrito en el apartado 8.7 de Materiales y métodos. Este análisis, sin embargo, no mostró ninguna alteración en el número o disposición de los fotorreceptores en individuos *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/+* (Fig. R.15). Este resultado indicaría que la acumulación de Septin 4 no es tóxica para las neuronas fotorreceptoras y sugiere que su toxicidad podría ser específica para las neuronas DA.

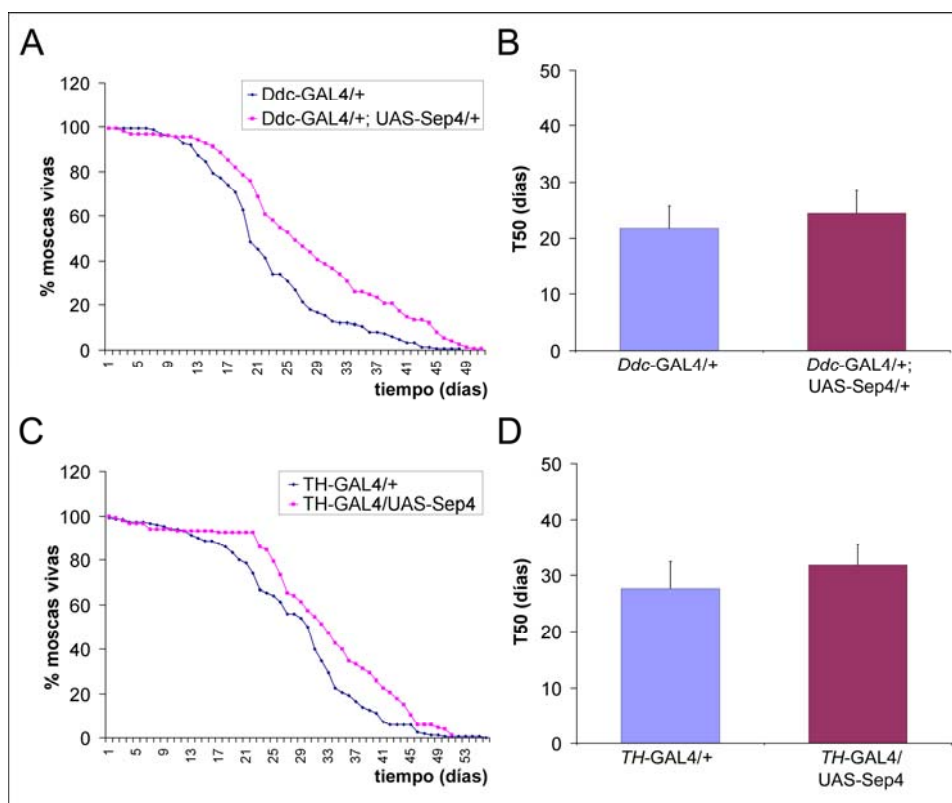


**Figura R.15. La sobreexpresión de Septin 4 no es tóxica para los fotorreceptores.** Secciones tangenciales de retina de individuos adultos a diferentes edades observadas al microscopio óptico con contraste de fases.

### **3.4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE SEPTIN 4 EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS SOBRE LA LONGEVIDAD DE LAS MOSCAS**

En algunos modelos de enfermedades neurodegenerativas desarrollados en *Drosophila* (Lee y col., 2004; Celotto y col., 2006; Gnerer y col., 2006; Sanchez y col., 2006) incluidos algunos de la EP (Yang y col., 2006), se ha visto que la degeneración de neuronas se correlaciona con una reducción en la longevidad de las moscas.

Para analizar si la toxicidad provocada por la sobreexpresión de Septin 4 en neuronas DA pudiera tener un efecto sobre la longevidad de los individuos, realizamos ensayos de longevidad (descritos en el apartado 13 de Materiales y métodos) en individuos *Ddc-GAL4/+*, *Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+*, *TH-GAL4/+* y *TH-GAL4/UAS-Sep4*. El seguimiento en cada uno de los ensayos se realizó hasta que la totalidad de las moscas murieron. Los resultados muestran que las curvas de longevidad son similares entre las moscas problema y los controles (Fig. R.16A y C). El cálculo de la  $T^{50}$ , es decir, la edad a la cual sobreviven el 50% de los individuos iniciales para cada genotipo, reveló que no existen diferencias significativas, según la prueba *t* de Student, entre la longevidad media de los individuos que sobreexpresan Septin 4 en las neuronas DA respecto a sus controles con ninguna de las dos líneas GAL4 analizadas (*p*-valor= 0.36 en el caso de *Ddc-GAL4* y 0.16 en el de *TH-GAL4*) (Fig. R.16B y D). Esto indicaría que la reducción en el número de neuronas DA debida a la toxicidad de Septin 4 no es lo suficientemente crítica como para afectar a la longevidad de los individuos.



**Figura R.16. La longevidad de las moscas no se ve afectada por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA.** (A y C), representación gráfica de los ensayos de longevidad. Las barras de error se han omitido de las gráficas para que se pueda apreciar mejor la tendencia de éstas. (B y D), comparación de la  $T^{50}$  de individuos que sobreexpresan Septin 4 con la de sus controles.

### **3.5. CORRELACIÓN ENTRE LA TOXICIDAD DE SEPTIN 4 EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS Y LA APARICIÓN DE DEFECTOS DE MOVILIDAD**

Una de las características principales de la EP es la aparición con la edad de defectos en la capacidad motora y su progresivo agravamiento (ver Introducción). En algunos modelos de esta enfermedad en *Drosophila* se ha visto que las moscas sufren una pérdida precoz de su habilidad motora (Feany y Bender, 2000), lo cual se demuestra mediante ensayos de escalada.

En este contexto nos propusimos determinar si la toxicidad producida por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA provoca defectos de movilidad. Para ello utilizamos las líneas *TH-GAL4* y *Ddc-GAL4*, para sobreexpresar Septin 4 en las neuronas DA, así como la línea *elav-GAL4* de expresión general en el sistema nervioso. Los individuos que sobreexpresaban Septin 4 con cualquiera de las líneas GAL4 se sometieron, cada dos días aproximadamente, a un test de escalada (descrito en el apartado 11 de Materiales y métodos). En estos tests, la habilidad motora de las moscas se estima analizando la capacidad que tienen para escalar por un vial en un tiempo determinado. Estos tests se realizaron hasta que las moscas tuvieron entre 30 y 35 días de edad. En los resultados obtenidos de este análisis no se puede apreciar una diferencia clara entre moscas que sobreexpresan Septin 4 con cualquiera de las líneas GAL4 analizadas y moscas control (Fig. R.17). Sin embargo, a pesar de que los tests se realizaron siempre en las mismas condiciones, también pudimos comprobar que existía una gran variabilidad dentro de los ensayos realizados a grupos de individuos del mismo genotipo. Además, se observaron grandes altibajos de la capacidad de ascensión en el vial dentro del mismo grupo de individuos durante días sucesivos (Fig. R.17). Según estos resultados, la toxicidad de Septin 4 en neuronas DA no afectaría a la capacidad motora de las moscas. Sin embargo, dada la variabilidad observada, es posible que la utilización de otro tipo de ensayo de comportamiento pudiera complementar los resultados obtenidos y ayudar a determinar con más exactitud si existe alguna correlación entre la pérdida neuronal y alteraciones en la movilidad.



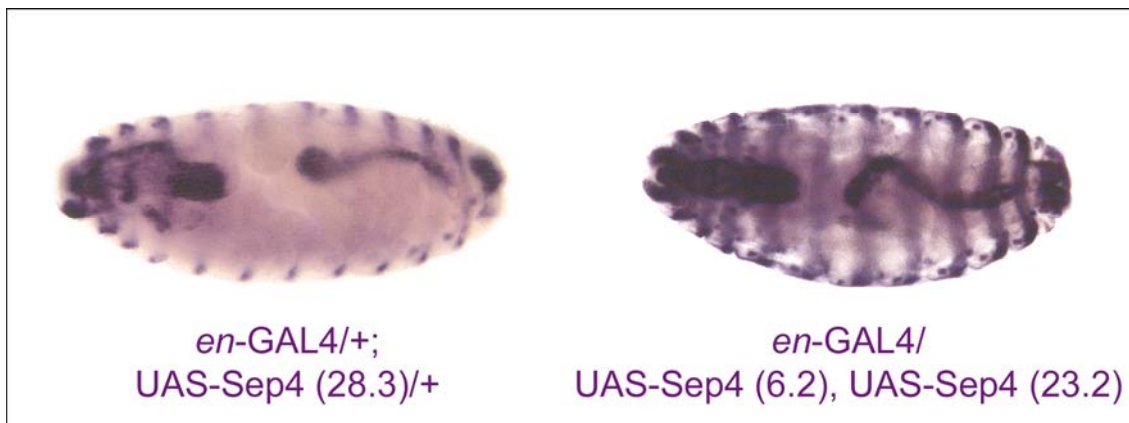


### 3.6. ANÁLISIS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SEPTIN 4 EN OTROS TEJIDOS

#### 3.6.1. Sobreeexpresión de Septin 4 en tejidos no neuronales

Una de las ventajas de *Drosophila* como modelo, así como del sistema UAS/GAL4, es la posibilidad que ofrece de analizar de forma rápida y sencilla posibles interacciones genéticas. Para ello es necesario disponer de un fenotipo fácilmente visible y modificable. Con este objetivo analizamos el efecto de la acumulación ectópica de Septin 4 en tejidos no neuronales, para lo cual se utilizaron líneas GAL4 que dirigían la expresión a tejidos cuyas alteraciones fenotípicas son fácilmente identificables, como por ejemplo el ala y el tórax. Las líneas utilizadas para este análisis fueron *ap*-GAL4, *en*-GAL4, *vg*-GAL4, *nub*-GAL4, *c96*-GAL4, *sd*-GAL4 y *bs*-GAL4. Cada una de estas líneas tiene un patrón de expresión distinto, el cual se encuentra descrito en la Tabla MM.1. Para realizar este análisis, moscas UAS-Sep4 se cruzaron con individuos de las citadas líneas GAL4 y los cruces se desarrollaron a 25°C. Al analizar la descendencia de los cruces, pudimos observar que con ninguna de las líneas GAL4 utilizadas se producía ninguna alteración en el fenotipo que no se encontrara también en los controles obtenidos al cruzar las mismas líneas GAL4 con la cepa *w*.

Vistos estos resultados, pasamos a determinar si una sobreexpresión más fuerte de Septin 4 podría ser tóxica en estos tejidos, y para ello seguimos dos estrategias. En primer lugar, como se ha comentado en el apartado 3.1 de Resultados, una de las características del sistema UAS/GAL4 es su sensibilidad a la temperatura, de manera que un incremento de ésta puede aumentar los niveles de expresión del gen y variar los resultados obtenidos. De esta manera repetimos el análisis pero esta vez desarrollando los cruces a 29°C. Sin embargo, se obtuvo el mismo resultado que a 25°C con todas las líneas GAL4 utilizadas. En segundo lugar, analizamos el efecto de un incremento en los niveles de expresión de Septin 4 mediante la utilización de dos transgenes UAS-Sep4. Para ello, generamos una línea transgénica con dos copias de la inserción UAS-Sep4 utilizando las líneas UAS-Sep4 (6.2) y UAS-Sep4 (23.2) (ver tabla R.1) y siguiendo el esquema de cruces descrito en la figura MM.13. Para comprobar si esta línea recombinante tenía unos niveles de expresión más elevados que la línea UAS-Sep4 (28.3), seguimos el mismo procedimiento que en el apartado 3.1 de Resultados. Según el resultado obtenido, la línea recombinante con dos copias del transgén, produce una expresión más fuerte del gen que la línea UAS-Sep4 (28.3) (Fig. R.18).



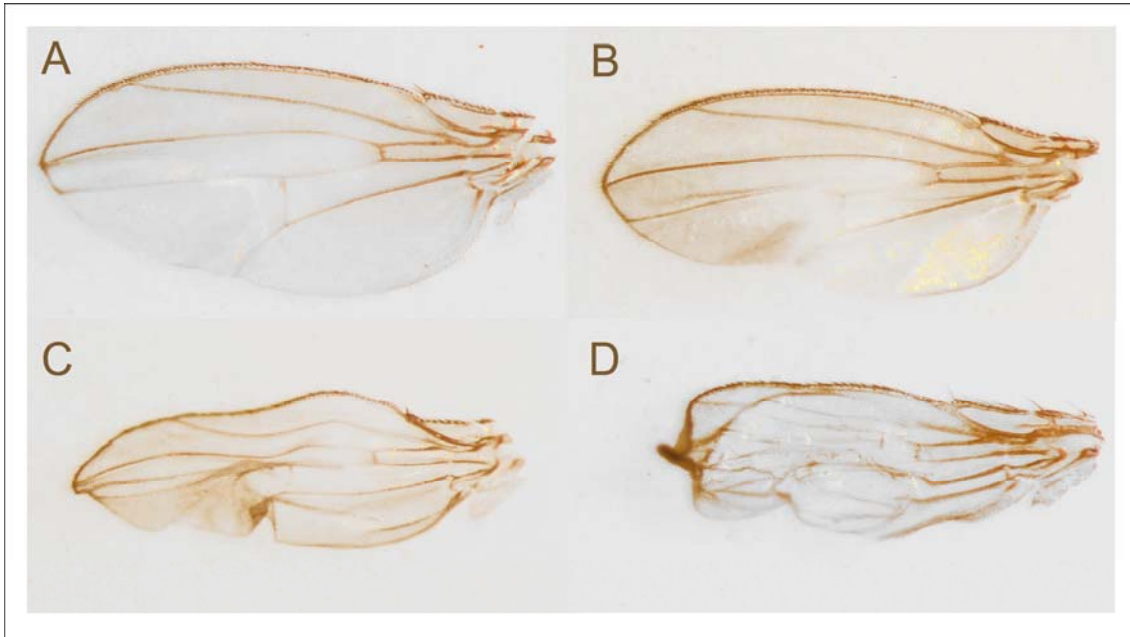
**Figura R.18. Niveles de expresión de *septin 4* con una y dos copias del transgén UAS-Sep4 con la línea *en-GAL4*.** Se muestra la parte dorsal de los embriones, que se encuentran orientados con la parte anterior a la izquierda.

La línea generada con dos copias del transgén UAS-Sep4, se utilizó para expresar Septin 4 con las mismas líneas GAL4 que se habían utilizado para una sola copia. Los cruces se desarrollaron tanto a 25°C como a 29°C. En la descendencia se pudo observar que, a ninguna de las dos temperaturas, los individuos que sobreexpresaban Septin 4 tenían defectos diferentes a los observados en los controles.

### 3.6.2. Análisis de la sobreexpresión general de Septin 4

Una vez comprobado que la sobreexpresión de Septin 4 en ala y tórax no tenía ningún efecto fenotípico apreciable, analizamos el efecto que podría tener una sobreexpresión generalizada utilizando líneas GAL4 de expresión ubicua como *arm-GAL4*, *act-GAL4* y *da-GAL4*. Aunque estas tres líneas comparten un patrón de expresión ubicuo, la intensidad de la expresión producida por cada línea puede variar, como se ha visto en otros casos (Chavous y col., 2001). Quizás por esta razón, el resultado de la sobreexpresión de Septin 4 fue diferente para cada caso. La sobreexpresión tanto de una copia como de dos copias del transgén con *arm-GAL4*, a 25°C y a 29°C, no produjo ningún efecto apreciable. Sin embargo, la sobreexpresión de Septin 4 con las líneas *act-GAL4* y *da-GAL4* sí que tuvo efectos fenotípicos visibles. Curiosamente, y a pesar de no haber obtenido ningún resultado con las líneas GAL4 específicas de ala, la sobreexpresión de Septin 4 con dos copias del transgén UAS-Sep4 y con la línea *da-GAL4* dio como resultado la aparición de claros defectos fenotípicos en las alas. Este fenotipo resultó ser bastante variable, oscilando entre alas ligeramente onduladas y alas fuertemente arrugadas o con ampollamientos debidos a la incorrecta fusión entre las dos láminas que las forman (Fig. R.19). Mediante un recuento detallado a partir de varios cruces independientes determinamos que

aproximadamente el 3% de los individuos que sobreexpresan Septin 4 presentaba defectos severos en las alas. Estos defectos se observaron tanto a 25°C como a 29°C, sin embargo, el porcentaje de individuos que presentaban estos defectos no aumentó con la temperatura.



**Figura R.19. Fenotipos de ala causados por la sobreexpresión ubicua de Septin 4.** (A), *da-GAL4/+*. (B-D), *da-GAL4/UAS-Sep4*. Los fenotipos varían entre alas ligeramente onduladas, (B), hasta alas con pliegues, (C), o ampollamientos, (D).

La sobreexpresión de Septin 4 con la línea *act-GAL4* también produjo defectos en las alas, aunque más ligeros que los observados con *da-GAL4*. Además, la sobreexpresión con esta línea dio como resultado un fenotipo de letalidad parcial sensible a la temperatura que no se observa con la línea *da-GAL4* (Fig. R.20). La estimación de la letalidad se realizó mediante comparación del número de moscas *act-GAL4/UAS-Sep4(x2)* obtenidas con el número esperado de individuos de este genotipo, según el número total de moscas nacidas del cruce. Esta estimación se realizó para diversos cruces independientes y posteriormente se calculó la media de estas estimaciones. Como puede observarse en el gráfico de la figura R.20, aproximadamente el 48% de las moscas morían antes de eclosionar de la pupa en los cruces realizados a 25°C. Cuando incrementamos la expresión de Septin 4 mediante el desarrollo de los cruces a 29°C, el porcentaje de letalidad observada en los individuos *act-GAL4/UAS-Sep4(x2)* ascendió significativamente hasta el 85% ( $p$ -valor=0.039).

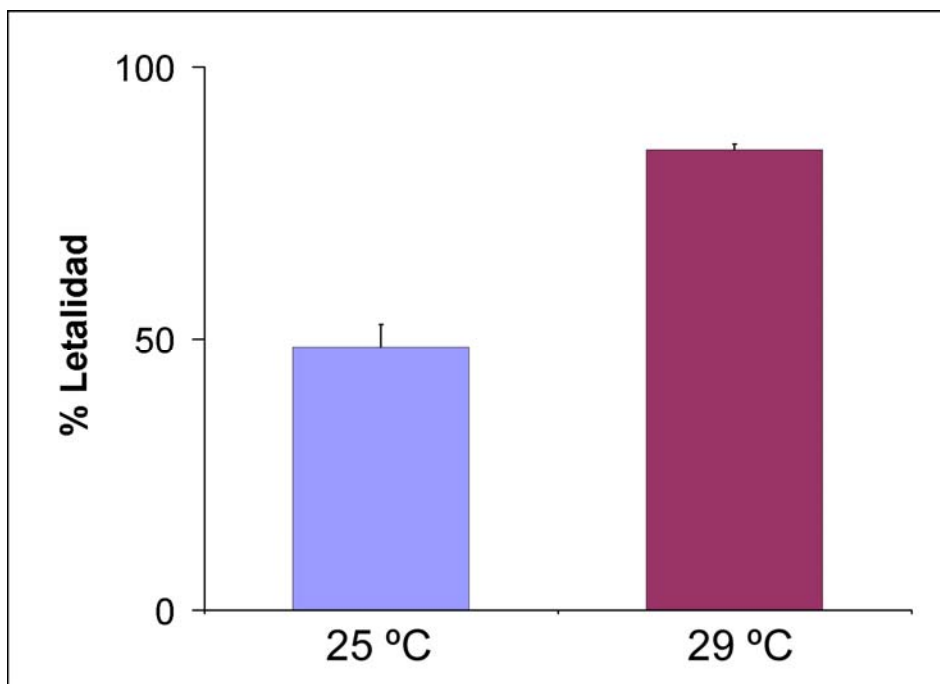


Figura R.20. Influencia de la temperatura sobre la letalidad causada por la sobreexpresión de Septin 4 con la línea *act-GAL4*.

Pudimos observar también que esta letalidad es tardía, ya que la gran mayoría de los individuos que mueren lo hacen en los últimos estadios del desarrollo de la pupa o incluso durante la eclosión. Los individuos que consiguen salir de la pupa no presentan defectos fenotípicos visibles y sólo en un bajo porcentaje de ellos se observan ondulaciones o pliegues en las alas.

### 3.7. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SEPTIN 5 EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE *Drosophila*

Algunos de los modelos de la EP desarrollados en *Drosophila* han sido generados por la sobreexpresión en la mosca de un gen humano cuya ganancia de función pudiera estar asociada a la enfermedad (Feany y Bender, 2000; Yang y col., 2003). Por esta razón pensamos que podría ser interesante analizar si la sobreexpresión de SEPT5 podía tener el mismo efecto en las neuronas DA que la sobreexpresión de Septin 4. Para ello seguimos los mismos pasos que los descritos anteriormente para Septin 4 pero utilizando su homólogo humano.

#### 3.7.1. Generación de líneas transgénicas UAS-SEPT5

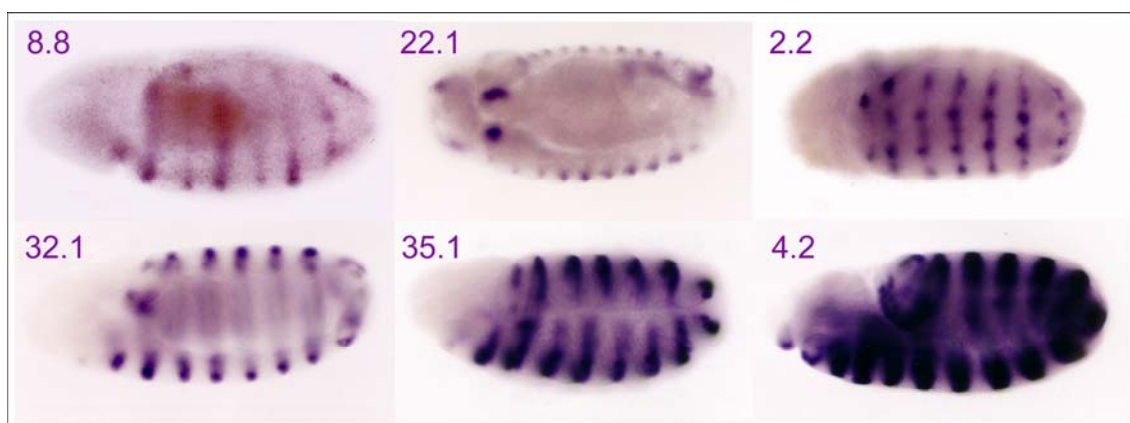
Para la generación de estas líneas se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.1 para Septin 4. De esta forma se consiguieron 8 líneas transformantes

independientes capaces de expresar el gen humano en presencia del factor GAL4. Estas líneas se encuentran detalladas en la Tabla R.4.

Línea	Cromosoma
UAS-SEPT5 (2.2)	3
UAS-SEPT5 (4.1)	3
UAS-SEPT5 (4.2)	3
UAS-SEPT5 (8.8)	3
UAS-SEPT5 (22.1)	3
UAS-SEPT5 (22.2)	2
UAS-SEPT5 (32.1)	3
UAS-SEPT5 (35.1)	1

**Tabla R.4. Localización de la inserción en diferentes líneas UAS-SEPT5.**

Para determinar qué línea transgénica provoca la expresión de SEPT5 con mayor intensidad se realizó una hibridación *in situ* de embriones que provenían de los cruces entre las líneas UAS-SEPT5 y la línea *en-GAL4* (Fig. R.21). Según este experimento, la línea que provoca la expresión más intensa es UAS-SEPT5 (4.2), de manera que fue seleccionada para posteriores análisis.



**Figura R.21. Expresión del gen SEPT5 con el patrón de la línea *en-GAL4* utilizando diferentes líneas UAS-SEPT5.** Los números corresponden al nombre de las diferentes líneas UAS-SEPT5 generadas. Las líneas UAS-SEPT5 (4.1) y (22.2) también presentaban una expresión más floja que la (4.2). Los embriones están orientados lateralmente, excepto 22.1 y 2.2, que muestran la parte dorsal. La parte anterior de los embriones se encuentra a la izquierda en todos los casos.

3.7.2. Análisis de la sobreexpresión de septin 5 en neuronas dopaminérgicas

Para analizar el efecto de una acumulación de la proteína humana en las neuronas DA de *Drosophila*, sobreexpresamos SEPT5 en dichas neuronas cruzando la línea UAS-SEPT5 (4.2) con las líneas *Ddc*-GAL4 y *TH*-GAL4. Los individuos *Ddc*-GAL4/+; UAS-SEPT5/+ y *TH*-GAL4/UAS-SEPT5 se embebieron en parafina y sus cerebros fueron seccionados para la posterior detección de las neuronas DA mediante tinción con el anticuerpo anti-TH. Estos experimentos se realizaron tanto en individuos de 1 como de 35-40 días de edad. El recuento de neuronas DA del *cluster* DM mostró que también la sobreexpresión de SEPT5 resulta tóxica para estas neuronas, ya que produce una reducción significativa (según la prueba *t* de Student) del número de neuronas de este *cluster* en moscas de edad avanzada comparado con los controles *Ddc*-GAL4/+ y *TH*-GAL4/+ de la misma edad (Tablas R.5 y R.6 y Fig. R.22). Estos resultados muestran que Septin 4 y SEPT5 tienen efectos similares al ser sobreexpresadas en las neuronas DA de *Drosophila* y apoyan la hipótesis de su homología funcional.

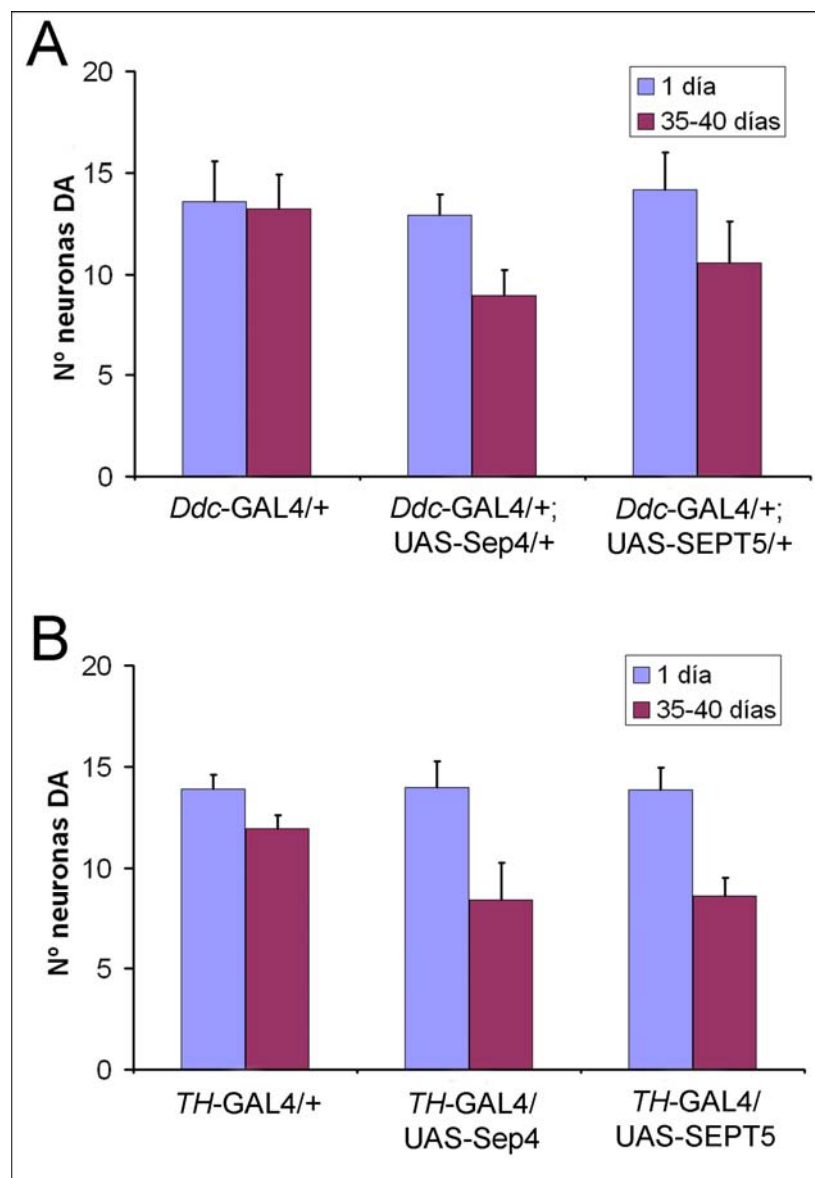
Genotipo	Edad	Nº neuronas DA, <i>cluster</i> DM	n
<i>Ddc</i> -GAL4/+	1 día	13.6 ± 1.9	5
	35-40 días	13.3 ± 1.7	6
<i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-SEPT5/+	1 día	14.2 + 1.8	5
	35-40 días	10.6 + 2	7
<i>TH</i> -GAL4/+	1 día	13.9 ± 0.7	11
	35-40 días	11.9 ± 0.7	7
<i>TH</i> -GAL4/ UAS-SEPT5	1 día	13.9 + 1.1	5
	35-40 días	8.6 + 0.9	6

**Tabla R.5. Recuento de neuronas del *cluster* DM en moscas que sobreexpresan SEPT5.** n= número de cerebros analizados para cada genotipo.

Genotipos comparados	Edad	<i>p</i> -valor
<i>Ddc</i> -GAL4/+ y <i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-SEPT5/+	1 día	0.63
	35-40 días	0.025
<i>TH</i> + y <i>TH</i> -GAL4/ UAS-SEPT5	1 día	0.95
	35-40 días	0.00004

**Tabla R.6. Resultado del análisis estadístico de las diferencias en el número de neuronas DA del *cluster* DM al sobreexpresar SEPT5.** Los *p*-valor de las comparaciones de esta tabla se obtuvieron mediante la aplicación de una prueba *t* de Student.





**Figura R.22. Representación del número de neuronas del *cluster* DM.** Comparación del resultado obtenido al sobreexpresar SEPT5 con los respectivos controles y con la sobreexpresión de Septin 4. (A), sobreexpresión con *Ddc-GAL4*, (B), sobreexpresión con *TH-GAL4*.

#### **4. EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE PARKIN SOBRE LA TOXICIDAD DE SEPTIN 4**

Teniendo en cuenta la homología de secuencia existente entre Septin 4 de *Drosophila* y SEPT5 humana, así como la coincidencia en los patrones de expresión de los genes que las codifican, podríamos suponer que Septin 4 es también un sustrato de Parkin en *Drosophila*. Entonces una alteración en los niveles de Parkin podría afectar a los niveles de Septin 4 en la célula y, en consecuencia, a la toxicidad



provocada por la acumulación de esta proteína en las neuronas DA. Para comprobar esta hipótesis analizamos el efecto de la coexpresión de Parkin junto con Septin 4 en las neuronas DA. También analizamos el efecto de una reducción de los niveles de Parkin, tanto en neuronas DA como en ojo y en ala, mediante la técnica de la interferencia del ARN y utilizando mutantes de *parkin*.

### 4.1. ANÁLISIS DEL AUMENTO EN LOS NIVELES DE PARKIN SOBRE LA TOXICIDAD DE SEPTIN 4

#### 4.1.1. Generación de líneas transgénicas UAS-Park

Se generaron varias líneas transgénicas UAS-Park independientes siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 10.1 de Materiales y métodos. Las inserciones de estas líneas se localizaron y equilibraron adecuadamente (Tabla R.7), descartando aquellas líneas que podrían contener más de una inserción.

Línea	Cromosoma
UAS-Park (21.1)	3
UAS-Park (21.3)	3
UAS-Park (21.5)	3
UAS-Park (24.5)	3
UAS-Park (30.1)	2

**Tabla R.7. Localización de las inserciones de las diferentes líneas UAS-Park generadas.**

Posteriormente determinamos, tal y como se ha descrito en el apartado 3.1 de Resultados, cual de las líneas generadas provocaba una expresión más intensa de Parkin. La línea UAS-Park (30.1) era la que expresaba Parkin con mayor intensidad.

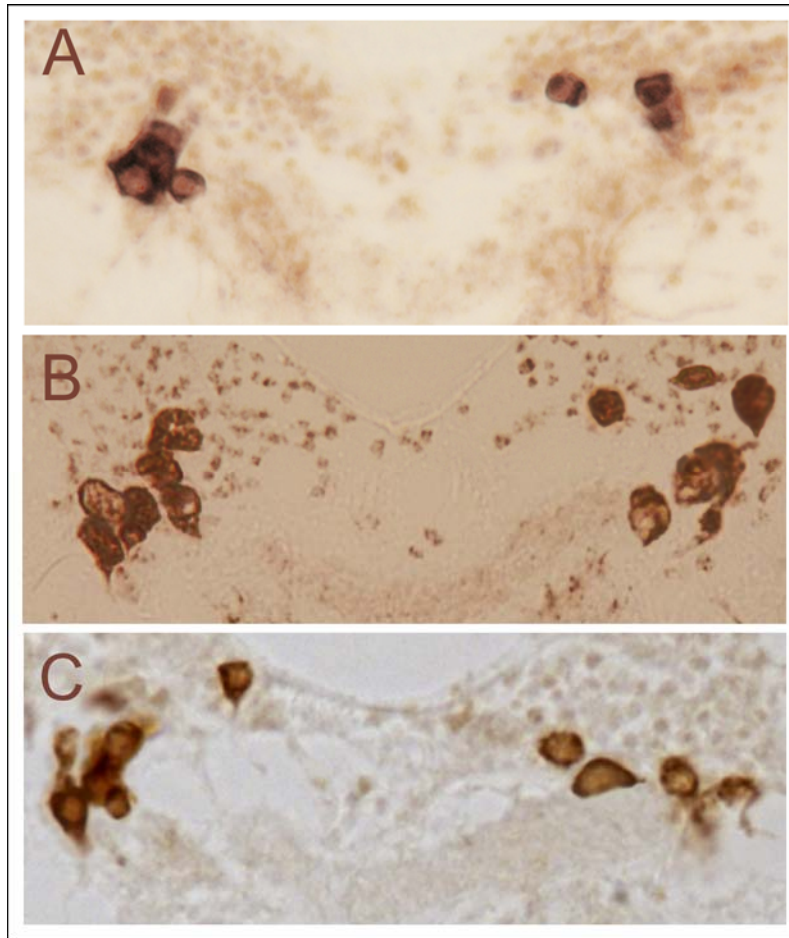
#### 4.1.2. Generación de una línea recombinante UAS-Sep4, UAS-Park

Para facilitar la expresión simultánea de los transgenes UAS-Sep4 y UAS-Park, generamos una línea recombinante que contuviera las dos inserciones. Concretamente se utilizaron las líneas UAS-Sep4 (28.3), por ser la que expresaba Septin 4 con mayor intensidad (y por haberse utilizado para los otros experimentos), y UAS-Park (21.1) cuya inserción se encuentra también en el cromosoma 3 (ver tablas R.1 y R.7). La generación del recombinante UAS-Sep4, UAS-Park se realizó tal como se ha descrito en el apartado 10.2.1 de Materiales y métodos.

#### 4.1.3. Efecto de la coexpresión de Septin 4 y Parkin en las neuronas dopaminérgicas

Para llevar a cabo la sobreexpresión simultánea de ambos transgenes en neuronas DA, se utilizaron de nuevo las líneas *Ddc*-GAL4 y *TH*-GAL4. Estas líneas se cruzaron con el recombinante UAS-Sep4, UAS-Park en las mismas condiciones de temperatura utilizadas para sobreexpresar sólo Septin 4 (25°C). Individuos *Ddc*-GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-Park/+ y *TH*-GAL4/ UAS-Sep4, UAS-Park de 1 y 35-40 días de edad se incluyeron en parafina. Una vez incluidos, se realizaron secciones de cerebro que, posteriormente, se tiñeron con anti-TH para determinar el número de neuronas DA en el *cluster* DM (Fig. R.23). Los resultados de los recuentos de este análisis se resumen en la tabla R.8, y muestran que un aumento de los niveles de Parkin provocados por su sobreexpresión reducen la toxicidad producida por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA (Fig. R.23B). Esta reducción es significativa para las dos líneas GAL4 utilizadas (ver Tabla R.9). Este resultado sugiere que el incremento de los niveles de Parkin es capaz de reducir el efecto tóxico de la acumulación de Septin 4 en las neuronas DA, promoviendo su degradación en estas neuronas. La supresión de la toxicidad producida por la sobreexpresión de proteínas en las neuronas DA se ha visto también en otros modelos de la EP en *Drosophila* (Auluck y col., 2002; Yang y col., 2003). Este fenómeno también se ha podido observar en un modelo de células DA en las que la toxicidad de SEPT5 se ve atenuada por la coexpresión de PARKIN (Son y col., 2005).

A continuación, analizamos si esta supresión del fenotipo de toxicidad neuronal se debía específicamente a la sobreexpresión de Parkin o, por el contrario, se debía a una reducción en la expresión de Septin 4 por una posible competencia por el factor GAL4 debido a la introducción de una segunda construcción UAS. Con este objetivo, coexpresamos la proteína GFP junto con Septin 4 en las neuronas DA utilizando las líneas *Ddc*-GAL4 y *TH*-GAL4. Para la coexpresión de Septin 4 y GFP con la línea *TH*-GAL4 generamos un recombinante *TH*-GAL4, UAS-Sep4 siguiendo el esquema descrito en la figura MM.13. Individuos *Ddc*-GAL4/UAS-GFP; UAS-Sep4/+ y *TH*-GAL4, UAS-Sep4/UAS-GFP de 35-40 días de edad se incluyeron en parafina. Posteriormente las secciones de cerebro se tiñeron con anti-TH para determinar el número de neuronas DA en el *cluster* DM (Fig. R.23C). El recuento de estas neuronas mostró que la sobreexpresión de la proteína GFP no modifica significativamente la toxicidad producida por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA con ninguna de las dos líneas GAL4 (Tablas R.8 y R.9 y Fig. R.24) y, por tanto, la reducción de la toxicidad observada al coexpresar Parkin y Septin 4 se debe específicamente al incremento de los niveles de Parkin.



**Figura R.23. Neuronas DA del *cluster* DM.** Tinción anti-TH en individuos *Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+*, (A), *Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-Park/+*, (B) y *Ddc-GAL4/UAS-GFP; UAS-Sep4/+* (C) de 35-40 días de edad.

Genotipo	Edad	Nº neuronas DA	n
<i>Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+</i>	1 día	12.9 ± 1.0	8
	35-40 días	9.0 ± 1.3	12
<i>Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-Park</i>	1 día	13.8 ± 2.6	8
	35-40 días	12.4 ± 0.7	5
<i>Ddc-GAL4/UAS-GFP; UAS-Sep4/+</i>	35-40 días	9.2 ± 1.3	11
<i>TH-GAL4/UAS-Sep4</i>	1 día	14.0 ± 1.3	6
	35-40 días	8.4 ± 1.9	10
<i>TH-GAL4/ UAS-Sep4, UAS-Park</i>	1 día	14.6 ± 1.1	7
	35-40 días	11.5 ± 1.8	6
<i>TH-GAL4, UAS-Sep4/UAS-GFP</i>	35-40 días	8.8 ± 1.1	6

**Tabla R.8. Resultado de los recuentos del número de neuronas DA del *cluster* DM al sobreexpresar Parkin o GFP junto a Septin 4.** n= número de cerebros analizados para cada genotipo.

Genotipos comparados	Edad	p-valor
<i>Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+ y Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-Park</i>	1 día	0.43
	35-40 días	0.00001
<i>Ddc-GAL4/+; UAS-Sep4/+ y Ddc-GAL4/UAS-GFP; UAS-Sep4/+</i>	35-40 días	0.68
<i>TH-GAL4/UAS-Sep4 y TH-GAL4/ UAS-Sep4, UAS-Park</i>	1 día	0.42
	35-40 días	0.007
<i>TH-GAL4/UAS-Sep4 y TH-GAL4, UAS-Sep4/UAS-GFP</i>	35-40 días	0.61

Tabla R.9. Resultado del análisis estadístico de las diferencias en el número de neuronas al coexpresar Septin 4 junto con Parkin o GFP. Los *p*-valor de esta tabla se obtuvieron mediante una prueba *t* de Student para cada comparación.

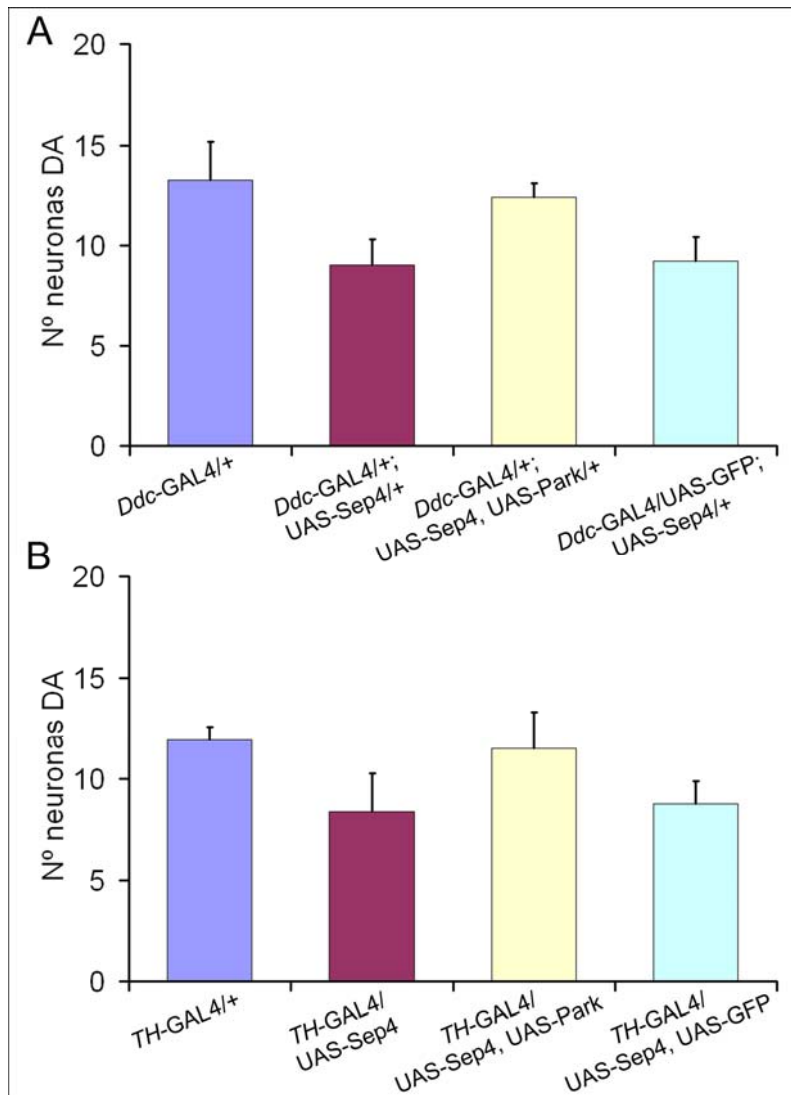


Figura R.24. Representación gráfica del número de neuronas DA del *cluster* DM en individuos de 35-40 días de edad. Puede observarse el efecto de la coexpresión de Septin 4 junto con Parkin o GFP.

#### 4.2. ANÁLISIS DE LA REDUCCIÓN EN LOS NIVELES DE PARKIN SOBRE LA TOXICIDAD DE SEPTIN 4

Para analizar el efecto que produciría una reducción en los niveles de Parkin sobre la toxicidad de Septin 4, se utilizaron dos estrategias. En primer lugar, dado que en el momento de iniciar este estudio no se habían descrito mutantes de *parkin* en *Drosophila*, se optó por utilizar la técnica de la interferencia del ARN (ARNi) para la reducción de los niveles de Parkin (Fire y col., 1998). Para ello obtuvimos moscas transgénicas UAS-iRdParkin (Yang y col., 2003), que producían esta interferencia mediante la expresión de un ARNm de doble cadena del gen *parkin* formando una estructura en horquilla con su secuencia invertida (Fig. R.25). Experimentos previos habían demostrado que la interferencia del ARN de *parkin* con esta línea era capaz de reducir la toxicidad producida por la sobreexpresión del receptor PAEL en neuronas DA (Yang y col., 2003). En segundo lugar, una vez se encontraron disponibles los mutantes del gen *parkin*, obtuvimos el alelo *park*<sup>A21</sup> (Pesah y col., 2004), para llevar a cabo este tipo de análisis. También realizamos algunos de los ensayos con una deficiencia en la que falta la región genómica donde se localiza el gen *parkin*.

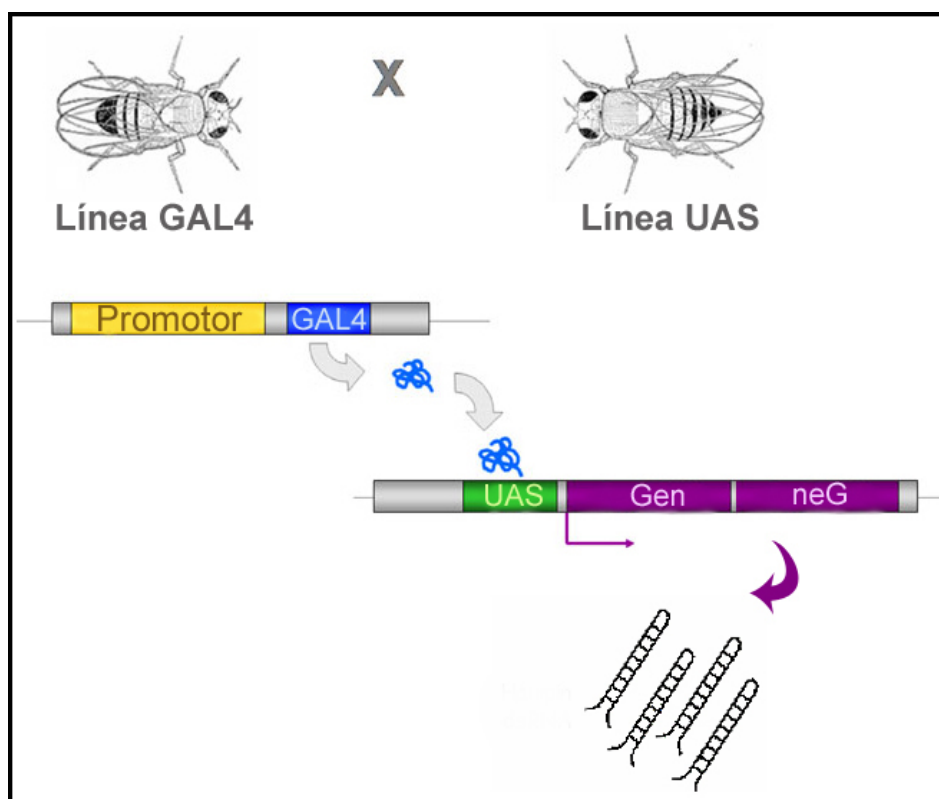


Figura R.25. Esquema de la utilización del sistema UAS/GAL4 para producir la interferencia de un gen.

#### 4.2.1. Generación de recombinantes UAS-Sep4, UAS-iRdPark y TH-GAL4, UAS-iRdPark

Para facilitar la expresión de los transgenes UAS-Sep4 y UAS-iRdPark de forma simultánea, y aprovechando que la inserción UAS-iRdPark también se localizaba en el cromosoma 3, creamos una línea recombinante UAS-Sep4, UAS-iRdParkin. Para ello se utilizó la línea UAS-Sep4 (28.3), y la línea UAS-iRdParkin (Yang y col., 2003), y se siguió el esquema descrito en el apartado 10.2.1 de Materiales y métodos. Por otro lado, dado que la línea TH-GAL4 también se localiza en el cromosoma 3, y a que era necesario utilizar dos copias del transgén UAS-iRdPark para producir la interferencia (ver apartado 4.2.2 de esta sección), generamos recombinantes TH-GAL4, UAS-iRdPark siguiendo el mismo procedimiento.

#### 4.2.2. Efecto de la interferencia del ARN del gen *parkin* sobre la toxicidad de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas

Las líneas *Ddc*-GAL4 y *TH*-GAL4 se utilizaron para producir la sobreexpresión de Septin 4 y la interferencia del ARN de *parkin* simultáneamente en las neuronas DA. La interferencia de *parkin* se realizó con una y con dos copias del transgén UAS-iRdPark para cada línea GAL4. Para obtener individuos con una única copia de UAS-iRdPark moscas de las dos líneas GAL4 se cruzaron con el recombinante UAS-Sep4, UAS-iRdPark. Para obtener individuos con dos copias, se cruzaron individuos recombinantes UAS-Sep4, UAS-iRdPark/TM3 e individuos TH-GAL4, UAS-iRdPark/TM3, en el caso de la línea TH-GAL4. En el caso de *Ddc*-GAL4, individuos *Ddc*-GAL4/CyO; UAS-Sep4, UAS-iRdPark/TM6 se cruzaron con individuos UAS-iRdPark/UAS-iRdPark. Los cruces y el envejecimiento de los descendientes hasta 35-40 días de edad, se realizaron, al igual que en el caso de la sobreexpresión de Septin 4, a 25°C. Las secciones de cerebro de las moscas embebidas en parafina se tiñeron con el anticuerpo anti-TH. El resultado de los recuentos de las neuronas DA del *cluster* DM se muestran en la tabla R.10.

Genotipo	Edad	Nº neuronas DA	n
<i>Ddc</i> -GAL4/+	1 día	13.6 ± 1.9	5
	35-40 días	13.3 ± 1.7	6
<i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-iRdPark/+	1 día	12.9 ± 1.9	8
	35-40 días	9 ± 0.6	5
<i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-iRdPark/UAS-iRdParkin	1 día	13.4 ± 0.9	5
	35-40 días	8.8 ± 1.5	6
<i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4	1 día	14.0 ± 1.3	6
	35-40 días	8.4 ± 1.9	10
<i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4, UAS-iRdPark	1 día	13.8 ± 1.7	6
	35-40 días	9.5 ± 1.3	7
<i>TH</i> -GAL4, UAS-iRdPark/UAS-Sep4, UAS-iRdPark	1 día	14.3 ± 1.0	6
	35-40 días	9.1 ± 0.6	5

Tabla R.10. Resultado del recuento de neuronas DA del *cluster* DM en el análisis del efecto de la interferencia del ARN de *parkin* sobre la toxicidad de Septin 4. n= número de cerebros analizados para cada genotipo.

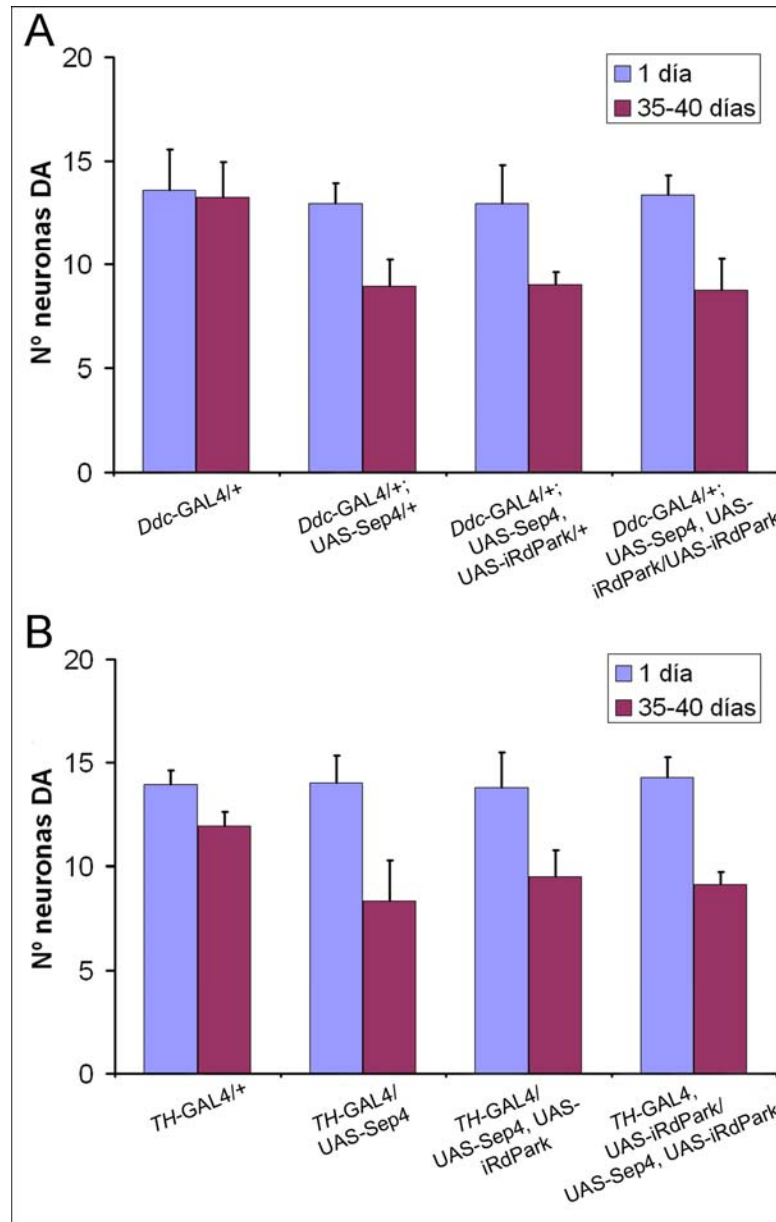
Genotipos comparados	Edad	p-valor
<i>Ddc</i> -GAL4/+ y <i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-iRdPark/+	1 día	1
	35-40 días	0.93
<i>Ddc</i> -GAL4/+ y <i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4, UAS-iRdPark/+ UAS-iRdParkin	1 día	0.48
	35-40 días	0.81
<i>TH</i> /+ y <i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4, UAS-iRdPark	1 día	0.8
	35-40 días	0.17
<i>TH</i> /+ y <i>TH</i> -GAL4, UAS-iRdPark/UAS-Sep4, UAS-iRdPark	1 día	0.7
	35-40 días	0.28

Tabla R.11. Resultado del análisis estadístico de las diferencias en el número de neuronas DA del *cluster* DM. Los p-valor de esta tabla se obtuvieron mediante una prueba t de Student para cada comparación.

Este resultado nos muestra que la interferencia del gen *parkin* en *Drosophila* no aumenta la toxicidad producida por la sobreexpresión de Septin 4, ya que el número de neuronas DA en el *cluster* DM no se ve afectado significativamente (Tabla R.11 y Fig. R.26). Sin embargo, puede que la reducción de la expresión del gen producida por la interferencia no sea muy intensa, y que los niveles de Parkin en las neuronas sean



suficientes para que desempeñe su función con normalidad. Por eso nos planteamos repetir estos experimentos utilizando un mutante de falta de función del gen (ver apartado 4.2.3).



**Figura R.26.** Representación gráfica del efecto de la interferencia del ARN de *parkin* sobre la toxicidad de Septin 4 en las neuronas DA del *cluster* DM. La sobreexpresión de Septin 4 junto con la interferencia de *parkin* tiene un efecto similar con la línea *Ddc-GAL4* (A) y con la *TH-GAL4* (B).



### 4.2.3. Efecto de la mutación del gen *parkin* sobre la toxicidad de Septin 4

La importancia de gen *PARK2* en la EP, ha llevado a realizar numerosos trabajos con el fin conseguir mutantes de este gen en organismos modelo como *Drosophila*, y determinar en que procesos está implicada su proteína (Greene y col., 2003; Pesah y col., 2004; Cha y col., 2005). Los diferentes mutantes generados en *Drosophila* coinciden en muchas de sus características fenotípicas (ver Introducción). El alelo mutante de *parkin* utilizado en este trabajo ha sido *park<sup>Δ21</sup>* (Pesah y col., 2004). Los individuos homocigotos para *park<sup>Δ21</sup>* se caracterizan a nivel externo por una reducción del 30% de la masa corporal y una posición anormal de las alas (Fig. MM.14). Además, no son fértiles y presentan una reducida longevidad. A nivel interno estos mutantes presentan una degeneración progresiva de los músculos indirectos del vuelo entre otras características. Sin embargo, no se observa ningún tipo de degeneración de las neuronas DA del *cluster* DM (Pesah y col., 2004). Dado que la interferencia del ARN del gen *parkin* no produjo ninguna modificación en el fenotipo producido por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA, determinamos si la reducción de los niveles de Parkin mediante el alelo de falta de función *park<sup>Δ21</sup>* podría afectar a este fenotipo.

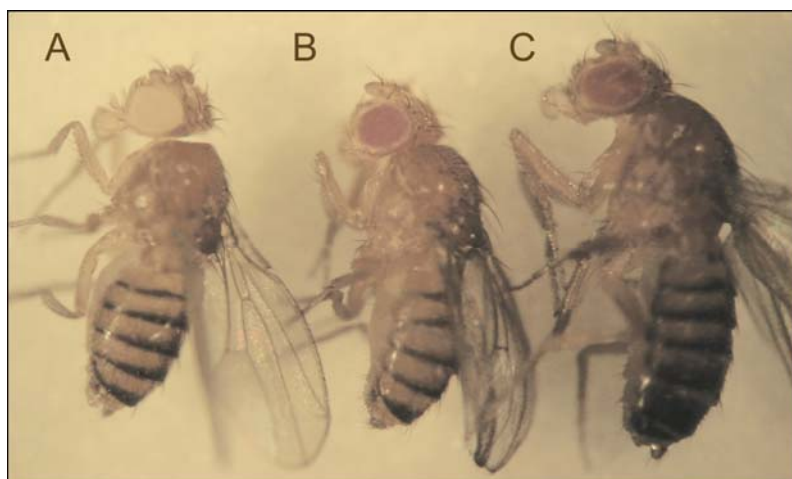
#### 4.2.3.1. Generación de recombinantes UAS-Sep4, *park<sup>Δ21</sup>*

Para sobreexpresar Septin 4 en un fondo heterocigoto mutante *park<sup>Δ21</sup>*, generamos individuos recombinantes UAS-Sep4, *park<sup>Δ21</sup>*. Como ya se ha mencionado estos mutantes tienen unas características fenotípicas externas bastante notables, que se han utilizado para generar los recombinantes tal como se ha descrito en el apartado 10.2.2 de Materiales y métodos. Para seleccionar las líneas recombinantes, se analizó el peso de los individuos procedentes del tercer cruce (ver esquema de la figura MM.15), que supuestamente podrían ser UAS-Sep4, *park<sup>Δ21</sup>/park<sup>Δ21</sup>* o UAS-Sep4/*park<sup>Δ21</sup>*. Se analizaron todas las líneas que al ser cruzadas con individuos *park<sup>Δ21</sup>/TM6*, presentaban descendientes sin equilibrador cuyo tamaño parecía notablemente menor al de moscas salvajes (Tabla R.12). En éstas se determinó el peso medio de los descendientes. También se analizó el peso de los individuos sin equilibrador procedentes del tercer cruce de 20 líneas al azar en las que no se observó esta reducción de tamaño.

Línea	Peso
3	7.5
8	7.4
10	9.0
13	7.7
27	7.3
30	7.4
37	8.2
38	8.5
40	9.2
41	7.2
45	7.0
47	8.1
50	7.7
57	7.0

**Tabla R.12. Peso de individuos de genotipo supuestamente UAS-Sep4,  $park^{\Delta 21}/park^{\Delta 21}$ .** Los pesos se encuentran indicados en mg y corresponden a 5 hembras y 5 machos de cada una de las líneas.

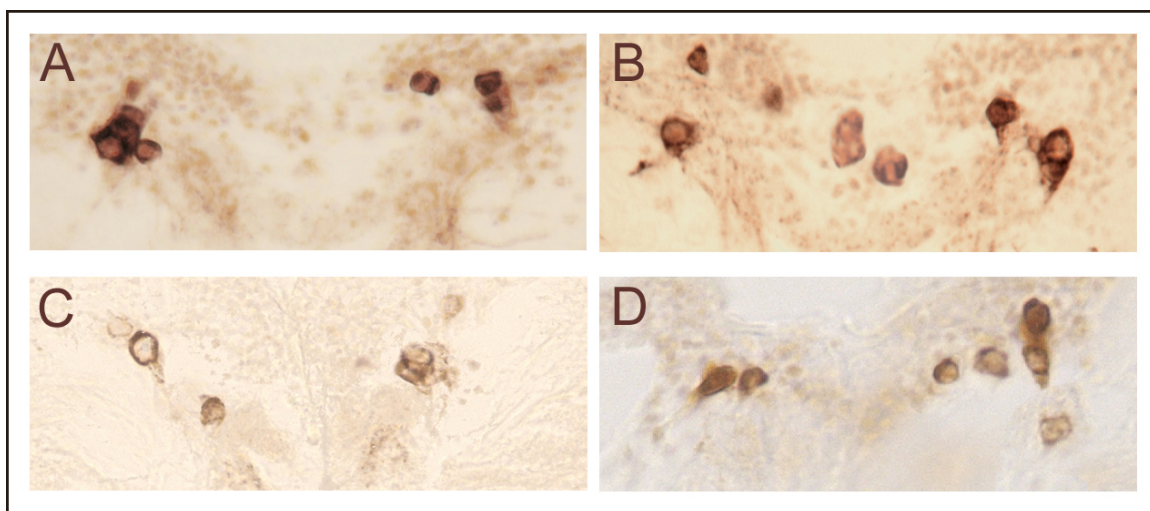
Como control se determinó el peso de 5 hembras y 5 machos mutantes  $park^{\Delta 21}$  que es de  $7.6 \pm 0.17$  mg. Por otro lado, el peso de los individuos UAS-Sep4/ $park^{\Delta 21}$  obtenidos de los cruces en los que no se observó reducción del tamaño corporal es de  $9.57 \pm 0.76$  mg. Visto esto, tomamos como líneas recombinantes aquellas cuyo peso era menor de 8 mg. Los individuos homocigotos procedentes de las líneas recombinantes seleccionadas también presentaban una masa corporal reducida, similar a la de los mutantes (Fig. R.27). Además, en estas líneas, el número de moscas homocigotas que llegan a nacer se reduce radicalmente respecto a los heterocigotos. La línea 3 se seleccionó al azar para posteriores análisis (Tabla R.12).



**Figura R.27. Comparación del tamaño corporal de individuos mutantes  $park^{\Delta 21}$  respecto individuos no mutantes.** (A), mutantes  $park^{\Delta 21}/park^{\Delta 21}$ , (B), individuos recombinantes homocigotos UAS-Sep4,  $park^{\Delta 21}/UAS-Sep4, park^{\Delta 21}$ , (C), individuos homocigotos no recombinantes UAS-Sep4/UAS-Sep4.

### 4.2.3.2. Sobreexpresión de Septin 4 en neuronas dopaminérgicas en un fondo mutante heterocigoto $park^{\Delta 21}$

Dado que los mutantes homocigotos  $park^{\Delta 21}/park^{\Delta 21}$  presentan una longevidad muy reducida (Pesah y col., 2004) resultaba imposible analizar el efecto de esta mutación en homocigosis sobre la toxicidad neuronal observada en individuos de edad avanzada que sobreexpresan Septin 4. Por esta razón, analizó el efecto de la mutación  $park^{\Delta 21}$  en heterocigosis. Para ello se cruzaron las líneas *Ddc-GAL4* y *TH-GAL4* con la línea recombinante *UAS-Sep4*,  $park^{\Delta 21}$ , estos cruces se desarrollaron a 25°C. Individuos *Ddc-GAL4/+*; *UAS-Sep4*,  $park^{\Delta 21}/+$  y *TH-GAL4/UAS-Sep4*,  $park^{\Delta 21}$  de 1 y 35-40 días de edad se embebieron en parafina. Para determinar el número de neuronas DA de estos individuos, se realizaron secciones frontales de cerebro y se sometieron a inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-TH (Fig. R.28).

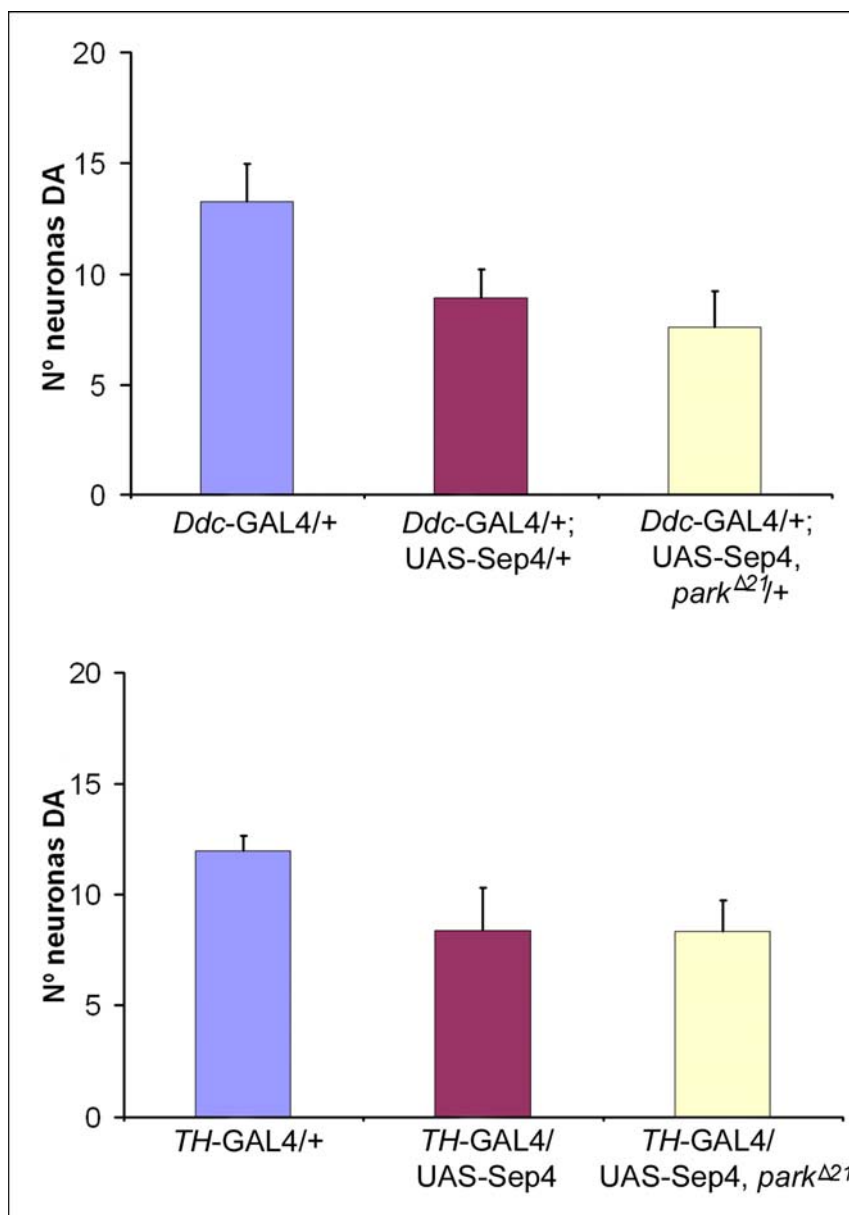


**Figura R.28. Neuronas DA del cluster DM en secciones frontales de cerebro adulto de moscas de 35 a 40 días de edad. (A), *Ddc-GAL4/+*; *UAS-Sep4/+*, (B) *TH-GAL4/UAS-Sep4*, (C) *Ddc-GAL4/+*; *UAS-Sep4*,  $park^{\Delta 21}/+$  y (D), *TH-GAL4/UAS-Sep4*,  $park^{\Delta 21}$ .**

Este análisis nos permitió determinar que, tal y como se ve en la tabla R.13 y en la figura R.29, la mutación de *parkin* en heterocigosis produce una reducción significativa, según la prueba *t* de Student, del número de neuronas DA en el cluster DM cuando sobreexpresamos Septin 4 con la línea *Ddc-GAL4*. Este resultado indica que una reducción en la función del gen *parkin* es capaz de agravar la toxicidad de Septin 4 en las neuronas DA. Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias significativas cuando la sobreexpresión de Septin 4 se produce con la línea *TH-GAL4* (Fig. R.29 y Tabla R.13), a pesar de que la coexpresión de Parkin utilizando esta línea sí fue capaz de reducir la toxicidad producida por Septin 4 en las neuronas DA a un nivel similar al observado con la línea *Ddc-GAL4* (ver apartado 4.1.3 de Resultados).

Genotipo	Edad	Nº de neuronas DA	n	p-valor
<i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4/+	35-40 días	9.0 ± 1.3	12	-
<i>Ddc</i> -GAL4/+; UAS-Sep4, <i>park</i> <sup>Δ21</sup> /+	35-40 días	7.6 ± 1.6	13	0.029
<i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4	35-40 días	8.4 ± 1.9	10	-
<i>TH</i> -GAL4/UAS-Sep4, <i>park</i> <sup>Δ21</sup>	35-40 días	8.3 ± 1.4	13	0.95

Tabla R.13. Número de neuronas DA al sobreexpresar Septin 4 con fondo mutante *park*<sup>Δ21</sup>. En cada caso el *p*-valor indicado corresponde a la comparación con el genotipo de la fila anterior mediante una prueba *t* de Student. n= número de cerebros analizados para cada genotipo.



### Figura R.29. Representación gráfica del número de neuronas DA del *cluster* DM al sobreexpresar Septin 4 en fondo salvaje y en fondo heterocigoto *park*<sup>A21</sup>.

#### 4.2.3.3. Efecto de la mutación del gen *parkin* sobre los fenotipos de ojo y ala

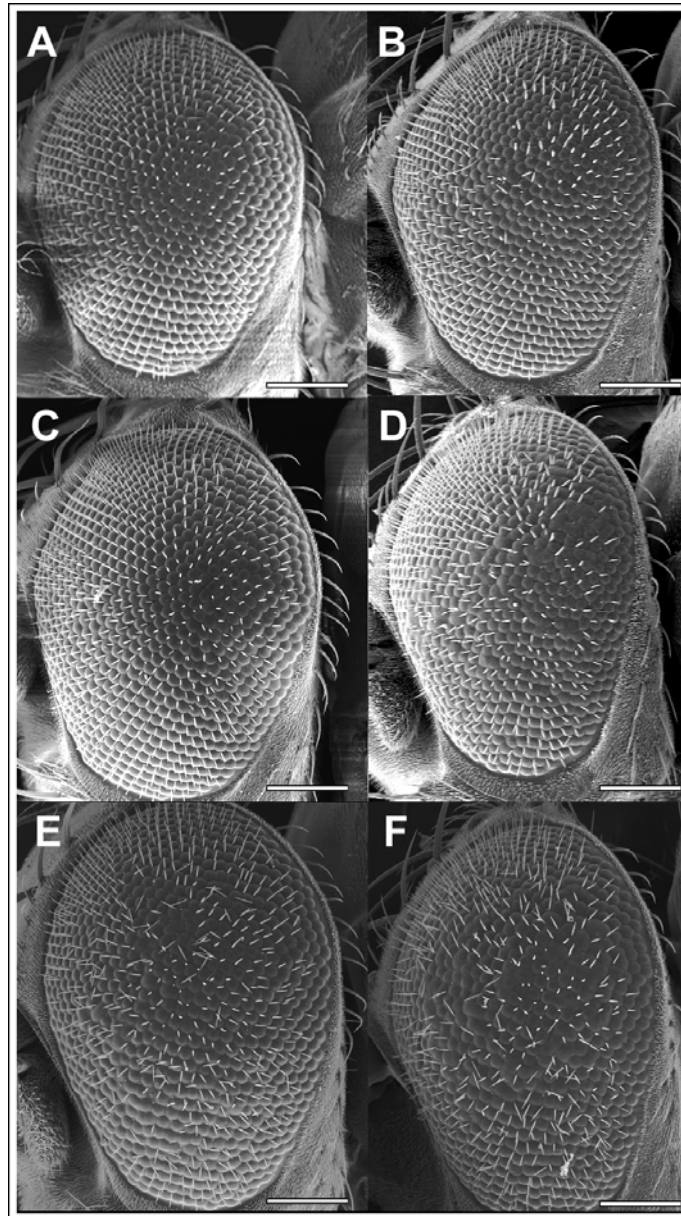
El ojo y el ala de *Drosophila* son dos tejidos que se han utilizado en multitud de ocasiones para el análisis de interacciones entre genes, así como para la realización de rastreos genéticos en este organismo. Esto se debe a que las alteraciones del fenotipo de estos tejidos (por la mutación o sobreexpresión de un gen) son fácilmente identificables y pueden presentar variaciones en cuanto a su intensidad. Por tanto, estos fenotipos pueden modificarse por cambios en la dosis de otros genes relacionados con el causante del fenotipo inicial, agravándolos o suprimiéndolos.

La sobreexpresión de Septin 4 en ojo y en ala causa fenotipos visibles, descritos en los apartados 3.3 y 3.6.2 de Resultados. Si asumimos que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila*, entonces, una reducción en los niveles de Parkin podrían agravar estos fenotipos ya que la acumulación de Septin 4 sería mayor en ese caso. Para comprobar esta hipótesis analizamos el efecto de la sobreexpresión de Septin 4 con las líneas *GMR-GAL4* y *da-GAL4* en un fondo mutante heterocigoto para la mutación *park*<sup>A21</sup> así como para la deficiencia *Df(3L)PcMk*. Dentro de la región cromosómica delecionada en esta deficiencia se localiza el gen *parkin*, por tanto, representa un alelo mutante alternativo de este gen.

#### Efecto en el ojo:

Para ver el efecto en el fenotipo del ojo, comparamos individuos *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/+* con individuos *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4, park*<sup>A21</sup>*/+* o *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/Df(3L)PcMk*. Como puede observarse en la figura R.30D y E, la reducción a la mitad de los niveles de Parkin produjo un claro incremento en la rugosidad del ojo en ambos casos. Estos resultados confirman que una reducción de los niveles de Parkin es capaz de agravar el fenotipo producido por la sobreexpresión de Septin 4 en ojo independientemente del fondo genético de los mutantes utilizados. Además, la sobreexpresión de Septin 4 en un fondo transheterocigoto para los dos alelos de *parkin* (*park*<sup>A21</sup>*/Df(3L)PcMk*) produjo una rugosidad mayor que la observada en los heterocigotos (Fig. R.30F). Esto indicaría que la modificación del fenotipo producido por la sobreexpresión de Septin 4 es dependiente de los niveles de Parkin. Estos resultados respaldarían la interacción que habíamos visto ya a nivel neuronal, y que sugiere la existencia de una relación funcional entre Septin 4 y Parkin.





**Figura R.30. Efecto de la sobreexpresión de Septin 4 con un fondo mutante para el gen *parkin* en ojo.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de individuos (A) *GMR-GAL4/+*, (B) *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/+*, (C) *GMR-GAL4/+; park<sup>Δ21</sup>/+*, (D) *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4, park<sup>Δ21</sup>/+*, (E) *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4/Df(3L)PcMk* y (F) *GMR-GAL4/+; UAS-Sep4, park<sup>Δ21</sup>/Df(3L)PcMk*. La línea blanca indica 100  $\mu$ m.

Efecto en el ala:

Para analizar cual podría ser el efecto de la reducción de dosis de Parkin sobre el fenotipo de ala observado al sobreexpresar Septin 4 con *da-GAL4*, comparamos el fenotipo de individuos *UAS-Sep4*, *UAS-Sep4/+; da-GAL4/+* con el de individuos *UAS-Sep4*, *UAS-Sep4/+; da-GAL4/park<sup>Δ21</sup>* y *UAS-Sep4*, *UAS-Sep4/+; da-*

GAL4/Df(3L)PcMk. Para ello analizamos el porcentaje de individuos de los genotipos mencionados que presentaban un fenotipo de ala severo, con alas arrugadas o ampollamientos (ver Fig. R.19). Mediante este análisis se pudo observar que la reducción de los niveles de Parkin producía un incremento en el porcentaje de individuos UAS-Sep4, UAS-Sep4/+; *da-GAL4/park<sup>Δ21</sup>* con un fenotipo severo de ala que pasa a tener un valor de  $25.5 \pm 6.4$  (Fig. R.31). Utilizando una prueba *t* de Student determinamos que esta diferencia era significativa (*p*-valor=0.033). Los individuos UAS-Sep4, UAS-Sep4/+; *da-GAL4/Df(3L)PcMk* presentaban letalidad parcial, lo cual dificultó en gran medida el análisis de un número de individuos por cruce similar al de los otros dos genotipos. A pesar de ello calculamos que el porcentaje de individuos supervivientes (o *escapers*) con un fenotipo fuerte era del 45.5%. Estos resultados, al igual que los observados en ojo, indican que el efecto tóxico de la acumulación de Septin 4 aumenta al reducir los niveles de Parkin, lo que apoyaría la hipótesis de que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila*.

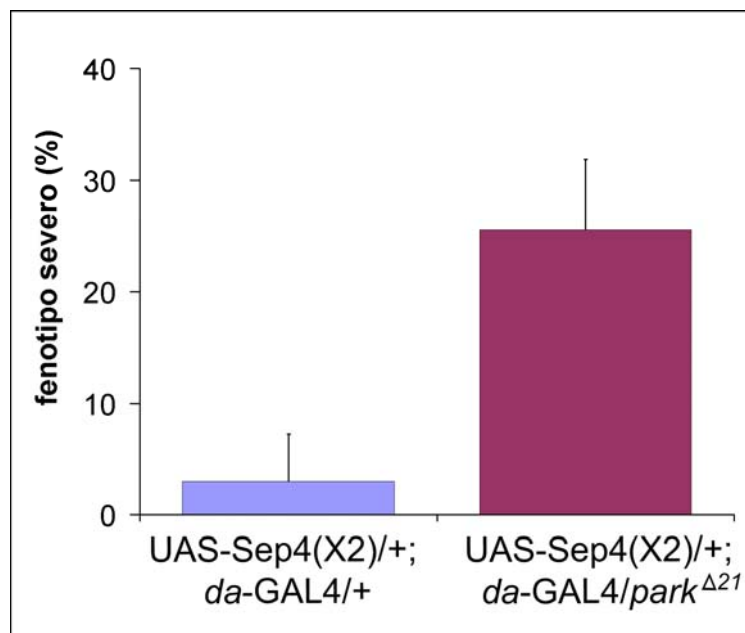


Figura R.31. Incremento del fenotipo de alas arrugadas causado por la sobreexpresión ubicua de Septin 4 en un fondo heterocigoto *park<sup>Δ21</sup>*.

## **5. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE SEPTIN 4 COMO POSIBLE SUSTRATO DE PARKIN**

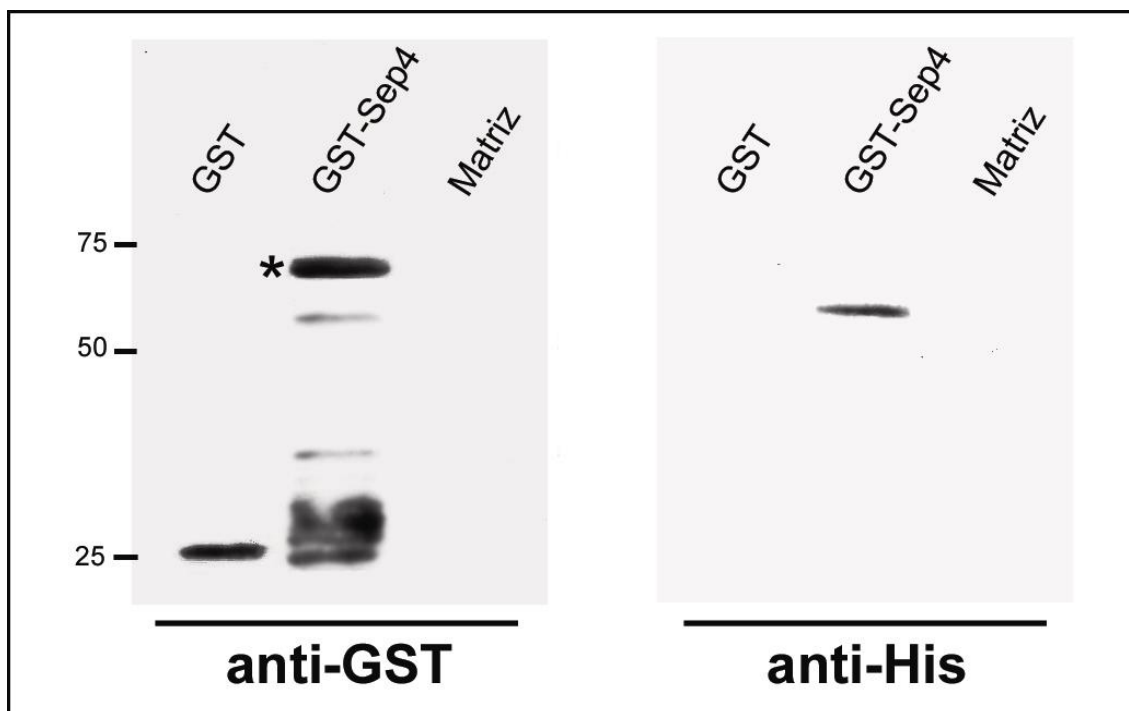
Como se ha comentado anteriormente, Parkin es un enzima que participa en la ruta de degradación por el proteasoma, actuando como una E3 proteína-ubiquitina

ligasa, es decir, transfiriendo moléculas de ubiquitina a ciertas proteínas (sus sustratos) y marcándolas de esta forma para ser degradadas por el proteasoma (ver apartado 2 de Introducción). Los resultados obtenidos con la sobreexpresión de Septin 4, así como los observados al variar los niveles de Parkin, sugieren que, al igual que en humanos, Septin 4 podría ser sustrato de Parkin en *Drosophila*. Si es así, esto supondría que debería haber una interacción física entre ambas proteínas. Además, en mutantes de *parkin* se produciría una acumulación de Septin 4, ya que no sería marcada para su degradación. Para comprobar estos puntos recurrimos a diferentes estrategias.

### **5.1. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN FÍSICA ENTRE SEPTIN 4 Y PARKIN**

Las E3 proteína-ubiquitina ligasas, incluida la proteína Parkin, interaccionan con sus sustratos a través de dominios específicos para marcar dichas proteínas (ver apartado 2 de la Introducción). Esto supone la existencia de una interacción física entre las proteína-ubiquitina ligasas y sus sustratos. Para determinar si existe interacción física entre Septin 4 y Parkin, realizamos un ensayo de coprecipitación *in vitro*. Para ello, fue necesario fusionar las dos proteínas de interés a dos etiquetas diferentes, por lo que generamos y purificamos las proteínas de fusión GST-Sep4 y His-Park (ver apartado 9.1 de Materiales y métodos). Además, también purificamos la proteína GST para que sirviera de control negativo en el ensayo de coprecipitación. Las proteínas purificadas fueron cuantificadas en un gel de acrilamida mediante comparación con concentraciones conocidas de la proteína BSA (Fig. MM.9). El ensayo de coprecipitación *in vitro*, fue realizado con 25 µg de cada proteína (ver apartado 9.2 de Materiales y métodos). En primer lugar se unieron a una matriz de sefarosa las proteínas GST-Sep4 y GST y, posteriormente, cada una de las matrices se incubó con la proteína His-Park. Mediante este análisis pudimos observar que la proteína de fusión His-Park coprecipitaba junto con GST-Sep4. Sin embargo, esta coprecipitación no se producía cuando se hacía el ensayo con la proteína GST sola (Fig. R.32). Por otra parte, se pudo comprobar que la proteína His-Park por sí sola no era capaz de unirse a la matriz (Fig. R.32). Este resultado demuestra que Septin 4 y Parkin son capaces de interaccionar *in vitro*, tal y como ya se había visto para sus ortólogos humanos (Zhang y col., 2000). Además este resultado apoyaría la hipótesis de que Septin 4 es un sustrato de Parkin también en *Drosophila*.





**Figura R.32. Ensayo de coprecipitación *in vitro* de las proteínas Septin 4 y Parkin.** La proteína de fusión His-Park queda retenida en la matriz de glutatión-sefarosa en presencia de GST-Sep4, señalada con un asterisco en la segunda carrera, pero no en su ausencia (tercera carrera) o en presencia de GST sola (primera carrera). A la izquierda se muestran los pesos moleculares en KDa.

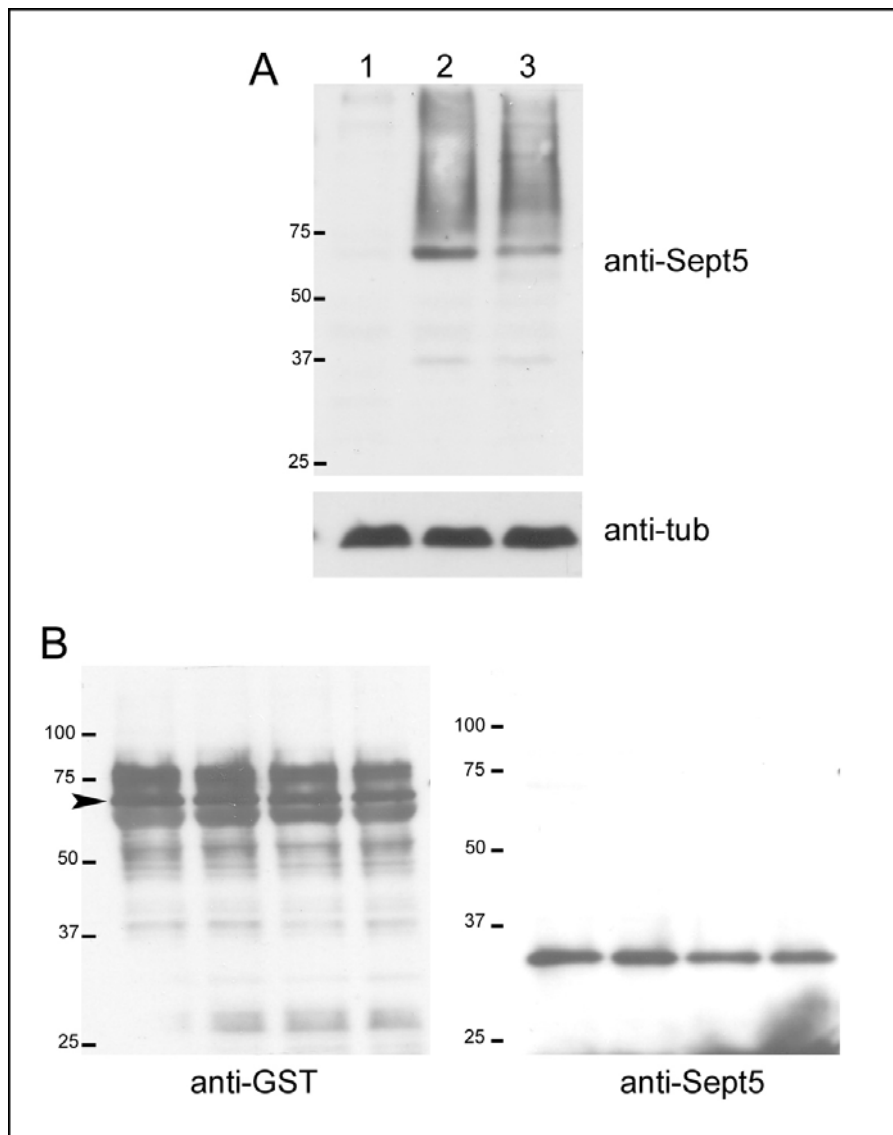
## 5.2. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE SEPTIN 4

Otra forma de demostrar que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila* sería comprobar si hay un incremento de los niveles de esta proteína en mutantes de *parkin*. Para esto necesitaríamos un anticuerpo que reconociera Septin 4. Con ese anticuerpo podríamos detectar la proteína tanto en individuos salvajes como en mutantes *parkin* y comparar sus niveles. Desafortunadamente no existe ningún anticuerpo que detecte específicamente Septin 4 y que se pueda utilizar para este análisis. Sin embargo, sí que existen anticuerpos que reconocen la proteína humana SEPT5. Dado que las dos proteínas poseen un alto grado de similitud (ver el apartado 1 de Resultados), quisimos averiguar si el anticuerpo contra SEPT5 era capaz de reconocer también a Septin 4.

Para comprobar esta hipótesis se utilizaron dos anticuerpos anti-SEPT5, uno monoclonal, LJ33, y uno policlonal, ambos cedidos por el Dr. Constantino Martínez de la Universidad de Murcia. Estos anticuerpos fueron utilizados en experimentos de *Western Blot* con diferentes tipos de muestra. En primer lugar hicimos el análisis con extractos proteicos totales de individuos adultos *OrR* (Fig. R.33A). En segundo lugar utilizamos extractos de adultos que sobreexpresaban Septin 4 con las líneas *da-GAL4* (Fig. R.33A) y *act-GAL4*. Por último, repetimos el análisis con extractos celulares de

cultivos de *E. coli* que expresaban la proteína de fusión GST-Sep4 (Fig. R.33B). Las pruebas se repitieron a diferentes concentraciones de anticuerpo. En los extractos de individuos *OrR* no se detectó ninguna banda (Fig. R.33A), sin embargo, en los extractos de individuos que sobreexpresan Septin 4 se pudieron detectar dos bandas. Ninguna de las bandas detectadas correspondía al tamaño predicho para la proteína Septin 4 (aproximadamente 50 ó 43 KDa según la isoforma), aunque una diferencia respecto al tamaño predicho podría deberse a modificaciones postraduccionales. Teniendo en cuenta que el sistema UAS/GAL4 es sensible a la temperatura, debería detectarse mayor cantidad de proteína en los extractos de individuos que sobreexpresan Septin 4 a 29°C que en los que lo hacen a 25°C, sin embargo, se observa lo contrario (Fig. R.33A). Respecto a la detección de la proteína de fusión GST-Sep4 en extractos celulares de cultivos de *E. coli*, con el anticuerpo anti-GST se detecta una banda intensa que corresponde con el tamaño predicho de la proteína de fusión (Fig. R.33B), sin embargo, el anticuerpo anti-SEPT5 no fue capaz de reconocer esta misma banda, detectando una única banda de un tamaño considerablemente menor (Fig. R.33B). Teniendo en cuenta estos resultados, no pudimos asegurar que los anticuerpos contra la proteína humana SEPT5 reconozcan también a Septin 4 y no pudieron ser utilizados para comprobar los niveles de Septin 4 en mutantes *parkin*.

**Figura R.33. Inmunodetección de Septin 4.** (A), detección de Septin 4 con el anticuerpo policlonal de SEPT5 en extractos proteicos de moscas *OrR* (carrera 1), y UAS-Sep4 (x2), *da-GAL4/CyO*, TM3 (ver apartado 6.1.1. de Resultados) a 25°C (carrera 2) y a 29°C (carrera 3). El control de carga se realizó utilizando el anticuerpo anti-tubulina. (B), detección de GST-Sep4 en lisados de células de *E. coli* que expresan la proteína de fusión. En este caso la detección se realizó tanto con el anticuerpo policlonal de SEPT5 como con anti-GST. La cabeza de flecha corresponde a la proteína GST-Sep4. A la izquierda de cada figura se muestran los pesos moleculares en KDa.



## 6. BÚSQUEDA DE GENES RELACIONADOS FUNCIONALMENTE CON SEPTIN 4

Una característica importante de los modelos de enfermedades humanas en *Drosophila*, es que deben reproducir alguno de los fenotipos de la enfermedad, como es en este caso la neurodegeneración. También es conveniente encontrar otros fenotipos fácilmente observables y modificables, que pueden servir como punto de partida para la identificación de otros genes que puedan estar relacionados con el gen problema y, por tanto, estar implicadas en la patogénesis de la enfermedad (Tickoo y Russell, 2002).

Como se ha descrito anteriormente, la sobreexpresión de Septin 4 es tóxica para las neuronas DA, que son las principales afectadas en la EP. Además, hemos visto como este fenotipo se ve suprimido por un aumento en los niveles de Parkin,

detectándose un número de neuronas DA similar al de individuos salvajes, y agravado por una reducción de los niveles de Parkin que reduce el número de neuronas DA que se detectan. Estas observaciones nos llevan a pensar que los resultados derivados del estudio del gen *septin 4* de *Drosophila* podrían ser de utilidad para dilucidar la ruta o mecanismos de patogénesis de la EP. El hecho de que la sobreexpresión de Septin 4 sea tóxica para las neuronas DA, junto con los fenotipos (fácilmente identificables y cuantificables) de ala y de letalidad observados al sobreexpresar la proteína de manera ubicua con las líneas *da-GAL4* y *act-GAL4* respectivamente, abre diferentes vías para analizar posibles interacciones de Septin 4 con otras proteínas que pudieran participar en la misma ruta de patogénesis. Además, como existe una interacción entre Septin 4 y Parkin, estos análisis podrían incluir la interacción con proteínas que ya se sabe que interaccionan con Parkin en *Drosophila*. Asimismo, estos fenotipos se pueden aprovechar para testar el efecto de diferentes compuestos o fármacos sobre ellos.

#### **6.1. RASTREO DE FALTA DE FUNCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON *septin 4***

El éxito de *Drosophila* como organismo modelo se debe en gran parte a la posibilidad de realizar rastreos genéticos con el fin de identificar genes implicados en un proceso biológico concreto. Una de las posibilidades que ofrecen estos rastreos, es la utilización del sistema UAS/GAL4 para buscar genes modificadores de un fenotipo inicial provocado por la sobreexpresión de un gen. Los rastreos de modificadores han sido muy útiles para la identificación de componentes y disección de rutas de señalización, y se basa en la modificación de ese fenotipo por variación de la dosis (reducción o aumento) de otro gen relacionado. Para la realización de este tipo de rastreos, las moscas que presentan el fenotipo inicial se pueden cruzar con diferentes colecciones de moscas según el tipo de rastreo que se desea realizar. En los rastreos de falta de función, se pueden utilizar colecciones de líneas P, que son líneas en las cuales la inserción de un elemento P en el genoma de *Drosophila* causa la interrupción de un gen, o bien se puede realizar el rastreo con una colección de deficiencias, que son líneas en las que faltan fragmentos de alguno de los cromosomas. En los rastreos de ganancia de función, se utilizan colecciones de líneas EP, en las cuales la inserción de un elemento EP en el genoma de *Drosophila* es capaz de provocar la sobreexpresión de los genes inmediatamente adyacentes a ésta, al cruzar esa línea con una línea GAL4. Para poder llevar a cabo estos rastreos genéticos, el fenotipo inicial debe ser fácilmente identificable y, además, debe ser modificable. De esta manera, si la línea P, EP o la deficiencia afecta algún gen relacionado con el causante

del fenotipo inicial, se producirá una modificación de este fenotipo, aumentándolo o suprimiéndolo.

En nuestro caso, dado que disponíamos de un fenotipo fácilmente observable y cuantificable en ala (ver apartado 3.6.2 de Resultados), hemos aplicado esta herramienta para identificar genes que pudieran estar relacionados funcionalmente con Septin 4. Concretamente hemos realizado un rastreo piloto de falta de función utilizando una colección de 168 deficiencias que cubrían los cromosomas 2 (80 líneas) y 3 (88 líneas) de *Drosophila* y que procedía del *Bloomington Stock Center*. Elegimos este rastreo porque, además, era una forma relativamente rápida de evaluar el potencial de este fenotipo para la realización posterior de otros rastreos más exhaustivos, utilizando por ejemplo colecciones de líneas P y EP.

### 6.1.1. Generación de la línea UAS-Sep4(x2), da-GAL4/ CyO, TM3

Para la realización del rastreo, era necesario obtener una línea que contuviera los elementos UAS-Sep4(x2) y da-GAL4 de manera estable, y conseguir que se heredaran en bloque. Como estos elementos se encuentran en cromosomas diferentes, generamos una línea que contiene esos dos cromosomas, equilibrados con un cromosoma compuesto para los cromosomas 2 y 3. Para ello, se siguieron los pasos descritos en el apartado 10.3 de Materiales y métodos. Esta línea se pudo mantener en heterocigosis dado que la inserción da-GAL4 es letal en homocigosis, de esta manera evitamos también posibles sucesos de recombinación en el cromosoma 3, que contiene las dos inserciones UAS-Sep4. La línea obtenida se utilizó para la realización del rastreo con la colección de deficiencias.

### 6.1.2. Identificación de regiones autosómicas cuya delección intensifica significativamente el fenotipo de ala de UAS-Sep4; da-GAL4

Para llevar a cabo este objetivo, la línea generada en el punto anterior se cruzó con la colección de 168 deficiencias de los cromosomas 2 y 3 ya mencionada. El resultado de estos cruces se analizó mediante el cálculo del porcentaje de individuos UAS-Sep4(x2)/Def, da-GAL4/+ o UAS-Sep4(x2)/+; da-GAL4/Def, según el cromosoma donde se encontraba la deficiencia, que presentaban un fenotipo fuerte de ala respecto al total de individuos de su mismo genotipo. Dado que el porcentaje de individuos que presentan ese fenotipo al sobreexpresar Septin 4 con la línea da-GAL4 es del 3% (ver el apartado 3.6.2 de Resultados), centramos nuestro análisis en la búsqueda de regiones autosómicas que aumentan ese porcentaje. Utilizando este criterio seleccionamos como interacciones positivas aquellas en las que la deficiencia aumentaba el porcentaje hasta al menos el 30%, lo que representa un total de 11

deficiencias. Para todas ellas repetimos el análisis con el fin de confirmar el resultado obtenido. De las 11 deficiencias seleccionadas, la interacción fue confirmada en 7 de ellas (Tabla R.14), 3 no interaccionaron y 1 no se pudo volver a analizar. Como puede verse en la tabla R.14, el porcentaje de individuos con fenotipo fuerte obtenido en los cruces con las deficiencias (%) es claramente mayor al obtenido en las moscas control (3%). Las diferencias son significativas en todos los casos. Estas interacciones sugieren que dentro de la región cromosómica que falta en cada una de las deficiencias se localiza algún gen que está relacionado funcionalmente con el gen *septin 4*, ya sea de forma directa o indirecta.

<b>Deficiencia</b>	<b>Límites</b>	<b>%</b>	<b>p-valor</b>
<i>Df(2L)XE-2750</i>	28A5-B1; 28C1-9	37,2	0.046
<i>Df(3L)GN34</i>	63E6-9; 64A8-9	45,3	0.01
<i>Df(3L)81k19</i>	73A3; 74F	43,5	0.042
<i>Df(3L)BSC8</i>	74D3-75A1; 75B2-5	56,3	0.046
<i>Df(3L)ri-XT1</i>	77E2-4; 78A2-4	34,2	0.045
<i>Df(3R)T-32</i>	86E2-3; 87C6-7	35,2	0.046
<i>Df(3R)DG2</i>	89E-F; 91B1-2	38,8	0.028

**Tabla R.14. Relación de deficiencias que interaccionaron con el fenotipo inicial de ala.** El *p-valor* indicado corresponde a la comparación, utilizando una prueba *t* de Student, de cada una de ellas con la sobreexpresión de *Septin 4* únicamente. La columna titulada “%” se refiere al porcentaje de individuos *UAS-Sep4(x2)/Def*, *da-GAL4/+* o *UAS-Sep4(x2)/+*; *da-GAL4/Def* que presentan un fenotipo de ala fuerte respecto al total de individuos de ese genotipo.

Curiosamente, dos de las deficiencias que interaccionaron, *Df(3L)81k19* y *Df(3L)BSC8* solapaban en la región comprendida entre 74D3 y 74F. Esto nos hizo sospechar que, probablemente, el gen responsable de la interacción podría localizarse dentro de esta región solapante, de manera que centramos la búsqueda de genes candidatos a esta zona. Otras deficiencias seleccionadas carecen de regiones genómicas bastante grandes que contienen muchos genes potencialmente interesantes como es el caso de *Df(3R)T-32* y *Df(3R)DG2*. Por tanto, antes de realizar la selección de candidatos, hicimos una acotación de la región genómica responsable de la interacción utilizando deficiencias que abarcan una región de menor tamaño. Como puede observarse en la tabla R.15, ninguna de las deficiencias seleccionadas para acotar la región cubierta por la deficiencia *Df(3R)T-32* mostró una interacción clara con el fenotipo inicial. Estas deficiencias cubren prácticamente dicha región genómica excepto la región 86E2. Por tanto, es posible que la interacción se deba a algún gen contenido precisamente en esa región de la deficiencia *Df(3R)T-32* no

cubierta con otras deficiencias. Por otra parte, una de las deficiencias seleccionadas para acotar la región delecionada en *Df(3R)DG2* sí mostró interacción, lo que permitió determinar que la interacción original se debe a algún gen localizado dentro de la región comprendida entre 89E2 y 90D, y fue en esta región donde finalmente se buscaron los genes candidatos.

Deficiencia original	Deficiencias para acotar	Límites	%
	<i>Df(3R)T61</i>	86E3; 87A9	11,5
<i>Df(3R)T-32</i>	<i>Df(3R)Exel7313</i>	87A9; 87B5	11,2
	<i>Df(3R)kar-Sz12</i>	87B1; 87C8-9	11,6
	<i>Df(3R)RD31</i>	89E2; 90D	<b>42,8</b>
<i>Df(3R)DG2</i>	<i>Df(3R)ED5797</i>	90C2; 90F10	5,1
	<i>Df(3R)ED5815</i>	90F4; 91B8	0

**Tabla R.15. Acotación de deficiencias.** La región comprendida dentro de la deficiencia subrayada se seleccionó para buscar genes candidatos a responsables de la interacción con la deficiencia original. La columna titulada “%” se refiere al porcentaje de individuos *UAS-Sep4(x2)/Def*, *da-GAL4/+* o *UAS-Sep4(x2)/+; da-GAL4/Def* que presentan un fenotipo de ala severo respecto al total de individuos de ese genotipo.

Como podemos ver en estos resultados, el rastreo realizado ha permitido identificar un número discreto de interacciones respecto al total de deficiencias de las que partíamos. Esto significa que estas interacciones podrían ser bastante específicas y que el fenotipo de ala utilizado en este rastreo podría ser utilizado también para otro tipo rastreos más exhaustivos que nos permitan el análisis de la interacción de *septin 4* con diferentes genes individualmente. Sin embargo, dado que mediante el rastreo de deficiencias habíamos obtenido información acerca de regiones autosómicas dentro de las cuales podría localizarse un gen relacionado funcionalmente con *septin 4*, continuamos este rastreo en busca de los genes candidatos.

### 6.1.3. Selección de genes candidatos dentro de las deficiencias

Dentro de cada una de las deficiencias seleccionadas existe un gran número de genes. Por tanto, sería muy costoso analizar uno por uno todos ellos en busca del gen o genes responsables de la interacción. Por eso, nos planteamos una serie de criterios para seleccionar aquellos genes que, bien por su función o por los procesos en los que están implicados, pudieran estar potencialmente relacionados con *septin 4*. De esta manera, y asumiendo que *Septin 4* comparte homología funcional con *SEPT5*, seleccionamos para su posterior análisis aquellos genes implicados en procesos



celulares en los que participa SEPT5, así como genes cuya función pudiera estar relacionada con alguno de los procesos que se han visto alterados en la EP. Así, seleccionamos aquellos genes implicados en:

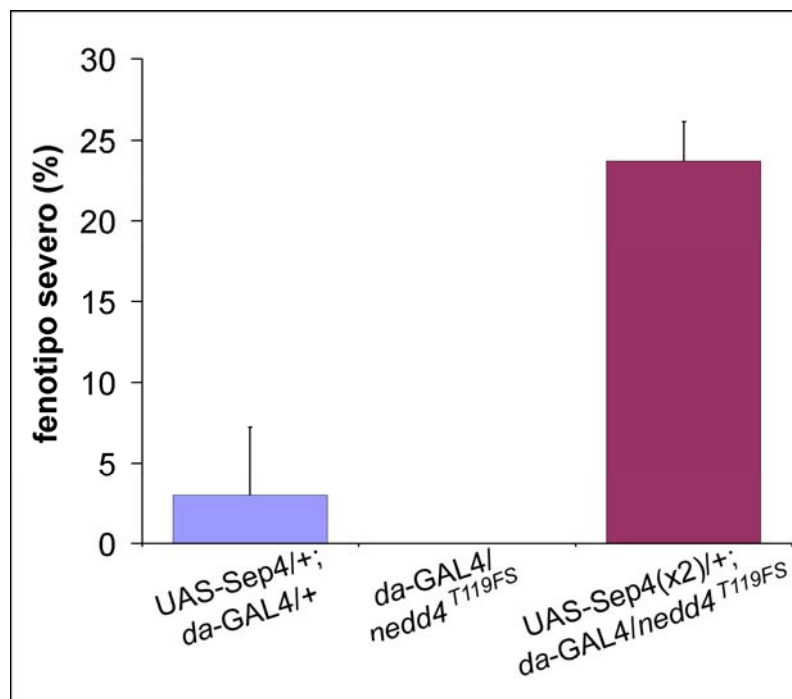
- Exocitosis
- Transporte de vesículas sinápticas
- Regulación de la transmisión sináptica
- Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina
- Apoptosis
- Metabolismo de especies reactivas de Oxígeno

En alguna de las deficiencias, la selección de genes candidatos según los criterios establecidos dio como resultado la identificación de un único gen o ninguno, como es el caso de la región 86E2, sin embargo, en otras deficiencias se pudieron identificar hasta seis genes (Tabla R.16). Para comprobar si estos genes eran realmente los responsables de la interacción buscamos alelos de falta de función de los mismos, con el objetivo de reproducir dicha interacción. Concretamente, identificamos alelos de falta de función para 9 de los genes candidatos. Los alelos identificados se cruzaron con la línea UAS-Sep4(x2), *da*-GAL4/CyO, TM3 y se calculó el porcentaje de individuos que sobreexpresan Septin 4 y son heterocigotos para dichos alelos, y que muestran un fenotipo fuerte (Tabla R.16). En el caso del gen *nedd4*, se utilizó un alelo dominante negativo, el alelo *nedd4*<sup>T119FS</sup>. Este alelo contiene, adyacente al gen *nedd4*, una inserción de un elemento GSV6, derivado del elemento GS (Toba y col., 1999), que contiene las secuencias UAS, de forma que produce la sobreexpresión de este gen en presencia del factor GAL4. Además, una mutación en el extremo 3' de la ORF del gen hace que la proteína que se genera carezca de todos los dominios funcionales. Por tanto, las moscas *nedd4*<sup>T119FS</sup> sobreexpresan, en presencia del factor GAL4, una forma no funcional de la proteína (Sakata y col., 2004).

**Tabla R.16. Análisis del efecto de la falta de función de los genes candidatos sobre el fenotipo de ala.** ND, alelos no disponibles. La columna titulada “%” se refiere al porcentaje de individuos que presentan sobreexpresión de Septin 4 con *da*-GAL4 junto con el alelo de falta de función del gen analizado en heterocigosis y muestran un fenotipo de ala fuerte respecto al total de individuos del mismo genotipo.

Deficiencia	Genes candidatos	Procesos celulares	Alelos testados	%
<i>Df(2L)XE-2750</i>	<i>Slob</i>	Regulación transmisión sináptica	<i>P{XP}Slob<sup>007006</sup></i>	5,75
<i>Df(3L)GN34</i>	<i>CG10862</i>	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	ND	5
	<i>Ubpj63E</i>	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	<i>P{EPgy2}Ubpj63E EY<sup>07341</sup></i>	
	<i>Ras64B</i>	Regulación exocitosis y transmisión sináptica	ND	
	<i>Rop</i>	Unión a SNARE, regulación exocitosis y transmisión sináptica	<i>Rop<sup>G27</sup></i>	
<i>Df(3L)81k19</i>	<i>nedd4</i>	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	<i>nedd4<sup>T119FS</sup></i>	23,7
<i>Df(3L)BSC8</i>				
<i>Df(3L)ri-XT1</i>	<i>CG4365</i>	Metabolismo de especies reactivas de Oxígeno	<i>P{SUPor-P} CG4365<sup>KG07968</sup></i>	13
	<i>CG8913</i>	Metabolismo de especies reactivas de Oxígeno	ND	8
	<i>CG5873</i>	Metabolismo de especies reactivas de Oxígeno	<i>P Bac CG5873<sup>c00427</sup></i>	
	<i>Prx5037</i>	Metabolismo de especies reactivas de Oxígeno	ND	
<i>CG12265</i>	Anti-apoptosis	<i>PBac{RB} CG12265<sup>e01527</sup></i>		
<i>Df(3R)RD31</i>	<i>CG5823</i>	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	<i>PBac{WH} CG5823<sup>f04935</sup></i>	7.7
			<i>P{EPgy2} CG5823<sup>EY15491</sup></i>	4.4
		Exocitosis de vesículas sinápticas	<i>P{EPgy2}Rim<sup>EY12862</sup></i>	2.4
			<i>P{EPgy2}Rim<sup>EY05246</sup></i>	4.6

Según los resultados obtenidos con los alelos de los genes candidatos, sólo el gen *nedd4* presentaría una interacción clara con la sobreexpresión de Septin 4. El análisis con el alelo de *nedd4* se repitió para confirmar el resultado y comprobar que la diferencia con el fenotipo inicial era significativa. Con los datos obtenidos calculamos que un 23.7% ( $\pm$  2.4) de los individuos UAS-Sep4(x2)/+; da-GAL4/*nedd4*<sup>T119FS</sup> presentaban un fenotipo fuerte (Fig. R.34). La prueba *t* de Student determinó que la diferencia es significativa (*p*-valor=0.02). Curiosamente este gen codifica, como *parkin*, una E3 proteína-ubiquitina ligasa (Ingham y col., 2004). Nedd4 pertenece a la familia HECT de proteína-ubiquitina ligasas y se ha visto que está implicada en procesos de endocitosis y de guía de axones (Staub y col., 1996; Rotin y col., 2000; Dunn y Hicke, 2001; Myat y col., 2002). En este sentido, cabe destacar que el incremento de fenotipo encontrado al reducir la función de Nedd4 es bastante similar al encontrado con la reducción de los niveles de Parkin (ver apartado 4.2.3.3 de Resultados).

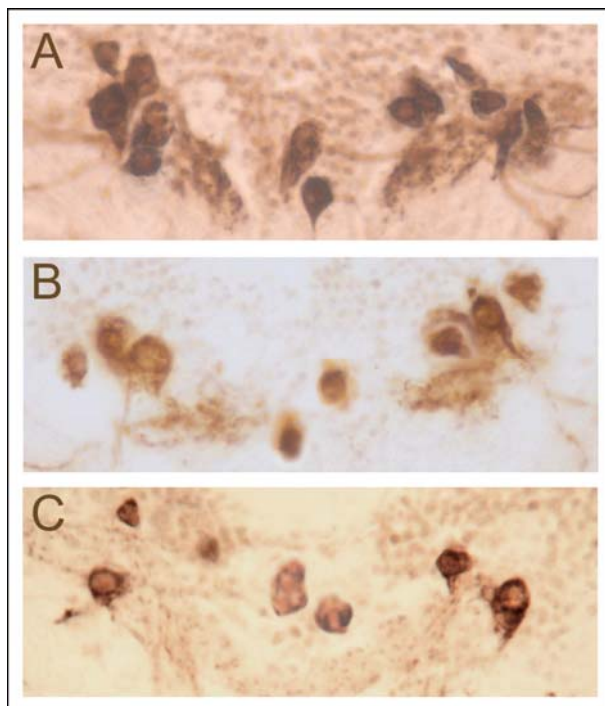


**Figura R.34. Una reducción en los niveles de Nedd4 agrava el fenotipo de ala producido por la sobreexpresión ubicua de Septin 4.** Comparación del porcentaje de individuos que presentan fenotipo severo. La sobreexpresión únicamente de la forma mutada de *nedd4*, no tiene ningún efecto en las alas.

#### 6.1.4. Análisis de la falta de función de *nedd4* sobre el fenotipo causado por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas dopaminérgicas

Dado que Nedd4 es también una E3 proteína-ubiquitina ligasa (Ingham y col., 2004), nos planteamos determinar si podría estar relacionada con Septin 4 de forma

similar a Parkin. Si esto fuera así, la reducción de la función de Nedd4, podría agravar el fenotipo observado al sobreexpresar Septin 4 en las neuronas DA, como ocurre con la reducción en los niveles de Parkin. Para comprobarlo, cruzamos la línea recombinante *TH-GAL4*, *UAS-Sep4* (generada en el apartado 4.1.3 de Resultados) con el alelo *nedd4*<sup>T119FS</sup> que, como ya se ha comentado, es un alelo dominante negativo (ver apartado 6.1.3 de Resultados). De esta manera, los individuos *TH-GAL4*, *UAS-Sep4*/*nedd4*<sup>T119FS</sup> sobreexpresarán en las neuronas DA tanto Septin 4 como la forma no funcional de Nedd4, reduciendo la función de esta proteína. Analizamos el número de neuronas DA del *cluster* DM de estos individuos a 35-40 días de edad. Esto se hizo a partir de secciones frontales de cerebros teñidas con el anticuerpo anti-TH, y comparamos el resultado con el obtenido para individuos que sobreexpresaban únicamente Septin 4, además, como control negativo realizamos el mismo análisis en individuos *TH-GAL4*/*nedd4*<sup>T119FS</sup> (Fig. R.35).



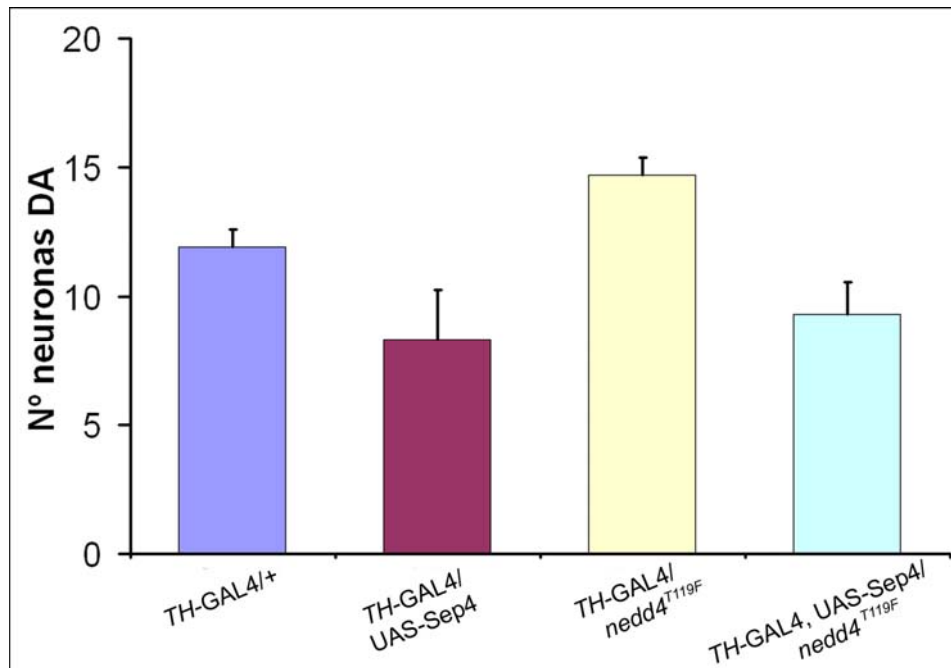
**Figura R.35. Neuronas DA del *cluster* DM en secciones frontales de cerebro.** Las secciones corresponden a adultos de 35-40 días de edad de los genotipos *TH-GAL4*/*nedd4*<sup>T119FS</sup>, (A), *TH-GAL4*, *UAS-Sep4*/*nedd4*<sup>T119FS</sup>, (B) y *TH-GAL4*/*UAS-Sep4*, (C).

En los resultados obtenidos en este análisis, observamos que no existen diferencias significativas en el número de neuronas DA del *cluster* DM de individuos que sobreexpresan Septin 4 en fondo salvaje y aquellos que lo hacen en un fondo heterocigoto *nedd4*<sup>T119FS</sup>, y que tienen, por tanto, reducida la función de este gen

(Tabla R.17 y Figs R.35 y R.36). Es posible que la interacción entre Septin 4 y Nedd4, no sea apreciable en este *cluster*, de manera que, en futuros estudios, sería interesante analizar otros *clusters* del cerebro. Por otra parte, las moscas que sólo sobrexpresan la forma no funcional de Nedd4 en las neuronas DA presentan un número de neuronas en el *cluster* DM mayor al observado en controles *TH-GAL4/+* (Tabla R.17 y Fig. R.36). Esto podría estar enmascarando una posible interacción entre las dos proteínas, por esta razón, en el momento en que estén disponibles, sería también interesante realizar este análisis con otros alelos de pérdida de función de *nedd4*.

Genotipo	Edad	Nº neuronas DA	n	p-valor
<i>TH-GAL4/+</i>	35-40 días	11.9 ± 0.7	7	-
<i>TH-GAL4/ nedd4<sup>T119FS</sup></i>	35-40 días	14,6 ± 0.7	8	0.000003
<i>TH-GAL4/UAS-Sep4</i>	35-40 días	8.4 ± 1.9	10	-
<i>TH-GAL4, UAS-Sep4/nedd4<sup>T119FS</sup></i>	35-40 días	9.3 ± 1.3	5	0.27

**Tabla R.17. Recuento de neuronas DA del *cluster* DM en el análisis de la falta de función de *nedd4*.** Para cada caso, el *p-valor* corresponde a la comparación mediante una prueba *t* de Student con el genotipo de la fila anterior. n= número de cerebros analizados para cada genotipo.



**Figura R.36. Representación gráfica del número de neuronas DA del *cluster* DM.** Efecto de la reducción de la función de Nedd4 sobre la neurotoxicidad de Septin 4 en individuos de 35-40 días de edad.

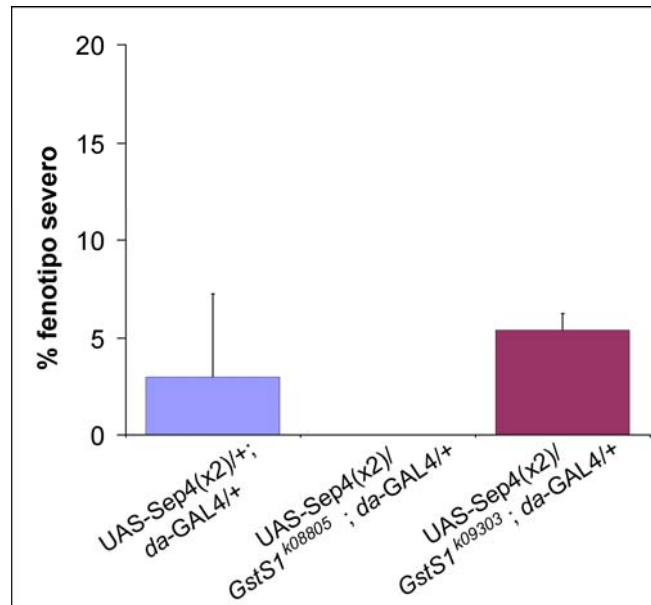
## 6.2. ANÁLISIS DE LA POSIBLE INTERACCIÓN DE SEPTIN 4 CON PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON PARKIN

De los diferentes estudios realizados con los mutantes de *parkin* de *Drosophila*, se ha podido relacionar a la proteína Parkin con otras proteínas que podrían estar implicadas en la misma ruta de patogénesis, como por ejemplo GstS1 (Greene y col., 2005; Whitworth y col., 2005). Además, también se ha conseguido establecer una relación entre *parkin* y la ruta de señalización JNK (Cha y col., 2005) (ver Discusión). El gen *GstS1* fue identificado en un rastreo genético como un modificador del fenotipo de letalidad que presentan los individuos homocigotos para el alelo *park*<sup>25</sup> de falta de función del gen *parkin* (Greene y col., 2005). Además se ha demostrado que los individuos mutantes *park*<sup>25</sup> presentan degeneración de neuronas DA en el *cluster* PPL1 (Fig. I.11H) (Whitworth y col., 2005). La pérdida de neuronas DA descrita en estos mutantes se ve suprimida por la sobreexpresión de *GstS1* en estas neuronas (Whitworth y col., 2005), y se ve aumentada por un alelo de falta de función de este mismo gen (Greene y col., 2005). Esto indica que Parkin y GstS1 podrían estar implicados en un mecanismo de acción común. Dado que GstS1 ha sido relacionada con la detoxificación de productos causantes de estrés oxidativo (Singh y col., 2001), es posible que también Parkin esté implicada en este proceso.

Teniendo en cuenta que GstS1 es capaz de reducir la toxicidad producida por la pérdida de la función de Parkin, y asumiendo la hipótesis de que Septin 4 es un sustrato de Parkin, comprobamos si *GstS1* y *septin 4* podrían estar también relacionados entre sí. Para comprobar si *septin 4* interacciona genéticamente con *GstS1*, utilizamos el fenotipo de ala provocado por la sobreexpresión de Septin 4 y dos alelos de falta de función de *GstS1* por inserción de elementos P en el gen (*GstS1*<sup>k08805</sup> y *GstS1*<sup>k09303</sup>). En estudios anteriores se pudo comprobar que estos dos alelos son capaces de agravar los fenotipos producidos por la mutación del gen *parkin* (Whitworth y col., 2005). Como anteriormente, analizamos el porcentaje de individuos que presentaban un fenotipo de ala fuerte al reducir la dosis del gen *GstS1*. Nuestros resultados muestran que no se produce una variación significativa del fenotipo inicial (Tabla R.18 y Fig. R.37) con ninguno de los dos alelos. Estos resultados sugieren que probablemente no exista una relación funcional entre Septin 4 y GstS1, y que estas dos proteínas están actuando en procesos diferentes.

Genotipo	%	p-valor
UAS-Sep4(x2)/+; da-GAL4/+	3 ± 4.24	
UAS-Sep4(x2)/GstS1 <sup>k08805</sup> ; da-GAL4/+	0	0.25
UAS-Sep4(x2)/GstS1 <sup>k09303</sup> ; da-GAL4/+	6 ± 4.8	0.28

**Tabla R.18. Efecto de la falta de función de GstS1 sobre el fenotipo de ala causado por la sobreexpresión ubicua de Septin 4.** %, porcentaje de individuos con fenotipo fuerte respecto al total del mismo genotipo. Los p-valor se han obtenido mediante la aplicación de una prueba t de Student respecto al primer genotipo.



**Figura R.37. Representación gráfica del porcentaje de individuos con fenotipo de ala fuerte.** Efecto de la falta de función de GstS1 sobre el fenotipo inicial producido por sobreexpresión de Septin 4.

## **7. EFECTO DE LA MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE DOPAMINA SOBRE LA TOXICIDAD DE SEPTIN 4**

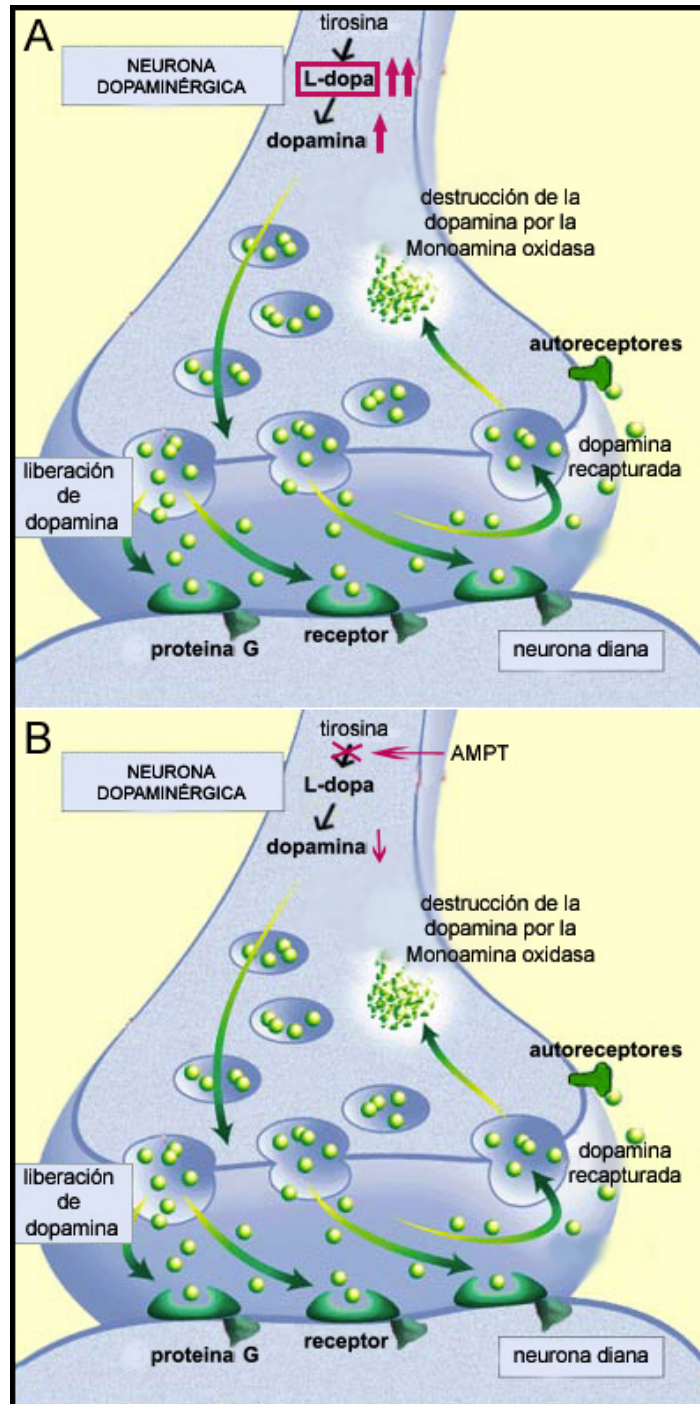
En estudios anteriores, se ha visto que SEPT5 se localiza principalmente en terminales presinápticos (Honer y col., 1993; Caltagarone y col., 1998; Kinoshita y col., 2000), y está asociada con vesículas sinápticas (Caltagarone y col., 1998). También se ha demostrado su implicación en procesos de exocitosis, ya que su acumulación en células HIT-T15 inhibe la secreción y la expresión de una forma mutada de la proteína la favorece (Beites y col., 1999). Por otro lado, la sobreexpresión de la homóloga de SEPT5 en ratones produce una degeneración de las neuronas DA que puede ser contrarrestada por la inhibición de la biosíntesis de dopamina (Dong y col., 2003). Además, SEPT5 inhibe la secreción de dopamina en células PC12 (Dong y col., 2003), sugiriendo que un bloqueo en la secreción de dopamina por SEPT5 podría estar provocando la degeneración de las neuronas DA.



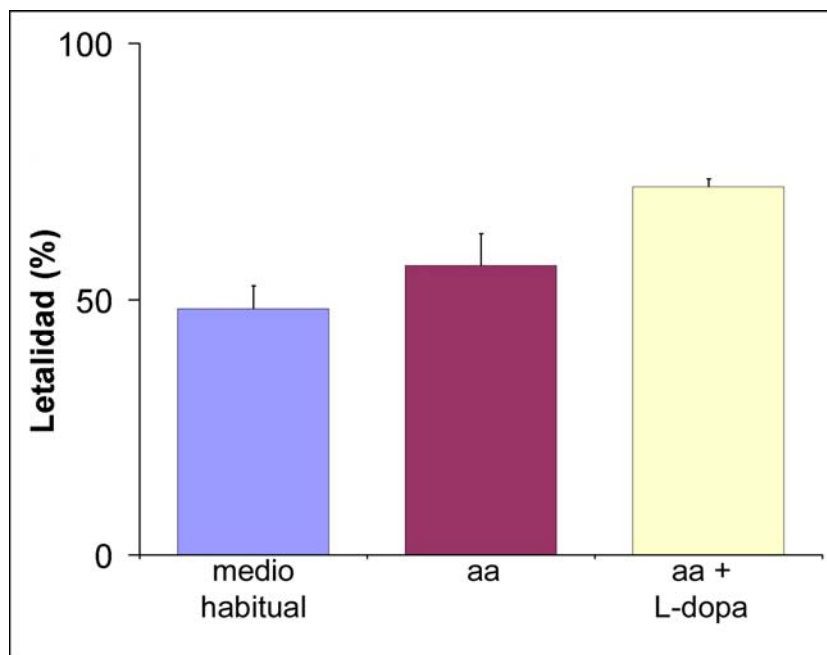
Como hemos visto en el apartado 3.6.2 de Resultados, la sobreexpresión ubicua de Septin 4 con la línea *act-GAL4*, genera un fenotipo de letalidad parcial. Este fenotipo puede utilizarse como punto de partida para analizar el efecto de ciertas sustancias o fármacos sobre la toxicidad de Septin 4. Análisis similares se han llevado a cabo anteriormente con otros modelos de *Drosophila* para la EP. En estos estudios, se pudo observar como el tratamiento con algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la EP modificaban los fenotipos iniciales de pérdida de la capacidad motora (Pendleton y col., 2002) , además, el fármaco geldanamycin, utilizado como tratamiento anticancerígeno (Bagatell y col., 2000) fue capaz de recuperar los fenotipos de pérdida de la integridad neuronal (Auluck y col., 2005). En nuestro caso utilizamos el fenotipo de letalidad parcial para analizar el efecto de la administración de una molécula relacionada con la síntesis de dopamina, la L-dopa (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina). La L-dopa es un compuesto precursor de la dopamina (Fig. R.38). Este ha sido hasta el momento el tratamiento más utilizado para paliar los síntomas de la EP, ya que la administración de este compuesto es capaz de incrementar los niveles de dopamina, reducidos a causa de la pérdida neuronal y además, es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica, propiedad que no presenta la dopamina en sí. A pesar de ello, algunos estudios *in vitro* apuntan a que el tratamiento con L-dopa podría ser tóxico para las neuronas, ya que el incremento en la síntesis de dopamina vendría acompañado por un aumento en la producción de radicales libres (Halliwell, 1989; Pardo y col., 1995; Walkinshaw y Waters, 1995). Estos estudios apoyarían los resultados observados en ratones que sobreexpresan SEPT5 (Dong y col., 2003). Sin embargo, no todos los estudios al respecto coinciden en que el compuesto L-dopa sea tóxico para las neuronas (Dziewczapolski y col., 1997; Murer y col., 1998).

Según nuestra hipótesis, Septin 4 estaría actuando de la misma manera que SEPT5 en humanos y ratones, de forma que su acumulación podría estar inhibiendo la liberación de dopamina por las neuronas DA en *Drosophila*, causando así un estrés celular por la producción de radicales libres que dañarían a la célula. Para comprobar si la administración de L-dopa podía tener un efecto tóxico en nuestro modelo debido a la acumulación intracelular de dopamina, se repitieron los análisis de letalidad realizados en el apartado 3.6.2 de Resultados, pero desarrollando los cruces en medio habitual suplementado con L-dopa 1 mM y ácido ascórbico 0.25 mg/ml para evitar la oxidación de la L-dopa en el medio (según se ha descrito en el apartado 12 de Materiales y métodos). Paralelamente se realizó el mismo ensayo con medio que contenía únicamente ácido ascórbico como control. Cuando comparamos los resultados de letalidad obtenidos en los controles ( $56.7\% \pm 6.2$ ), con los obtenidos en medio suplementado con L-dopa ( $72\% \pm 1.6$ ), pudimos observar que la administración

de L-dopa no produce un aumento significativo ( $p\text{-valor}=0.17$ ) de la letalidad en individuos que sobreexpresan Septin 4 de manera ubicua con la línea *act-GAL4* (Fig. R.39).



**Figura R.38. Alteración de la síntesis de dopamina por diferentes compuestos.** Adaptada de <http://thebrain.mcgill.ca>. (A), el incremento en los niveles de L-dopa provocan un incremento de la síntesis de dopamina. (B), la inhibición de la tirosina hidroxilasa por compuestos como AMPT produce el bloqueo de la síntesis de dopamina.

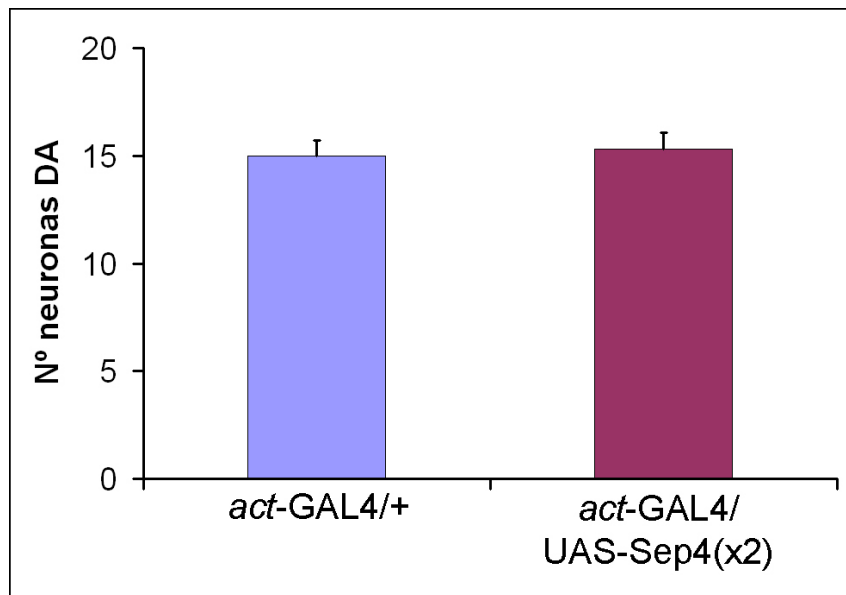


**Figura R.39. Efecto de la administración del compuesto L-dopa sobre el fenotipo de letalidad producido por la sobreexpresión de Septin 4.**

Este resultado sugiere que la letalidad observada por la sobreexpresión ubicua de Septin 4 no es dependiente de los niveles de dopamina, de forma que, probablemente, la letalidad observada no esté relacionada con una alteración en las neuronas DA. Por esta razón, comprobamos si la sobreexpresión ubicua de Septin 4 tenía un efecto sobre estas neuronas similar al observado con las líneas *Ddc-GAL4* y *TH-GAL4*. Para ello, analizamos el número de neuronas DA de los individuos *act-GAL4/UAS-Sep4(x2)* que llegaban a adultos mediante tinción de secciones frontales cerebros con el anticuerpo anti-TH. Por lo que pudimos observar en este análisis, los individuos que alcanzan el estadio adulto presentan un número de neuronas DA en el *cluster* DM similar a los controles (Tabla R.19 y Fig. R.40). Es posible que este resultado se deba a que los individuos analizados son los que sobreviven al efecto letal de la sobreexpresión de Septin 4, y que la alteración de esas neuronas sólo esté presente en los individuos que mueren. Alternativamente, también es posible que no exista una relación entre la alteración de dichas neuronas y la letalidad observada, que podría deberse al efecto tóxico de Septin 4 en otros tejidos.

Genotipo	Edad	Nº neuronas DA	n	p-valor
<i>act-GAL4/+</i>	35-40 días	15 ± 0.7	6	
<i>act-GAL4/UAS-Sep4(x2)</i>	35-40 días	15.3 ± 0.8	5	0.51

**Tabla. R.19. Recuento del número de neuronas del *cluster* DM en el análisis de la sobreexpresión ubicua de Septin 4.** El *p*-valor se obtuvo mediante la aplicación de una prueba *t* de Student. n=número de cerebros analizados para cada genotipo.



**Fig. R.40. Representación gráfica del número de neuronas DA del *cluster* DM.** Efecto de la sobreexpresión ubicua de Septin 4 en individuos de 35-40 días de edad.

## 8. RELACIÓN DE SEPTIN 4 CON OTRAS SEPTINAS DE *Drosophila*

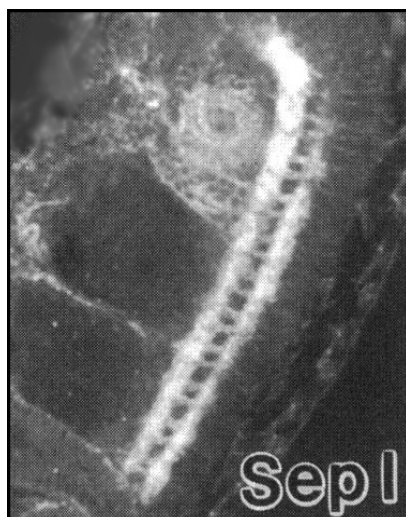
Como se ha comentado en la Introducción, aunque las septinas fueron inicialmente identificadas en levadura, podemos encontrar miembros de esta familia de proteínas en todo el reino animal. El número de nuevas proteínas de la familia de las septinas ha aumentado enormemente debido sobre todo a los análisis de genomas. Una de las características de las proteínas de esta familia es la capacidad de interactuar entre ellas, formando complejos macromoleculares (Field y col., 1996; Blaser y col., 2002; Peng y col., 2002; Martinez y col., 2004; Blaser y col., 2006). Además, en algunos trabajos realizados con septinas se ha especulado con la posibilidad de que existan mecanismos compensatorios entre ellas, y de que tengan funciones redundantes (Adam y col., 2000; Nguyen y col., 2000; Peng y col., 2002). Concretamente, Peng y colaboradores describieron en ratones que en ausencia de SEPT5 se produce un incremento en los niveles de SEPT2, con la cual formaría complejo (Beites y col., 1999; Peng y col., 2002). Dada la relación que existe entre SEPT5 y SEPT2 en

mamíferos, puede que también en *Drosophila* exista una relación similar entre sus proteínas ortólogas. La proteína Septin 1 de *Drosophila* es la proteína de la mosca con mayor similitud con la proteína SEPT2 humana (Kinoshita, 2003; Pan y col., 2007). Septin 1 está relacionada con otras septinas de *Drosophila* como Peanut (Pnut) y Septin 2, con las cuales forma un complejo (Field y col., 1996). Se sabe que en embriones mutantes *pnut*, la proteína *septin 1* desaparece en el SNC, entre otros tejidos (Fares y col., 1995; Field y col., 1996; Adam y col., 2000). Los autores proponen que Septin 1 desaparece en ausencia de Peanut, bien porque se reduce su expresión en esas condiciones o bien porque, al no poder formar complejo con Peanut, aumenta su degradación (Fares y col., 1995).

Con el objetivo de conocer mejor qué relación podría existir entre Septin 4 y estas otras dos septinas de *Drosophila*, seguimos dos aproximaciones experimentales. En primer lugar determinamos si una alteración en los niveles de Septin 4 podría producir una variación en la expresión embrionaria de *septin 1*, como ocurre en los mutantes *pnut*. En segundo lugar, analizamos la expresión del gen *septin 4* en embriones mutantes *pnut* en busca de alteraciones de la expresión habitual del gen.

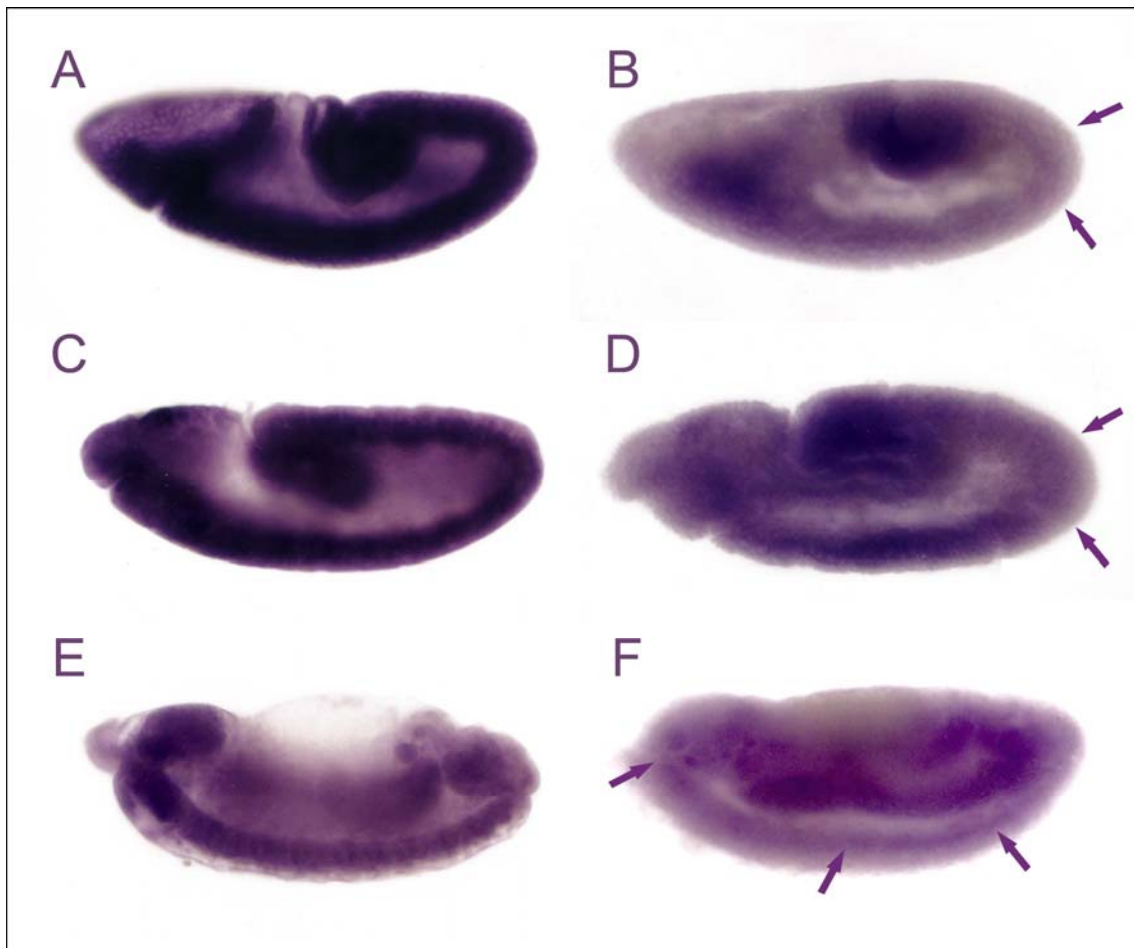
### 8.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE UN INCREMENTO EN LOS NIVELES DE Septin 4 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *septin 1* EN EMBRIONES

Según un estudio anterior, el gen *septin 1* se expresa también en el sistema nervioso embrionario (Fares y col., 1995) (Figs. R.41 y R.42A, C y E), como ocurre con el gen *septin 4*.



**Figura R.41. Inmunodetección de Septin 1 en embriones OrR.**  
De Fares y col. (1995).

En este contexto, analizamos en primer lugar si un exceso de Septin 4 pudiera estar afectando a la expresión del gen *septin 1*. Para ello, y mediante hibridación *in situ* con una sonda del gen *septin 1*, analizamos su expresión en embriones procedentes de un cruce entre las líneas *elav-GAL4* y *UAS-Sep4(28.3)/TM3*, así como de embriones *OrR* como control. Mediante este análisis pudimos comprobar que en más del 50% de los embriones procedentes de este cruce no se detecta la expresión de *septin 1* o ésta desaparece en algunas regiones del SNC en las cuales debería detectarse (Figs. R.42B, D y F). Estos resultados muestran que la sobreexpresión de Septin 4 produce una reducción de la expresión de *septin 1* en algunos individuos. Esto sugiere que entre estos dos genes o las proteínas que codifican podría existir algún mecanismo de compensación, al igual que se ha propuesto en mamíferos (Beites y col., 1999; Peng y col., 2002).



**Figura R.42. Alteración de la expresión de *septin 1* en embriones que sobreexpresan Septin 4.** Hibridación *in situ* con una sonda de *septin 1* en embriones *OrR*, (A, C y E), y en embriones procedentes del cruce de las líneas *elav-GAL4* y *UAS-Sep4(28.3)/TM3*, (B, D y F). En las dos columnas se comparan embriones de estadios similares, incluyendo los estadios 8-9, (A y B), 10-11, (C y D) y el estadio 13, (E y F) del desarrollo embrionario. Las flechas indican regiones del SNC en las que debería detectarse señal de expresión de *septin 1* y sin embargo no aparece.



## 8.2. EFECTO DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE *peanut* SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *septin 4* EN EMBRIONES

Dado que en mutantes *pnut* no se detecta la proteína Septin 1 (Fares y col., 1995; Adam y col., 2000), y que según nuestros resultados la sobreexpresión de Septin 4 produce una reducción de la expresión de *septin 1*, quisimos saber si la falta de Peanut afectaba a la expresión del gen *septin 4*. Para ello realizamos una hibridación *in situ* con la sonda de *septin 4* en embriones procedentes de la línea *pnut<sup>XP</sup>/SM6, TM6*, el 25% de los cuales serán mutantes *pnut<sup>XP</sup>*. Paralelamente, se realizó la hibridación con una sonda de *septin 1* como control. Mediante este análisis pudimos observar que, en ambos casos, más del 50% de los embriones no presentaban expresión de los genes. En primer lugar esto sugiere que la falta de función de *peanut* está afectando a la expresión de *septin 1*. Además, por el porcentaje de embriones no teñidos, es posible que esa desaparición de la expresión de *septin 1*, no sólo se dé en embriones mutantes *pnut<sup>XP</sup>/pnut<sup>XP</sup>*, sino también en los heterocigotos *pnut<sup>XP</sup>/SM6, TM6*. Como ya hemos comentado, anteriormente se había visto como en ausencia de Peanut no se detecta la proteína Septin 1, aunque se desconocía si esto era debido a que el gen se expresaba menos o a que la proteína se degradaba a más velocidad (Fares y col., 1995). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyarían la primera hipótesis.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la falta de función de *peanut* también produce una desaparición de la expresión de *septin 4*. Sin embargo, los embriones que no presentan señal de expresión de *septin 4* pertenecen a estadios de desarrollo previos al 12, y a partir de este estadio la expresión del gen parece ser normal. Esto podría indicar que, en los primeros estadios del desarrollo embrionario, Septin 4 podría formar un complejo con Peanut, de la misma forma que se ha propuesto para Septin 1 (Fares y col., 1995; Field y col., 1996; Adam y col., 2000), aunque, en el caso de Septin 1, el complejo con Peanut podría darse durante todo el desarrollo embrionario, ya que, en mutantes *pnut*, también se observa la desaparición de la expresión de *septin 1* (Fig. R.42) y de su proteína en las últimas fases de este estadio (Fares y col., 1995). Resultados anteriores sugieren que las septinas podrían formar complejos alternativos (Adam y col., 2000), si esto es así, a partir del estadio 12, Septin 4 podría formar un complejo con otras septinas (ver Discusión), manteniendo los niveles de expresión normales.



# *Discusión*

La secuenciación del genoma de *Drosophila* (Adams y col., 2000) ha favorecido la identificación de muchos genes de este organismo que tienen ortólogos en humanos. Esto nos ofrece la posibilidad de poder analizar la función de los genes en *Drosophila*, donde es mucho más fácil su estudio, gracias a las potentes herramientas desarrolladas en este organismo. Posteriormente, se pueden extrapolar los resultados, determinando en qué procesos están implicados y, si es el caso, cómo puede afectar su función al desarrollo de ciertas enfermedades en humanos. Un ejemplo de esto son los modelos desarrollados en *Drosophila* para el estudio de la función del gen *parkin*, cuyo ortólogo en humanos está implicado en la EP. Como se ha comentado en la Introducción, estos modelos recapitulan algunas de las características típicas de la enfermedad y han ayudado a desvelar las posibles funciones de este gen en diferentes procesos celulares. Dado el papel de la proteína parkin humana en la degradación de proteínas (ver Introducción), es muy importante conocer la naturaleza y funciones de sus sustratos, así como las consecuencias de su acumulación. Por esta razón, en este trabajo hemos centrado nuestra atención en el estudio del gen *septin 4* de *Drosophila*, cuyo ortólogo, *SEPT5*, codifica uno de los sustratos de parkin en humanos. Asimismo, hemos llevado a cabo diversos análisis con el objetivo de determinar la homología funcional entre *septin 4* y *SEPT5* y la relación de este gen con *parkin*. Hay que destacar que este es el primer estudio realizado con un posible sustrato de Parkin en *Drosophila*.

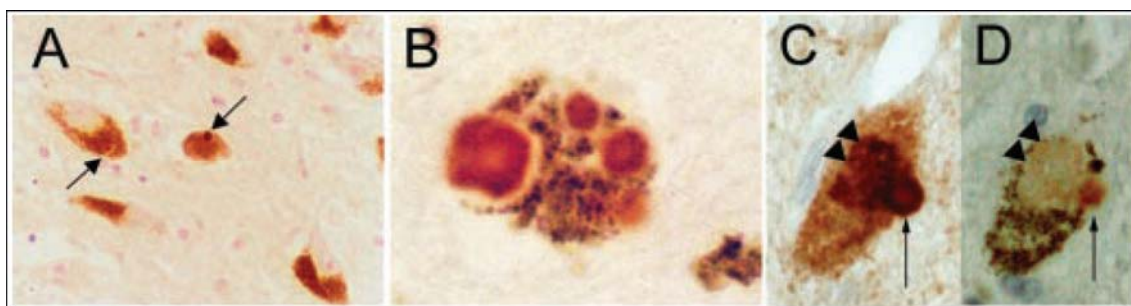
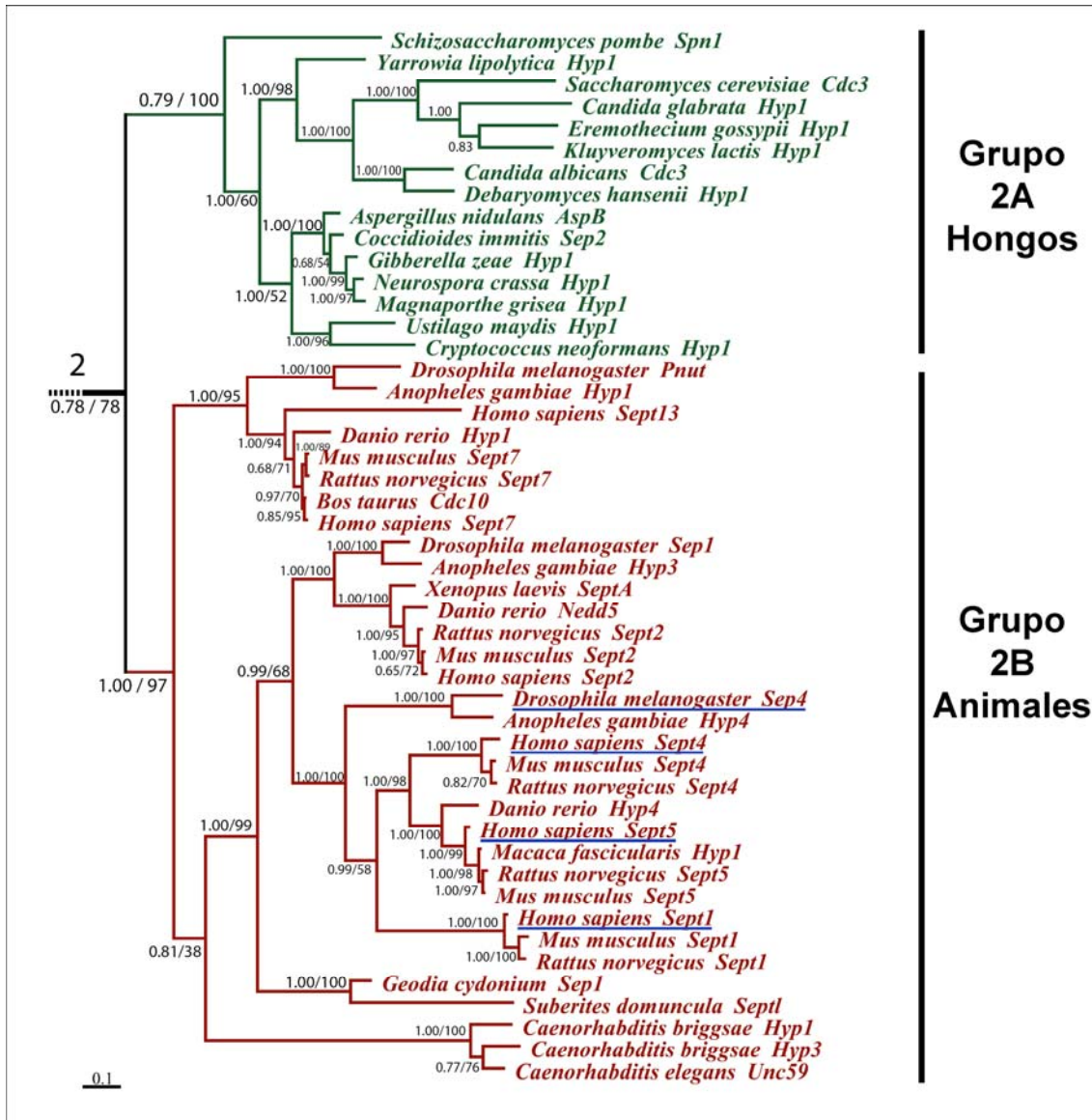
### **1. RELACIÓN DE *septin 4* CON LA EP**

Como se ha comentado en la Introducción, la acumulación de proteínas tóxicas en las neuronas DA podría ser uno de los mecanismos de patogénesis que conducen a su degeneración en pacientes de la EP. Una disfunción de la proteína parkin humana puede producir la acumulación de sus sustratos en estos pacientes, por tanto es muy importante saber cuales son estos sustratos y qué función están desarrollando en la célula. Uno de sus sustratos es *SEPT5*, y se ha demostrado que su sobreexpresión en ratones produce una degeneración de neuronas DA dependiente de dopamina (Dong y col., 2003). Dado que en el momento de empezar este trabajo no se conocía ningún sustrato de Parkin en *Drosophila*, nos centramos en la caracterización del ortólogo de *SEPT5* en este organismo. Un procedimiento habitual para la búsqueda de ortólogos consiste en identificar los mejores “hits” simétricos o *SymBets* (Koonin, 2005), esta estrategia se basa en que dos proteínas o genes ortólogos son más parecidos entre sí de lo que lo son a cualquier otra proteína o gen de los organismos comparados. Los resultados obtenidos siguiendo este procedimiento indican que la proteína Septin 4 es la ortóloga de *SEPT5* en *Drosophila*.

Sin embargo, hay que mencionar que Septin 4 presenta un porcentaje de similitud con la proteína SEPT4 humana similar al que presenta con SEPT5. De hecho, Septin 4 es la proteína de *Drosophila* con mayor similitud a SEPT4. Esto sugiere que los genes humanos *SEPT5* y *SEPT4* sean producto de una duplicación. En varios trabajos posteriores al inicio de este estudio, se muestran las relaciones filogenéticas entre las septinas humanas y las de *Drosophila*, entre otros organismos (Kinoshita, 2003; Pan y col., 2007). Estos trabajos muestran que la proteína Septin 4 no sólo guarda una estrecha relación con las proteínas SEPT5 y SEPT4 humanas sino también con septin 1 (SEPT1) (Fig. D.1). Según estos resultados, el gen *septin 4* de *Drosophila* estaría triplicado en mamíferos. En estos estudios se muestra que las proteínas Peanut y Septin 1 de *Drosophila* aparecen agrupadas con otras septinas humanas (Fig. D.1), confirmando la relación de ortología que hemos establecido en este trabajo entre *septin 4* y *SEPT5*. El resto de septinas de *Drosophila*, Septin 2 y Septin 5, están bastante más alejadas de las anteriores ya que no pertenecen al grupo representado en la figura D.1 (Kinoshita, 2003; Pan y col., 2007).

Según algunos estudios, SEPT4 es también un sustrato de parkin en humanos (Choi y col., 2003) y estaría relacionada con diversos procesos implicados en la EP (Choi y col., 2003; Ihara y col., 2003; Ihara y col., 2007). En estos trabajos se ha podido comprobar que esta proteína forma parte, junto con  $\alpha$ -synuclein, de los CL (Ihara y col., 2003) (Fig. D.2). Además, se ha visto que, en ratones, un déficit de esta proteína produce una reducción de la neurotransmisión de dopamina y un incremento de la toxicidad producida por  $\alpha$ -synuclein (Ihara y col., 2007).

**Figura D.1. Árbol filogenético de las septinas del grupo 2 de diferentes especies.** Adaptada de Pan y col. (2007). La proteína Septin 4 de *Drosophila* aparece subrayada en azul, así como sus homólogas humanas. En este grupo están representadas también las septinas Peanut y Septin 1 de *Drosophila*.

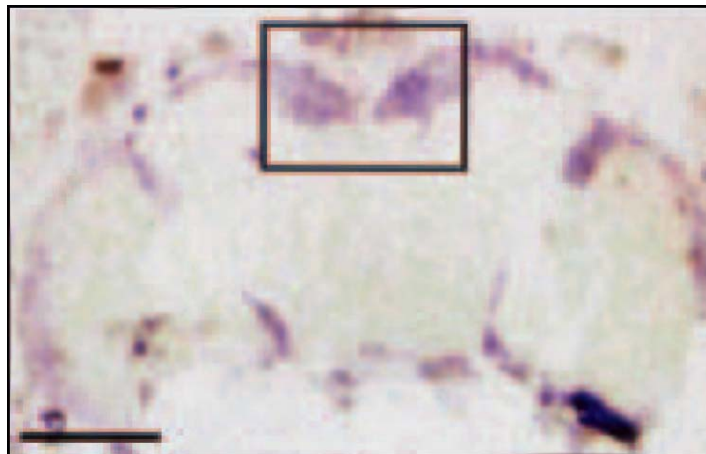


**Figura D.2. Asociación de SEPT4 con los CL en cerebros de pacientes de la EP.** De Ihara y col. (2003). (A y B) Inmunodetección de SEPT4 (en rojo) en los CL de células nerviosas pigmentadas. (C y D) Secciones adyacentes de los CL de células nerviosas pigmentadas en las que se ha detectado  $\alpha$ -synuclein (C) y SEPT4 (D). Se puede apreciar que en el núcleo con mayor intensidad de tinción de  $\alpha$ -synuclein (señalado con cabezas de flecha) no se detecta SEPT4.

El hecho de que las dos proteínas humanas que más se parecen a Septin 4, estén relacionadas con procesos implicados en la EP, añade importancia al estudio del gen *septin 4* en *Drosophila*. Teniendo en cuenta que ambas proteínas humanas son sustratos de parkin, una de las cuestiones más interesantes en este estudio era establecer la posible relación que pudiera presentar Septin 4 con la proteína Parkin de *Drosophila*. Esta relación se ha intentado establecer mediante diferentes aproximaciones como se ha visto en los apartados 4 y 5 de Resultados, y como discutiremos más adelante.

## **2. EXPRESIÓN DE *septin 4* EN *Drosophila***

Como ya hemos visto en la Introducción, el tejido más afectado en los pacientes de la EP es el sistema nervioso, concretamente las neuronas DA de la SNpc. Conocer la expresión de *septin 4* en las neuronas DA de *Drosophila* era importante por dos razones, en primer lugar porque estas son las neuronas que se ven afectadas en los pacientes y, en segundo lugar, porque en un estudio anterior se vio como *parkin* también se expresa en alguno de los *cluster* dopaminérgicos como el *cluster* DM (Cha y col., 2005) (comparar Fig. D.3 y R.6H). Dado que nuestra hipótesis es que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila*, el hecho de que *septin 4* tenga un patrón de expresión similar al de *parkin* sería muy significativo. Aunque tradicionalmente las septinas se habían relacionado con procesos de división celular, en organismos superiores algunas de ellas se expresan predominantemente en tejidos no mitóticos como por ejemplo el cerebro, de manera que se les debe suponer funciones diferentes a las relacionadas con la citocinesis (ver Kartmann y Roth, 2001; y Spiliotis y Nelson, 2006, como revisión). Dentro de este grupo se encuentran SEPT5 y SEPT4 (Caltagarone y col., 1998; Yagi y col., 1998; Beites y col., 1999; Zieger y col., 2000; Ihara y col., 2003). En este trabajo hemos comprobado mediante *Northern blot* e hibridación *in situ* de embriones y cerebros adultos que, al igual que SEPT5, *septin 4* se expresa predominantemente en el sistema nervioso, indicando que su función podría estar relacionada con la de su homóloga humana. En *Drosophila*, la localización de los grupos de neuronas DA en el cerebro adulto está bien definida, lo que nos ha permitido establecer que la expresión de *septin 4* coincide con la situación de algunos de estos *clusters* de neuronas DA en ese tejido, tal como se ha observado para *parkin*. Este resultado apoya la hipótesis de que Septin 4 es un sustrato de Parkin y justifica el análisis de la acumulación de esta proteína en las neuronas DA de la mosca.



**Figura D.3. Expresión del gen *parkin* en el cerebro adulto de *Drosophila*.** De Cha y col. (2005). El rectángulo señala la región donde se sitúa el *cluster* DM de neuronas DA.

Además de la expresión en el SNC embrionario, la expresión observada en las células cardíacas o cardioblastos podría indicar una posible función de Septin 4 en los primeros estadios del desarrollo del vaso dorsal, el cual, posteriormente formará el corazón adulto. Aunque el corazón adulto de *Drosophila* es muy diferente al de vertebrados, se ha visto que el vaso dorsal es una estructura muy similar al corazón de vertebrados en sus primeras fases de desarrollo (Zaffran y Frasch, 2002). Además, la formación de ambas estructuras presenta muchas semejanzas. En ambos casos, los precursores cardíacos derivan del mesodermo lateral y su destino viene especificado a través de rutas celulares y efectores transcripcionales similares (Bodmer y Venkatesh, 1998; Cripps y Olson, 2002; Zaffran y Frasch, 2002). Hay que señalar que las anomalías cardíacas son el defecto congénito más común en humanos (Hoffman, 1995; Hoffman y col., 2004). Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos genéticos del desarrollo del corazón es muy pobre. El estudio de esta estructura en la mosca en sus primeros estadios de desarrollo podría ayudar a elucidar ciertos aspectos del desarrollo en vertebrados. Además, en los últimos años se han desarrollado herramientas muy útiles para cuantificar fenotipos relacionados con anomalías cardíacas en *Drosophila*, que se han utilizado en varios estudios como modelo para la identificación de genes implicados en enfermedades cardíacas (Wolf y col., 2006; Ocorr y col., 2007; Wessells y Bodmer, 2007). Por esta razón, quizá sería interesante, en estudios posteriores, profundizar en el posible papel que Septin 4 pudiera tener en el desarrollo del vaso dorsal y en el corazón adulto. Cabe destacar que, en un trabajo anterior, se detectó expresión del gen *SEPT5* en el corazón (Zieger y col., 2000), aunque estudios más recientes muestran que la proteína SEPT5 no se



detecta en cardiomiocitos (Ahuja y col., 2006). Es posible que aunque el gen se esté expresando en el corazón, exista algún mecanismo de control de la traducción que impida que se genere la proteína.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que *septin 4* presenta una expresión muy elevada en las células madre de la línea germinal en ovarios de *Drosophila*, siendo la única septina que presenta una expresión tan elevada en estas células (Kai y col., 2005) y donde, según los autores, podría tener un papel como inhibidor de la citocinesis. Sería interesante, por tanto, analizar el papel que Septin 4 pudiera estar desempeñando en este tejido.

Aparte de determinar la expresión espacial, mediante el análisis del patrón de expresión de *septin 4* hemos podido detectar claramente dos transcritos de 2.4 y 2.7 Kb respectivamente. Como se ha comentado en el apartado 1 de Resultados, en las bases de datos son 7 los transcritos predichos para este gen (Fig. R.2B). Los tamaños de estos transcritos según la base de datos Flybase aparecen en la tabla D.1. Teniendo en cuenta el tamaño de estos transcritos, podemos decir que, probablemente, el transcrito de 2.4 Kb corresponda a *CG9699-RA* o a *CG9699-RG*, mientras que el transcrito de 2.7 Kb podría corresponder a *CG9699-RB* o a *CG9699-RF*. Aunque no podemos asociar de una forma clara los transcritos detectados en este trabajo con los predichos en la base de datos, parece ser que los transcritos *CG9699-RC*, *CG9699-RD* y *CG9699-RE* no se corresponderían con ninguno de los detectados en este trabajo. El resultado obtenido sugiere que los dos transcritos detectados se expresan mayoritariamente en los estadíos analizados. Sin embargo, es posible que en los primeros estadíos larvarios o en el de pupa se estén expresando otros transcritos.

<b>Transcrito</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<i>CG9699-RA</i>	2449
<i>CG9699-RB</i>	2610
<i>CG9699-RC</i>	2901
<i>CG9699-RD</i>	2947
<i>CG9699-RE</i>	2943
<i>CG9699-RF</i>	2783
<i>CG9699-RG</i>	2419

**Tabla D.1. Tamaño de los diferentes transcritos predichos para el gen *septin 4*.**



### **3. NEUROTOXICIDAD DE SEPTIN 4**

Si la hipótesis inicial de que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila* fuera cierta, la acumulación de esta proteína en las neuronas DA debería tener efectos similares a los observados en los mutantes del gen *parkin* (ver apartado 4.1 de la Introducción). Por esta razón uno de nuestros principales objetivos fue determinar el efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en estas neuronas. Gracias a los análisis realizados durante este estudio, hemos podido comprobar que la sobreexpresión de Septin 4 es tóxica para las neuronas DA del *cluster* DM y que esta toxicidad es dependiente de la edad, ya que en individuos jóvenes no se observa ninguna alteración en estas neuronas. Como hemos visto en el apartado 3.2 de Resultados, esta toxicidad produce una reducción en el número de neuronas que se detectan respecto a los controles. Además, hemos podido comprobar que con la utilización del método de fluorescencia se detecta una reducción menor del número de neuronas DA del *cluster* DM. Estos resultados sugieren que la toxicidad de Septin 4 no provoca la muerte de estas neuronas, sin embargo, sí que produciría una alteración en la integridad de éstas que se traduce en una reducción en los niveles del enzima TH. Por esta razón las neuronas más afectadas no se detectan con métodos menos sensibles como el de la inclusión en parafina. Una reducción en la intensidad de la tinción de las neuronas DA del *cluster* DM con el anticuerpo anti-TH se ha observado también en mutantes del gen *parkin* (Cha y col., 2005) (ver apartado 4.1 de la Introducción). El hecho de que tanto la falta de función de *parkin* como la sobreexpresión de Septin 4 presenten un efecto similar en estas neuronas es un dato bastante significativo para nuestro trabajo, y apoyaría la hipótesis de que Septin 4 sea un sustrato de Parkin en *Drosophila*. Sin embargo, a pesar de que la disminución de la inmunoreactividad con el anticuerpo anti-TH, en los mutantes del gen *parkin* sí que se detectan todas las neuronas del *cluster* DM. Esto podría indicar que la acumulación de Septin 4 que se produce en dichas neuronas es mayor al sobreexpresar la proteína con el sistema UAS/GAL4 que con la pérdida de Parkin y, por tanto, la toxicidad que se observa es mayor. Además, algunos trabajos demuestran la implicación de diversas E3 proteína-ubiquitina ligasas en una misma enfermedad neurodegenerativa (como revisión ver Ardley y Robinson, 2004). Entre estas enfermedades se encuentra la EP, para la cual, aparte de Parkin, se han encontrado otras E3s implicadas, como son CHIP, DORFIN y SIAH-1 (Imai y col., 2002; Ito y col., 2003; Nagano y col., 2003). Estas E3 proteína-ubiquitina ligasas podrían actuar en el *cluster* DM en ausencia de Parkin, de manera que en esas condiciones evitarían una excesiva acumulación de sustratos, produciéndose una menor toxicidad que cuando sobreexpresamos Septin 4 en nuestro modelo. La interacción encontrada entre Septin 4 y la E3 proteína-ubiquitina ligasa

Nedd4 en este estudio, podría apoyar este planteamiento (ver apartado 6.1.3 de Resultados y 6 de Discusión). Por otro lado, también hemos podido comprobar que la degeneración de neuronas DA del *cluster* PPL1 que se observa en mutantes *park*<sup>25</sup> (ver apartado 4.1 de Introducción), no ocurre cuando sobreexpresamos Septin 4. Esto podría deberse a que el *cluster* PPL1 sea más sensible a la acumulación de sustratos de Parkin diferentes a Septin 4 aunque, por el contrario, también podría ocurrir que el *cluster* DM sea más sensible a la acumulación de esta proteína. En este contexto, nuestros resultados muestran que la expresión de *septin 4* en el cerebro adulto coincide con algunas regiones donde se localizan los *clusters* de neuronas DA. La coincidencia con la región donde se sitúa el *cluster* DM es bastante clara, sin embargo, con otros *clusters* como el PPL1 no está tan claro. Por tanto, es posible que *septin 4* no se exprese en este *cluster* y que su acumulación en él no tenga ningún efecto. También se ha descrito anteriormente que la línea *TH-GAL4* no induce la expresión en todas las neuronas inmunorreactivas para TH (Whitworth y col., 2005), por lo tanto, otra posible explicación para estas diferencias sería que la sobreexpresión de Septin 4 no se esté produciendo en todas las neuronas DA, mientras que la mutación en el gen *parkin* sí afecta a todas ellas.

Además, hemos comprobado que la toxicidad inducida por la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA no es suficiente para afectar a la longevidad o a la capacidad locomotora de las moscas. En otros casos, por ejemplo al sobreexpresar  $\alpha$ -synuclein en el SNC de *Drosophila* o en los mutantes del gen *parkin* (Feany y Bender, 2000; Greene y col., 2003; Pesah y col., 2004; Cha y col., 2005) si que se han observado alteraciones en la capacidad motora de estos individuos. Sin embargo, la pérdida de esta capacidad que se observa en los mutantes del gen *parkin* puede ser mas bien una consecuencia de la degeneración muscular detectada en éstos, y no a causa de una alteración en las neuronas DA.

Por otra parte, hay que mencionar que, en ratones mutantes para SEPT5 no se observan defectos neurológicos o motores (Peng y col., 2002), mientras que, como ya se ha comentado, su sobreexpresión produce, entre otros defectos, la pérdida de neuronas DA en la SNpc (Dong y col., 2003). En la actualidad existen alelos de *septin 4* generados por inserción de elementos P. Dos de estos alelos (*sep4*<sup>c03171</sup> y *sep4*<sup>e01641</sup>) presentan la inserción del elemento P en el segundo intrón, mientras que en un tercer alelo (*sep4*<sup>f02365</sup>), la inserción se localiza en el primer intrón. El análisis molecular de estos alelos podría desvelarnos si la inserción de estos elementos P produce alguna alteración en la expresión del gen. En el caso de que alguno de ellos produzca una reducción en la expresión de *septin 4* o en la producción de su proteína, sería interesante analizar el efecto de esta reducción en los tejidos afectados por la

sobreexpresión de Septin 4. Este análisis podría darnos alguna información adicional sobre la función de este gen.

En la EP la degeneración de las neuronas DA es bastante específica. A este respecto, hemos podido comprobar en este trabajo que la toxicidad producida por la acumulación de Septin 4 no afecta a todas las neuronas, ya que, su sobreexpresión en los fotorreceptores con la línea *GMR-GAL4* no produce ninguna alteración de estos, ni en número ni en su disposición. De manera que, en *Drosophila*, las neuronas DA deben ser especialmente sensibles a la acumulación de esta proteína.

Por último, los resultados obtenidos en este trabajo al sobreexpresar SEPT5 en las neuronas DA de *Drosophila* son bastante significativos, ya que hemos podido comprobar que produce un fenotipo similar al que obtenemos al sobreexpresar Septin 4, lo cual sugiere que podrían tener una homología funcional.

#### **4. TOXICIDAD DE SEPTIN 4 EN OTROS TEJIDOS**

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido conseguir un fenotipo que pudiera ser utilizado para identificar genes relacionados con Septin 4. El fenotipo de neurotoxicidad no era válido para esto, ya que su análisis es demasiado costoso para realizar una búsqueda sistemática de modificadores. Por esta razón, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Septin 4 en otros tejidos en busca de fenotipos visibles. Con este análisis pudimos comprobar que la acumulación de esta proteína no sólo es tóxica para las neuronas DA, sino que también interfiere en el correcto desarrollo de otros tejidos y que afecta a la supervivencia de las moscas. En primer lugar hemos comprobado que la sobreexpresión ubicua de Septin 4 con la línea *da-GAL4* afecta al correcto desarrollo de las alas, ya que, como se ha descrito en el apartado 3.6.2 de Resultados, aparecen alas con ondulaciones, pliegues e incluso ampollamientos. En un estudio anterior, se analizaron los cambios de expresión de genes en alas pupales de *Drosophila*, concretamente durante el período en el cual se desarrollan los pelos (Ren y col., 2005). En este estudio se identificó a *septin 4* como uno de los genes que variaban significativamente su expresión en el ala durante este proceso del desarrollo. Los autores relacionan este cambio de expresión con el hecho de que las septinas se asocian al citoesqueleto (ver Spiliotis y Nelson, 2006, como revisión). De hecho, como veremos más adelante, se ha observado cierta interacción entre Septin 4 y Mbs, una proteína constituyente del citoesqueleto e implicada en el desarrollo del ala (Giot y col., 2003; Lee y Treisman, 2004). Curiosamente, en este mismo estudio también encuentran fuertes diferencias de expresión en genes relacionados con la ruta de

degradación de proteínas dependiente de ubiquitina, sugiriendo que la regulación de la degradación de algunos sustratos sería importante en el desarrollo del ala. Todo esto nos hace pensar que Septin 4 podría tener un papel en el desarrollo del ala y por esta razón su sobreexpresión ubicua produce alteraciones en este tejido. Como hemos podido observar, la sobreexpresión de Septin 4 con algunas líneas específicas que dirigen la expresión a regiones concretas de las alas como *vg-GAL4*, *nub-GAL4*, *c96-GAL4*, *sd-GAL4* o *en-GAL4* no presentaban ningún fenotipo aparente ni siquiera realizando la sobreexpresión a 29°C. Esto puede deberse a las diferencias de expresión entre estas líneas y la línea *da-GAL4*, ya que esta última produce la sobreexpresión de Septin 4 de una manera más general en este tejido, lo que podría tener un efecto más tóxico.

En segundo lugar, hemos comprobado que la sobreexpresión ubicua de Septin 4 con la línea *act-GAL4* produce letalidad parcial. Este fenotipo no aparece con la línea *da-GAL4*. Anteriormente se ha visto como dos líneas de expresión ubicua, entre ellas *act-GAL4*, pueden presentar niveles de expresión diferentes (Chavous y col., 2001). Es posible que los niveles de expresión inducidos por la línea *act-GAL4* sean mayores que con la línea *da-GAL4*, de manera que resultan críticos para la supervivencia de las moscas. En cualquier caso, la mayoría de estas moscas llegan a las últimas fases del estadio de pupa. Además, las moscas que sobreviven no presentan ninguna alteración externa que permita averiguar que es lo que está causando la letalidad. Como veremos más adelante, los individuos supervivientes no presentan ninguna alteración de las neuronas DA, de manera que la muerte de los individuos podría ser consecuencia de la toxicidad de Septin 4 en otros tejidos.

Los fenotipos encontrados tras la sobreexpresión ubicua de Septin 4, son fenotipos fácilmente identificables que suponen un punto de partida para el análisis de interacciones genéticas. Además, el hecho de que estos fenotipos sean cuantificables nos permite realizar análisis más objetivos.

## **5. RELACIÓN DE *septin 4* CON *parkin***

El objetivo principal de este trabajo era testar en *Drosophila* la hipótesis de la acumulación de sustratos como posible causa de la degeneración neuronal observada en mutantes de *parkin*. Tal como hemos visto en Resultados, según el análisis de secuencia, la proteína Septin 4 de *Drosophila* es la ortóloga de SEPT5 y cabría esperar que, también en este organismo, fuera sustrato de Parkin. En este trabajo hemos intentado abordar esta cuestión a través de diferentes vías. Por una parte, hemos analizado la interacción genética entre Septin 4 y Parkin. Mediante este análisis

hemos podido comprobar que la coexpresión de ambos genes en neuronas DA reduce la toxicidad de Septin 4 en estas neuronas, mientras que una reducción de la función de Parkin mediante un alelo mutante del gen, aumenta esta toxicidad. El aumento de la toxicidad de Septin 4, por reducción de la función de *parkin*, se ha confirmado en otros tejidos como el ala y el ojo. Es precisamente en estos tejidos donde se ha comprobado que el uso de diferentes alelos de falta de función de *parkin* produce el mismo efecto, demostrándose así que la interacción detectada es independiente del fondo genético de las líneas utilizadas. Por tanto, estos resultados indican que los niveles de Parkin afectan a la toxicidad de Septin 4 en diferentes tejidos.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante los experimentos de coprecipitación *in vitro*, muestran que las dos proteínas pueden interactuar físicamente, lo que apoyaría la hipótesis de que Septin 4 sea sustrato de Parkin. El hecho de no disponer de un anticuerpo que detecte Septin 4 ha supuesto un obstáculo para demostrar definitivamente si esta proteína es sustrato de Parkin. Dado que las pruebas realizadas con los anticuerpos desarrollados para la proteína SEPT5 humana no nos permiten concluir que sean capaces de detectar a Septin 4 en *Drosophila*, en nuestro laboratorio se están realizando muchos esfuerzos con el objetivo de generar un anticuerpo específico que nos permita detectar esa proteína. La utilización de este anticuerpo en *western blot* nos permitirá saber, entre otras cosas, si los niveles de Septin 4 en cerebros de mutantes del gen *parkin* están aumentados respecto a los niveles en individuos salvajes. También nos ayudará a determinar la localización de la proteína de una forma más precisa en el cerebro, concretamente a saber si se localiza en las neuronas DA, y en otros tejidos.

Otra forma de confirmar que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila* sería demostrar que esa proteína es capaz de ubiquitinar a Septin 4. Para demostrarlo, realizamos un ensayo de ubiquitinación *in vitro* en nuestro laboratorio utilizando estas dos proteínas. Sin embargo, no obtuvimos resultados concluyentes. Recientemente se ha visto, utilizando la misma metodología, que la proteína Parkin de *Drosophila* es capaz de ubiquitinar a dos de las septinas de este organismo, Peanut y Septin 1 (Bae y col., 2007). Considerando que estas dos proteínas tienen menor similitud con SEPT5 que Septin 4, estos resultados sugieren que, probablemente, Parkin también sea capaz de ubiquitinar a Septin 4. A pesar de no haberse demostrado de forma directa esta hipótesis, nuestros resultados la apoyan, y avalan la validez del modelo desarrollado en este trabajo para el estudio de la EP, siendo el primero que utiliza un potencial sustrato de Parkin en este organismo.

## 6. RELACIÓN DE *septin 4* CON OTROS GENES

Como hemos comentado en el punto 4 de la Discusión, los fenotipos de ala y de letalidad obtenidos por la sobreexpresión ubicua de Septin 4, constituyen un punto de partida para analizar posibles interacciones entre *septin 4* y otros genes, así como para identificar genes funcionalmente relacionados. De esta forma, el fenotipo encontrado en ala nos permitió realizar un rastreo piloto con una colección de deficiencias con el fin de encontrar genes que pudieran estar relacionados con Septin 4. La naturaleza de este fenotipo, como se ha descrito en Resultados, no nos permitió identificar aquellas deficiencias que pudieran suprimirlo, de manera que únicamente se seleccionaron aquellas que lo aumentaban. Siguiendo esta metodología, conseguimos identificar diversas regiones autosómicas cuya delección producía un incremento significativo en el fenotipo inicial. Aunque dentro de cada deficiencia existen numerosos genes, los criterios utilizados para seleccionar los genes candidatos permitieron identificar al gen *nedd4* como el gen causante de la interacción observada con dos deficiencias solapantes. Curiosamente, Nedd4 es una E3 proteína-ubiquitina ligasa (Ingham y col., 2004) al igual que Parkin. Además de los dominios de unión a sustratos y de ubiquitinación, Nedd4 contiene un dominio de asociación a membranas (Pickart, 2001; Ingham y col., 2004). Varios estudios han relacionado esta proteína con procesos de endocitosis (Staub y col., 1996; Rotin y col., 2000; Myat y col., 2002; Sakata y col., 2004) y de guía de axones (Myat y col., 2002), de forma que Nedd4 tiene funciones asociadas con el sistema nervioso. Un dato significativo es que, en ala, el incremento de fenotipo producido por la reducción de la función de Nedd4 mediante un alelo dominante negativo es similar al observado con la reducción de la función de Parkin. De manera que Septin 4 podría ser también un sustrato de Nedd4. Por esta razón, sería interesante determinar, en futuros estudios, si la sobreexpresión de la forma salvaje de Nedd4 en neuronas DA es capaz de reducir la toxicidad producida por Septin 4, tal como ocurre con Parkin. Por otra parte, se ha visto que la proteína humana NEDD4, perteneciente a la misma familia que la proteína Nedd4 de *Drosophila*, está implicada en la patogénesis del síndrome de Liddle en humanos (Staub y col., 1997) lo que añade interés al estudio de la interacción genética entre Septin 4 y Nedd4.

En nuestro estudio, no hemos podido identificar más genes relacionados con *septin 4*. Por un lado, la falta de alelos disponibles de algunos de los genes candidatos seleccionados en el rastreo impidió determinar si eran los responsables de la modificación del fenotipo producida por la deficiencia dentro de la cual se incluyen. Sin embargo sería interesante hacer ese experimento en el momento en que se encuentre algún alelo disponible. Por otro lado, de todos aquellos genes que fueron analizados

por la disponibilidad de alelos, no hubo ninguno cuya reducción de función incrementara de una forma clara el fenotipo inicial de alas. Una estrategia adicional para poder determinar cual es el gen responsable de la interacción observada sería realizar acotaciones de las deficiencias seleccionadas, tal como se ha hecho para las deficiencias más grandes, hasta identificar una región pequeña dentro de la cual se encuentre el gen responsable. Otra posibilidad, sería cruzar la línea de sobreexpresión de Septin 4 con todas las inserciones disponibles en la región cubierta por la delección. Además, también sería interesante, ampliar los criterios de selección de candidatos y revisar las deficiencias que interaccionaron en busca de nuevos genes que pudieran estar relacionados con Septin 4 y que no fueron seleccionados inicialmente, como por ejemplo aquellos genes relacionados con el citoesqueleto ya que, como veremos a continuación, mediante otras estrategias experimentales se ha visto que Septin 4 interacciona con algunos genes que codifican proteínas que forman parte del citoesqueleto. Por otra parte, este rastreo nos ha permitido comprobar que con el fenotipo del que partimos se puede obtener un número discreto de interacciones, de manera que podría ser adecuado para la realización de otros rastreos a mayor escala, como hemos comentado en Resultados. Sin embargo, dado que con este fenotipo no hemos podido identificar genes que fueran capaces de atenuar el efecto de la sobreexpresión de Septin 4, sería interesante considerar la utilización de otros fenotipos, como el de letalidad, que puedan ser suprimidos, con el objetivo de encontrar aquellos genes que no han podido ser detectados en nuestro trabajo.

La única información disponible en la bibliografía sobre genes relacionados con Septin 4 procede de un estudio sobre interacciones proteicas, basado en el sistema de doble híbrido de levadura. En este estudio, realizado sobre el proteoma de *Drosophila*, los autores identificaron una serie de genes que codifican proteínas que podrían interaccionar físicamente con Septin 4 (Giot y col., 2003) (Tabla D.2).



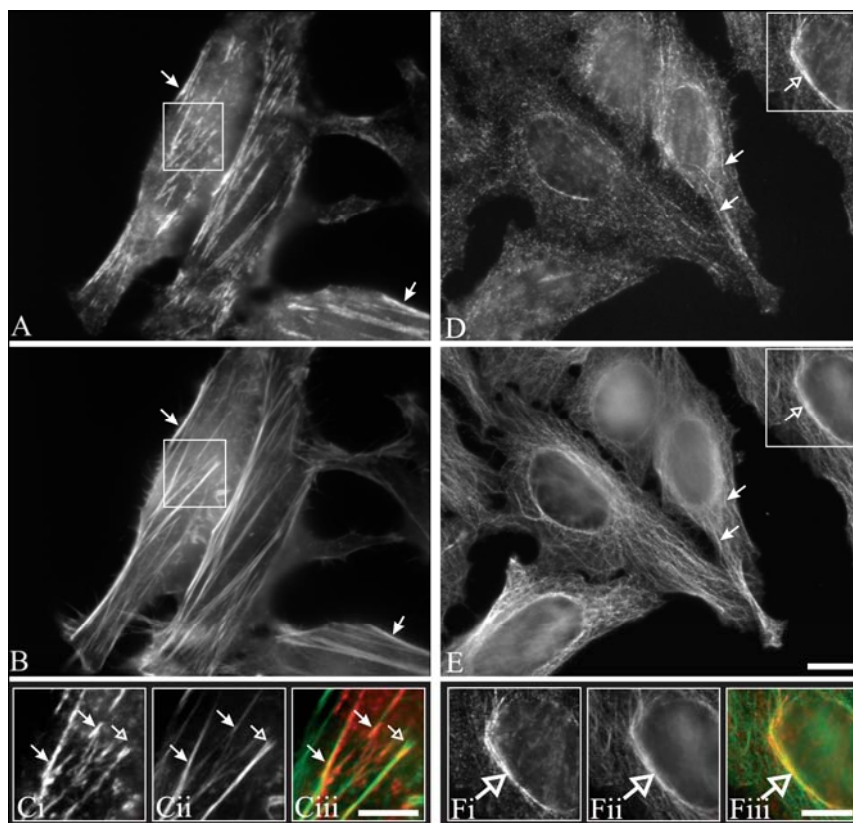
Gen	Localización cromosómica	Posible función y procesos en que está implicado
<i>CG8863</i>	87E8	Choque térmico, unión a proteínas mal plegadas
<i>Grasp65</i>	76D5	Unión a proteínas
<i>CG6416</i>	66D9	Unión a proteínas
<i>septin 2</i>	92F2	Unión a GTP, citocinesis y celularización, constituyente del citoesqueleto
<i>sryalpha</i>	99D3	Unión a actina, formación anillo contráctil, citocinesis
<i>Ady43A</i>	43A1-A2	Adenosina kinasa
<i>Or98b</i>	98C4	Percepción del olor
<i>CG31764</i>	33E3-E4	Respuesta de defensa contra virus
<i>Mbs</i>	72D1	Constituyente del citoesqueleto, organización y biogénesis de los pelos del ala, entre otros procesos

**Tabla D.2. Genes cuyas proteínas podrían interactuar con Septin 4 según un estudio basado en el sistema de dos híbridos de levadura.** La información sobre estos genes se ha extraído de Flybase.

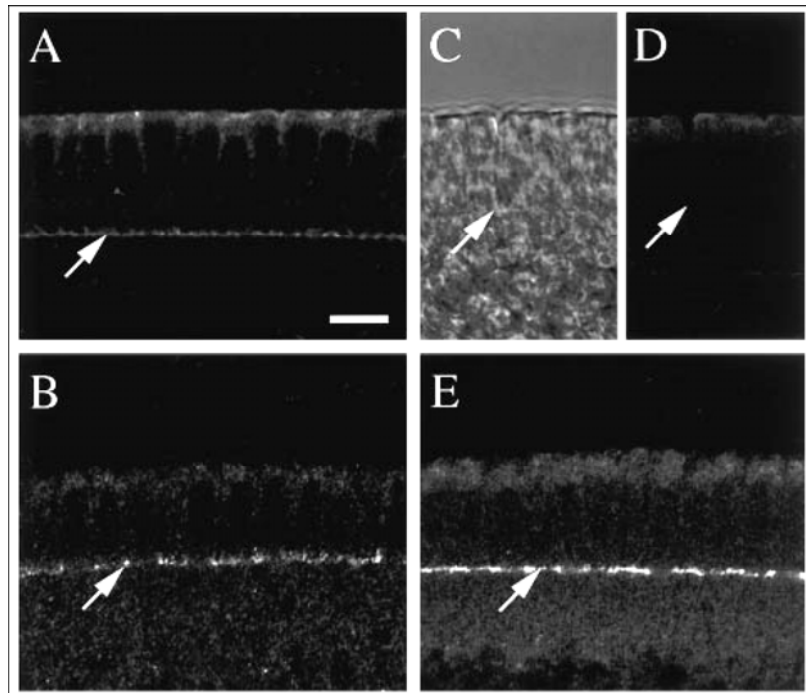
Los genes *Grasp65*, *septin 2*, *Ady43A* y *CG31764* se localizan en las regiones autosómicas delecionadas en algunas de las deficiencias que no interactuaron con la sobreexpresión de Septin 4 (ver tablas R.14 y D.2). Por lo tanto, es posible que la falta de función de estos genes no empeore el fenotipo de sobreexpresión de Septin 4, sino que produzca una supresión de éste (por lo que no habrían sido identificados en nuestro rastreo), o que no lo modifique. Los genes *CG8863*, *CG6416*, *sryalpha* y *Or98b* no se localizan dentro de la región autosómica delecionada en ninguna de las deficiencias ensayadas en el rastreo, de manera que no sabemos el efecto que podría tener su falta de función sobre el fenotipo de sobreexpresión de Septin 4. El gen *Mbs* podría localizarse en la región delecionada en dos de las deficiencias ensayadas y que no interactuaron. Sin embargo, ninguna de las dos deficiencias tiene los límites lo suficientemente definidos como para asegurar que esto sea así. En cualquier caso, sería interesante conseguir alelos de falta y de ganancia de función de todos los genes de la tabla D.2 con el objetivo de conocer cual puede ser su relación con *septin 4*.

Algunos de los genes identificados en el estudio de Giot y colaboradores, codifican proteínas relacionadas con el citoesqueleto, como es el caso de *septin 2*, *sryalpha* y *Mbs*. Dada la relación que presentan algunas septinas con la actina y otros componentes del citoesqueleto (Spiliotis y Nelson, 2006) y (Fig. D.4), sería interesante estudiar en profundidad la relación que estos genes presentan con *septin 4*. La interacción encontrada con Septin 2 resulta especialmente interesante, por ser uno de los miembros de la familia de las septinas en *Drosophila*. Como ya se ha comentado

anteriormente, una de las principales características de las septinas es su capacidad de interactuar entre ellas formando complejos macromoleculares (Field y col., 1996; Blaser y col., 2002; Peng y col., 2002; Martinez y col., 2004; Blaser y col., 2006). De manera que la interacción entre Septin 4 y Septin 2 sugiere que estas dos proteínas podrían formar un complejo en *Drosophila*. Curiosamente, según las bases de datos del BDGP, el gen *septin 2* se expresa en el SNC embrionario al igual que *septin 4*. Como hemos comentado en Resultados, en *Drosophila* existen 5 septinas, entre ellas, Peanut, Septin 1 y Septin 2 se organizan formando un complejo macromolecular (Field y col., 1996). Además, se ha visto que en ausencia de la proteína Peanut, tampoco se detecta Septin 1, sin embargo, Septin 2 se localiza normalmente (Adam y col., 2000) (Fig. D.5). Esto sugiere que Septin 2 podría formar complejos alternativos con otras septinas o que tiene diferentes funciones específicas del tipo celular (Fares y col., 1995; Adam y col., 2000).



**Figura D.4. Colocalización de SEPT9 con los filamentos de actina y con los microtúbulos.** De Surka y col. (2002). Células HeLa marcadas con los anticuerpos anti-SEPT9, A y D, faloidina, B, y anti-tubulina. Las zonas enmarcadas se encuentran ampliadas en los paneles más inferiores, Ci y Fi corresponden a marcajes con anti-SEPT9, Cii y Fii corresponden a marcajes con faloidina y anti-tubulina respectivamente. En las superposiciones, Cii y Fii, SEPT9 aparece en rojo y actina y tubulina en verde. La barra corresponde a 10  $\mu$ m.



**Figura D.5. Localización de Septin 2 pero no Septin 1 en el frente de celularización de embriones *pnut*.** De Adam y col. (2000). (A y B) Embriones salvajes teñidos con anti-Septin 1 (A) y anti-Septin 2 (B). (D y E) Embriones *pnut* teñidos con anti-Septin 1 (C) y anti-Septin 2 (E). (C) Imagen con luz de transmisión de la región mostrada en (D). Las flechas indican el frente de celularización. La barra corresponde a 10  $\mu$ m.

La relación que pueda existir entre *septin 4* y *septin 5* y el resto de septinas no está tan clara. Aunque como hemos visto, Septin 2 y Septin 4 parecen interactuar físicamente (Giot y col., 2003) y podrían estar formando un complejo alternativo al que forma Septin 2 con Septin 1 y Peanut. En mamíferos SEPT2 (homóloga de la proteína Septin 1 de *Drosophila*, ver figura D.1) y SEPT5, también forman parte de un complejo (Beites y col., 1999). El que los ratones deficientes en SEPT5 no presenten ningún fenotipo excepto un aumento en los niveles de SEPT2, hizo pensar que estas septinas podrían tener funciones redundantes, existiendo mecanismos de compensación entre ellas (Peng y col., 2002). En este estudio hemos podido observar que la sobreexpresión de Septin 4 en el SNC embrionario produce alteraciones en la expresión de *septin 1*, la cual desaparece o se reduce en el SNC de algunos embriones (Fig. R.42). Esto podría indicar la existencia de una posible compensación entre estas dos septinas de *Drosophila* y, por tanto, de una posible redundancia de función. Respecto a la relación entre Septin 4 y Peanut, pudimos observar que la falta de función de *peanut* produce también una reducción en la expresión de *septin 4*. La interacción física de Septin 4 con Septin 2 y el hecho de que esta última forme

complejo con Septin 1 y Peanut, sugieren que puede que la relación entre Septin 4 y Septin 1 y Peanut se establezca a través de Septin 2. El hecho que en embriones *pnut* la reducción de la expresión de *septin 4* coincida mayoritariamente con los estadios anteriores al estadio 12 y, sin embargo, se mantenga en los estadios posteriores, podría indicar que a partir de los estadios 11-12 la expresión de *septin 4* sería independiente de *peanut*, mientras Peanut sería necesaria para la expresión de *septin 4* en los estadios previos. Como ya hemos comentado en Resultados, una posibilidad es que la expresión de *septin 4* se reduzca en los primeros estadios porque su proteína no puede formar complejo con Peanut cuando esta proteína no está presente, sin embargo, a partir del estadio 12, Septin 4 podría formar un complejo alternativo con otras septinas, como Septin 2, de manera que mantendría su expresión en los mutantes.

En cualquier caso sería conveniente contrastar estos resultados con la inmunodetección simultánea de las diferentes septinas que hemos analizado y con experimentos de coprecipitación. De esta manera podríamos determinar con más precisión las relaciones entre ellas. Como ya hemos comentado en el apartado anterior, en nuestro laboratorio se están dedicando muchos esfuerzos a la producción de un anticuerpo específico de Septin 4, el cual será muy útil para determinar estas relaciones.

### **7. IMPLICACIÓN DE *septin 4* EN PROCESOS RELACIONADOS CON *parkin***

Como hemos visto, *septin 4* y *parkin* interaccionan genéticamente y uno de los objetivos de este trabajo era la caracterización de la relación entre estos dos genes en *Drosophila*. Por esta razón era interesante determinar si *septin 4* podría estar participando en alguno de los procesos en los que está implicado *parkin*.

Mediante diferentes estudios con mutantes del gen *parkin*, se ha visto que, en *Drosophila*, Parkin podría estar relacionada tanto con la respuesta al estrés oxidativo (Greene y col., 2005; Whitworth y col., 2005) como con la activación de la ruta JNK (Cha y col., 2005). Tal y como hemos visto en los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la falta de función del enzima GstS1, que en mutantes del gen *parkin* producía un empeoramiento de la neurodegeneración observada en estos mutantes (Greene y col., 2005; Whitworth y col., 2005), no tiene ningún efecto sobre el fenotipo de ala producido por la sobreexpresión de Septin 4. Esto sugiere que, probablemente, la interacción entre Septin 4 y Parkin se produzca en un contexto o ruta diferente a la que actúa el enzima GstS1, y por tanto el papel de Septin 4 no estaría relacionado con

procesos de respuesta al estrés oxidativo. Aunque sería interesante analizar el efecto de la falta de función del gen *GstS1* sobre la toxicidad de Septin 4 en las neuronas DA, las cuales parecen ser susceptibles a este tipo de estrés.

Por otra parte, se ha sugerido que la activación de la ruta JNK observada en las neuronas DA de mutantes del gen *parkin* (ver Fig. 1.11D-F), podría estar inducida directamente por la falta de Parkin. Sin embargo, no se descarta que la acumulación de sustratos esté jugando un papel en esta activación (Cha y col., 2005). Respecto a esto, nuestro modelo ofrecía una interesante posibilidad de estudio de esta hipótesis. Si la activación de la ruta estuviera relacionada con la acumulación de los sustratos de Parkin, entonces la sobreexpresión de Septin 4 en las neuronas DA sería capaz de activar también la ruta. Por esta razón nos propusimos analizar la presencia de la forma activada de la JNK de *Drosophila*, codificada por el gen *basket* (Sluss y col., 1996), en neuronas DA que sobreexpresaban Septin 4. Desgraciadamente, no conseguimos detectar esta forma ni siquiera en controles positivos como los mutantes del gen *parkin*, o en individuos que sobreexpresaban algunos componentes de la ruta JNK en estas neuronas y, por tanto, no pudimos confirmar esa hipótesis. Otra posibilidad interesante era utilizar el fenotipo de ala obtenido al sobreexpresar Septin 4 con *da-GAL4* para analizar una posible relación con esta ruta. Curiosamente, comprobamos que la sobreexpresión ubicua de la forma salvaje de Basket ( $Bsk^{wt}$ ) produce un fenotipo de alas, que presentan pliegues, malformaciones y tejido ectópico. Este fenotipo recuerda al obtenido con la sobreexpresión de Septin 4 con la misma línea GAL4, aunque en el caso de Bsk el fenotipo es más acusado. Sin embargo, el hecho de que la sobreexpresión de ambas proteínas genere un fenotipo similar dificulta el análisis de una posible interacción, ya que un aumento del fenotipo podría explicarse simplemente como una suma de los fenotipos independientes. Por otro lado, la sobreexpresión de una forma dominante negativa de Basket ( $Bsk^{DN}$ ) con *da-GAL4* resultó letal en embriones de manera que no se pudo utilizar para analizar una posible interacción. A pesar de ello, el hecho de que, la sobreexpresión tanto de Septin 4 como de  $Bsk^{wt}$  tenga un efecto similar, podría indicar una posible relación entre la acumulación de sustratos de Parkin y la ruta JNK.

Además de esto, se ha encontrado una relación entre los genes *parkin* y *pink1* de *Drosophila* (Clark y col., 2006; Yang y col., 2006). Como hemos comentado en la Introducción, la inactivación de *pink1*, cuyo homólogo humano está implicado en la EP (Valente y col., 2004), mediante interferencia del ARN, reproduce los fenotipos observados en los mutantes del gen *parkin* (Yang y col., 2006) y además, estos dos genes interaccionan genéticamente (Clark y col., 2006). Por esta razón hubiera sido interesante ensayar si existe alguna relación entre *pink1* y *septin 4*, por ejemplo

mediante interacción con el fenotipo de ala producido por la sobreexpresión de Septin 4. Desafortunadamente, no pudimos conseguir las moscas que producen la interferencia del ARN de *pink1*. Otra posibilidad hubiera sido utilizar un alelo de falta de función generado por la inserción de un elemento P o una deficiencia que comprendiera la región cromosómica en la que se localiza este gen. Sin embargo, no existe ninguna inserción que lo afecte, ni ninguna deficiencia con los límites lo suficientemente definidos como para asegurar que incluye a *pink1*. Por esta razón no pudimos ensayar una posible interacción entre Septin 4 y Pink1, aunque sería muy interesante realizar este ensayo si en el futuro se pudiera conseguir algún alelo de falta de función de ese gen.

### **8. RELACIÓN DE LA TOXICIDAD DE SEPTIN 4 CON LOS NIVELES DE DOPAMINA**

En los últimos años existe un interés creciente en la utilización de modelos de enfermedades desarrollados en *Drosophila* para analizar el efecto de diferentes compuestos sobre el fenotipo de las moscas que reproducen aspectos de la enfermedad (Pendleton y col., 2002; Auluck y col., 2005; Jaklevic y col., 2006; Stilwell y col., 2006), incluyendo la identificación de moléculas modificadoras mediante rastreos a gran escala (Jaklevic y col., 2006).

En ratón, la neurodegeneración producida por la sobreexpresión de SEPT5 es dependiente de los niveles de dopamina (Dong y col., 2003). Según los resultados del trabajo, la reducción de los niveles de dopamina previene la neurodegeneración observada en estos ratones, sugiriendo que SEPT5 actuaría inhibiendo la liberación de dopamina (Beites y col., 1999), que se acumularía en la célula generando especies tóxicas. Dada la homología existente entre Septin 4 y SEPT5, pensamos que los niveles de dopamina en *Drosophila* podrían tener un efecto similar en los fenotipos producidos por sobreexpresión de Septin 4. En nuestro caso, la sobreexpresión de Septin 4 con la línea *act-GAL4* produce un fenotipo de letalidad parcial. Este fenotipo tiene la ventaja de permitir determinar, de una forma sencilla, el efecto de diferentes compuestos sobre la toxicidad de Septin 4. Sin embargo, no sabemos cual es la causa de dicha letalidad. Una posibilidad es que esta sobreexpresión ubicua esté afectando a las neuronas DA, cuya pérdida produciría la muerte de algunos individuos. Si esto fuera así, los niveles de dopamina podrían influir en esa letalidad. Por ello, utilizamos este fenotipo para analizar el efecto de un aumento de los niveles de dopamina mediante la administración de L-dopa. Con este análisis hemos podido comprobar que



el aumento de estos niveles no afecta de forma significativa a la letalidad producida por la sobreexpresión ubicua de Septin 4. En este contexto, sería interesante ensayar el efecto de la administración de otros compuestos relacionados con la producción de dopamina, como por ejemplo el AMPT ( $\alpha$ -metil-DL-tirosina), un compuesto que inhibe específicamente la actividad de la tirosina hidroxilasa, produciendo un descenso en los niveles de dopamina (ver Fig. R.38). El resultado de este ensayo podría complementar los resultados obtenidos con L-dopa y ayudarnos en su interpretación. Por el momento, los resultados obtenidos parecen indicar que las neuronas DA no se ven afectadas en estos individuos, y sugieren que la letalidad sea consecuencia de la toxicidad de Septin 4 en otro u otros tejidos. Sería interesante determinar en futuros estudios porque se produce esta letalidad, ya que podría dar alguna pista sobre la función de Septin 4 en *Drosophila*. Sin embargo, hay que destacar que los individuos analizados son los “escapers” y no sabemos si en los individuos que mueren existe alguna alteración en estas neuronas.

Por otro lado, aunque la administración de L-dopa no modifique la letalidad producida por la sobreexpresión de Septin 4, este fenotipo puede suponer un punto de partida para el análisis de otros compuestos utilizados en el tratamiento de la EP (ver Leung y Mok, 2005, como revisión) como los agonistas de la dopamina, que actúan directamente y de forma selectiva sobre grupos de receptores concretos de la dopamina, evitando posibles efectos secundarios. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran por ejemplo, la pergolida y la bromocriptina, de manera que sería interesante analizar su efecto sobre el fenotipo de letalidad producido por la sobreexpresión ubicua de Septin 4. Además también sería interesante utilizar este fenotipo para ensayar el efecto de otros fármacos y compuestos no utilizados hasta el momento en el tratamiento de la EP, como vía para la identificación de moléculas con potencial terapéutico en esta enfermedad.



*Conclusiones*

Una vez analizados los resultados de este trabajo hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los análisis a nivel de secuencia proteica indican que el gen *CG9699* o *septin 4* de *Drosophila* es el ortólogo del gen *SEPT5* humano. Estos análisis también muestran que este gen está triplicado en mamíferos. Además, dos de los ortólogos de *septin 4* en humanos, *SEPT4* y *SEPT5*, están relacionados con la EP.

2. La expresión de *septin 4*, tanto en embriones como en adultos, sugiere que este gen desempeña su función fundamentalmente en el SNC y que, concretamente, esta función podría desarrollarse en algunos *clusters* de neuronas DA de la mosca. Asimismo, *septin 4* podría tener algún papel en desarrollo y/o funcionamiento de otros tejidos como el corazón.

3. La sobreexpresión de Septin 4 es tóxica para las neuronas DA del *cluster* DM del cerebro adulto de *Drosophila*. Esta toxicidad es dependiente de la edad y no afecta a la longevidad ni a la capacidad motora de las moscas que sobreexpresan Septin 4. El que la sobreexpresión de *SEPT5* en las neuronas DA de *Drosophila*, produzca una toxicidad similar a la observada con Septin 4, sugiere que ambas proteínas tienen homología funcional.

4. Los defectos observados en ala al sobreexpresar de forma ubicua Septin 4 indican que esta proteína podría tener alguna función en el correcto desarrollo de este tejido. Esta función podría estar relacionada con la proteína Mbs, también implicada en el desarrollo del ala, y con otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto.

5. La toxicidad de Septin 4 en neuronas DA, ojo y ala, es dependiente de los niveles de Parkin. Además, estas dos proteínas son capaces de interactuar *in vitro*. Estos resultados sugieren que Septin 4 es un sustrato de Parkin en *Drosophila* y apoyan la hipótesis de que la acumulación de sustratos de Parkin podría ser la causa de la degeneración de neuronas DA observada en mutantes de este gen.

6. Los resultados obtenidos en el rastreo sugieren que el fenotipo utilizado podría ser válido para la realización de otro tipo de rastreos a mayor escala. Además, las interacciones observadas en otros estudios sugieren que en estos rastreos podrían identificarse interacciones con otros genes relacionados con el citoesqueleto, que no se han detectado en nuestro rastreo debido a la restricción de criterios de selección de candidatos.

7. La interacción genética identificada entre *septin 4* y *nedd4* en el rastreo realizado muestra que estos dos genes podrían estar relacionados funcionalmente. Dado que *nedd4* codifica una E3 proteína-ubiquitina ligasa, esta interacción podría indicar que Septin 4 es un sustrato de Nedd4.

## *Conclusiones*

---

8. Nuestros resultados sugieren que Septin 4 y Septin 1 podrían tener funciones redundantes y presentar mecanismos de compensación. Además, Septin 4 podría formar complejo con Peanut en los primeros estadios del desarrollo embrionario.

9. El análisis de la administración de L-dopa sobre el fenotipo de letalidad parcial causado por la sobreexpresión ubicua de Septin 4 con la línea *act-GAL4*, así como de las neuronas DA de los individuos supervivientes, no nos permite concluir si esta letalidad está relacionada con estas neuronas o, alternativamente, se debe a la toxicidad de Septin 4 en otros tejidos.

*Bibliografía*

- Adam, J.C., Pringle, J.R. y Peifer, M. (2000) Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. *Mol Biol Cell.* **11**, 3123-3135.
- Adams, M.D., y col. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* **287**, 2185-2195.
- Aguilera, M., Oliveros, M., Martinez-Padron, M., Barbas, J.A. y Ferrus, A. (2000) Ariadne-1: a vital *Drosophila* gene is required in development and defines a new conserved family of ring-finger proteins. *Genetics.* **155**, 1231-1244.
- Ahuja, P., Perriard, E., Trimble, W., Perriard, J.C. y Ehler, E. (2006) Probing the role of septins in cardiomyocytes. *Exp Cell Res.* **312**, 1598-1609.
- Ardley, H.C. y Robinson, P.A. (2004) The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis.* **1**, 71-87.
- Auluck, P.K., Chan, H.Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. y Bonini, N.M. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science.* **295**, 865-868.
- Auluck, P.K., Meulener, M.C. y Bonini, N.M. (2005) Mechanisms of Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity by Geldanamycin in *Drosophila*. *J Biol Chem.* **280**, 2873-2878.
- Bae, Y.J., Kang, S.J. y Park, K.S. (2007) *Drosophila melanogaster* Parkin ubiquitinates peanut and septin1 as an E3 ubiquitin-protein ligase. *Insect Biochem Mol Biol.* **37**, 430-439.
- Bagatell, R., Paine-Murrieta, G.D., Taylor, C.W., Pulcini, E.J., Akinaga, S., Benjamin, I.J. y Whitesell, L. (2000) Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin Cancer Res.* **6**, 3312-3318.
- Beites, C.L., Xie, H., Bowser, R. y Trimble, W.S. (1999) The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci.* **2**, 434-439.
- Beites, C.L., Campbell, K.A. y Trimble, W.S. (2005) The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem J.* **385**, 347-353.
- Blaser, S., Jersch, K., Hainmann, I., Wunderle, D., Zgaga-Griesz, A., Busse, A. y Zieger, B. (2002) Human septin-septin interaction: CDCrel-1 partners with KIAA0202. *FEBS Lett.* **519**, 169-172.
- Blaser, S., y col. (2006) Human endothelial cell septins: SEPT11 is an interaction partner of SEPT5. *J Pathol.* **210**, 103-110.
- Bodmer, R. y Venkatesh, T.V. (1998) Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev Genet.* **22**, 181-186.

- Bonifati, V., y col. (2003) *DJ-1(PARK7)*, a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* **24**, 159-160.
- Brand, A.H. y Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* **118**, 401-415.
- Brown, T.P., Rumsby, P.C., Capleton, A.C., Rushton, L. y Levy, L.S. (2006) Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect.* **114**, 156-164.
- Budnik, V. y White, K. (1988) Catecholamine-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: distribution and development. *J Comp Neurol.* **268**, 400-413.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G. (1996) Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science.* **274**, 252-255.
- Caltagarone, J., Rhodes, J., Honer, W.G. y Bowser, R. (1998) Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport.* **9**, 2907-2912.
- Cauchi, R.J. y van den Heuvel, M. (2006) The fly as a model for neurodegenerative diseases: is it worth the jump? *Neurodegener Dis.* **3**, 338-356.
- Celotto, A.M., Frank, A.C., Seigle, J.L. y Palladino, M.J. (2006) *Drosophila* model of human inherited triosephosphate isomerase deficiency glycolytic enzymopathy. *Genetics.* **174**, 1237-1246.
- Cha, G.H., Kim, S., Park, J., Lee, E., Kim, M., Lee, S.B., Kim, J.M., Chung, J. y Cho, K.S. (2005) Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 10345-10350.
- Chavous, D.A., Jackson, F.R. y O'Connor, C.M. (2001) Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 14814-14818.
- Choi, P., y col. (2003) SEPT5\_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res.* **117**, 179-189.
- Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L. y Dawson, T.M. (2001) Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med.* **7**, 1144-1150.
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J.* **17**, 7151-7160.
- Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A. y Guo, M. (2006) *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with *parkin*. *Nature.* **441**, 1162-1166.

- Cohen, G. (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*. **5**, 77-82.
- Corti, O., y col. (2003) The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*. **12**, 1427-1437.
- Cripps, R.M. y Olson, E.N. (2002) Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev Biol*. **246**, 14-28.
- Dauer, W. y Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. **39**, 889-909.
- Dong, Z., Ferger, B., Paterna, J.C., Vogel, D., Furler, S., Osinde, M., Feldon, J. y Bueler, H. (2003) Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 12438-12443.
- Dunn, R. y Hicke, L. (2001) Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem*. **276**, 25974-25981.
- Dziewczapolski, G., Murer, G., Agid, Y., Gershanik, O. y Raisman-Vozari, R. (1997) Absence of neurotoxicity of chronic L-DOPA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroreport*. **8**, 975-979.
- Engelender, S., y col. (1999) Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet*. **22**, 110-114.
- Fares, H., Peifer, M. y Pringle, J.R. (1995) Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Mol Biol Cell*. **6**, 1843-1859.
- Feany, M.B. y Bender, W.W. (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*. **404**, 394-398.
- Fernandez-Funez, P., y col. (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*. **408**, 101-106.
- Field, C.M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M.L., Alberts, B. y Mitchison, T.J. (1996) A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Biol*. **133**, 605-616.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. y Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**, 806-811.
- Fjose, A., McGinnis, W.J. y Gehring, W.J. (1985) Isolation of a homoeo box-containing gene from the engrailed region of *Drosophila* and the spatial distribution of its transcripts. *Nature*. **313**, 284-289.
- Forno, L.S. (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **55**, 259-272.



- Frazier, J.A., Wong, M.L., Longtine, M.S., Pringle, J.R., Mann, M., Mitchison, T.J. y Field, C. (1998) Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J Cell Biol.* **143**, 737-749.
- Friggi-Grelín, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J. y Birman, S. (2003) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol.* **54**, 618-627.
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S. y Obata, F. (2002) A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol.* **51**, 296-301.
- Gandhi, S. y Wood, N.W. (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* **14**, 2749-2755.
- Gasser, T., Muller-Myhsok, B., Wszolek, Z.K., Oehlmann, R., Calne, D.B., Bonifati, V., Bereznaï, B., Fabrizio, E., Vieregge, P. y Horstmann, R.D. (1998) A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet.* **18**, 262-265.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q. y Lee, V.M. (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science.* **290**, 985-989.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I. y Furia, M. (2002) RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **160**, 637-648.
- Giot, L., y col. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science.* **302**, 1727-1736.
- Glickman, M.H. y Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428.
- Gnerer, J.P., Kreber, R.A. y Ganetzky, B. (2006) Wasted away, a *Drosophila* mutation in triosephosphate isomerase, causes paralysis, neurodegeneration, and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 14987-14993.
- Goldberg, M.S., y col. (2003) Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem.* **278**, 43628-43635.
- Goldstein, L.S. y Gunawardena, S. (2000) Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome. *J Cell Biol.* **150**, F63-68.
- Greene, J.C., Whitworth, A.J., Kuo, I., Andrews, L.A., Feany, M.B. y Pallanck, L.J. (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 4078-4083.

- Greene, J.C., Whitworth, A.J., Andrews, L.A., Parker, T.J. y Pallanck, L.J. (2005) Genetic and genomic studies of *Drosophila parkin* mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet.* **14**, 799-811.
- Gustafson, K. y Boulianne, G.L. (1996) Distinct expression patterns detected within individual tissues by the GAL4 enhancer trap technique. *Genome.* **39**, 174-182.
- Hall, P.A., Jung, K., Hillan, K.J. y Russell, S.E. (2005) Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol.* **206**, 269-278.
- Halliwell, B. (1989) Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand Suppl.* **126**, 23-33.
- Hartwell, L.H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res.* **69**, 265-276.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. y Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **45**, 51-88.
- Haywood, A.F. y Staveley, B.E. (2004) Parkin counteracts symptoms in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* **5**, 14.
- Hicks, A.A., y col. (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* **52**, 549-555.
- Hoffman, J.I. (1995) Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol.* **16**, 155-165.
- Hoffman, J.I., Kaplan, S. y Liberthson, R.R. (2004) Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J.* **147**, 425-439.
- Honer, W.G., Hu, L. y Davies, P. (1993) Human synaptic proteins with a heterogeneous distribution in cerebellum and visual cortex. *Brain Res.* **609**, 9-20.
- Ihara, M., Tomimoto, H., Kitayama, H., Morioka, Y., Akiguchi, I., Shibasaki, H., Noda, M. y Kinoshita, M. (2003) Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J Biol Chem.* **278**, 24095-24102.
- Ihara, M., y col. (2007) Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron.* **53**, 519-533.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. y Takahashi, R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell.* **105**, 891-902.

- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I. y Takahashi, R. (2002) CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*. **10**, 55-67.
- Ingham, R.J., Gish, G. y Pawson, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*. **23**, 1972-1984.
- Itier, J.M., y col. (2003) Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*. **12**, 2277-2291.
- Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M. y Sobue, G. (2003) Dofrin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem*. **278**, 29106-29114.
- Jaklevic, B., Uyetake, L., Lemstra, W., Chang, J., Leary, W., Edwards, A., Vidwans, S., Sibon, O. y Tin Su, T. (2006) Contribution of growth and cell cycle checkpoints to radiation survival in *Drosophila*. *Genetics*. **174**, 1963-1972.
- Kai, T., Williams, D. y Spradling, A.C. (2005) The expression profile of purified *Drosophila* germline stem cells. *Dev Biol*. **283**, 486-502.
- Kartmann, B. y Roth, D. (2001) Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci*. **114**, 839-844.
- Kassis, J.A., Noll, E., VanSickle, E.P., Odenwald, W.F. y Perrimon, N. (1992) Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 1919-1923.
- Kim, R.H., y col. (2005) DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. **7**, 263-273.
- Kinoshita, A., Noda, M. y Kinoshita, M. (2000) Differential localization of septins in the mouse brain. *J Comp Neurol*. **428**, 223-239.
- Kinoshita, M. (2003) The septins. *Genome Biol*. **4**, 236.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. y Shimizu, N. (1998) Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. **392**, 605-608.
- Klein, C. y Schlossmacher, M.G. (2006) The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol*. **2**, 136-146.
- Ko, H.S., y col. (2005) Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J Neurosci*. **25**, 7968-7978.
- Koonin, E.V. (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet*. **39**, 309-338.

- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. y Simon, M. (1985) The *engrailed* locus of *Drosophila*: *in situ* localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell*. **40**, 45-53.
- Lavara-Culebras, E. y Paricio, N. (2007) *Drosophila* DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene*. **400**, 158-165.
- Le, W.D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S.H., Smith, R.G. y Vassilatis, D.K. (2003) Mutations in *NR4A2* associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet*. **33**, 85-89.
- Lee, A. y Treisman, J.E. (2004) Excessive Myosin activity in mbs mutants causes photoreceptor movement out of the *Drosophila* eye disc epithelium. *Mol Biol Cell*. **15**, 3285-3295.
- Lee, W.C., Yoshihara, M. y Littleton, J.T. (2004) Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 3224-3229.
- Leroy, E., y col. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. **395**, 451-452.
- Leung, H. y Mok, V. (2005) Parkinson's disease: aetiology, diagnosis, and management. *Hong Kong Med J*. **11**, 476-489.
- Li, H., Chaney, S., Roberts, I.J., Forte, M. y Hirsh, J. (2000) Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*. **10**, 211-214.
- Llorens, J.V., Navarro, J.A., Martínez-Sebastian, M.J., Baylies, M.K., Schneuwly, S., Botella, J.A. y Molto, M.D. (2007) Causative role of oxidative stress in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. *Faseb J*. **21**, 333-344.
- Longtine, M.S., DeMarini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C. y Pringle, J.R. (1996) The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol*. **8**, 106-119.
- Lundell, M.J. y Hirsh, J. (1994) Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the *Drosophila* CNS. *Dev Biol*. **165**, 385-396.
- Marin, I. y Ferrus, A. (2002) Comparative genomics of the RBR family, including the Parkinson's disease-related gene parkin and the genes of the ariadne subfamily. *Mol Biol Evol*. **19**, 2039-2050.
- Martinez, C., Sanjuan, M.A., Dent, J.A., Karlsson, L. y Ware, J. (2004) Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochem J*. **382**, 783-791.

- Martinez, C. y Ware, J. (2004) Mammalian septin function in hemostasis and beyond. *Exp Biol Med (Maywood)*. **229**, 1111-1119.
- Marx, F.P., y col. (2003) Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. **12**, 1223-1231.
- Megonigal, M.D., Rappaport, E.F., Jones, D.H., Williams, T.M., Lovett, B.D., Kelly, K.M., Lerou, P.H., Moulton, T., Budarf, M.L. y Felix, C.A. (1998) t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 6413-6418.
- Menzies, F.M., Yenissetti, S.C. y Min, K.T. (2005) Roles of *Drosophila* DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol*. **15**, 1578-1582.
- Meulener, M.C., Graves, C.L., Sampathu, D.M., Armstrong-Gold, C.E., Bonini, N.M. y Giasson, B.I. (2005) DJ-1 is present in a large molecular complex in human brain tissue and interacts with alpha-synuclein. *J Neurochem*. **93**, 1524-1532.
- Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T. y Tanaka, K. (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. **14**, 477-482.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L. y Dawson, T.M. (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*. **28**, 57-87.
- Morett, E. y Bork, P. (1999) A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem Sci*. **24**, 229-231.
- Murer, M.G., Dziejczapolski, G., Menalled, L.B., Garcia, M.C., Agid, Y., Gershanik, O. y Raisman-Vozari, R. (1998) Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann Neurol*. **43**, 561-575.
- Myat, A., Henry, P., McCabe, V., Flintoft, L., Rotin, D. y Tear, G. (2002) *Drosophila* Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the roundabout receptor. *Neuron*. **35**, 447-459.
- Nagano, Y., Yamashita, H., Takahashi, T., Kishida, S., Nakamura, T., Iseki, E., Hattori, N., Mizuno, Y., Kikuchi, A. y Matsumoto, M. (2003) Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of synphilin-1. *J Biol Chem*. **278**, 51504-51514.
- Nagatsu, T. (1997) Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci Res*. **29**, 99-111.
- Newsome, T.P., Asling, B. y Dickson, B.J. (2000) Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development*. **127**, 851-860.

- Nguyen, T.Q., Sawa, H., Okano, H. y White, J.G. (2000) The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J Cell Sci.* **113 Pt 21**, 3825-3837.
- Ocorr, K., Akasaka, T. y Bodmer, R. (2007) Age-related cardiac disease model of *Drosophila*. *Mech Ageing Dev.* **128**, 112-116.
- Osaka, M., Rowley, J.D. y Zeleznik-Le, N.J. (1999) MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 6428-6433.
- Paisan-Ruiz, C., y col. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause *PARK8*-linked Parkinson's disease. *Neuron.* **44**, 595-600.
- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J. y Shen, J. (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem.* **279**, 18614-18622.
- Pan, F., Malmberg, R.L. y Momany, M. (2007) Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol.* **7**, 103.
- Pankratz, N., Nichols, W.C., Uniacke, S.K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P.M. y Foroud, T. (2003) Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet.* **72**, 1053-1057.
- Pardo, B., Mena, M.A., Casarejos, M.J., Paino, C.L. y De Yébenes, J.G. (1995) Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res.* **682**, 133-143.
- Park, J., Kim, S.Y., Cha, G.H., Lee, S.B., Kim, S. y Chung, J. (2005) *Drosophila DJ-1* mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene.* **361**, 133-139.
- Parkinson, J. (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* **14**, 223-236; discussion 222.
- Pendleton, R.G., Parvez, F., Sayed, M. y Hillman, R. (2002) Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Pharmacol Exp Ther.* **300**, 91-96.
- Peng, X.R., Jia, Z., Zhang, Y., Ware, J. y Trimble, W.S. (2002) The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Mol Cell Biol.* **22**, 378-387.
- Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Harding, M., Bellen, H. y Mardon, G. (2004) *Drosophila parkin* mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development.* **131**, 2183-2194.



- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* **70**, 503-533.
- Polymeropoulos, M.H., y col. (1997) Mutation in the *alpha-synuclein* gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* **276**, 2045-2047.
- Reinstein, E. y Ciechanover, A. (2006) Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med.* **145**, 676-684.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. y Bier, E. (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**, 1114-1125.
- Ren, N., Zhu, C., Lee, H. y Adler, P.N. (2005) Gene expression during *Drosophila* wing morphogenesis and differentiation. *Genetics.* **171**, 625-638.
- Ren, Y., Zhao, J. y Feng, J. (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci.* **23**, 3316-3324.
- Rotin, D., Staub, O. y Haguenaer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol.* **176**, 1-17.
- Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K. y Hayashi, S. (2004) *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol.* **14**, 2228-2236.
- Sambrook, J.R., David W (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez, D., Lopez-Arias, B., Torroja, L., Canal, I., Wang, X., Bastiani, M.J. y Ganfornina, M.D. (2006) Loss of glial *lazarillo*, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol.* **16**, 680-686.
- Sandy, M.S., Armstrong, M., Tanner, C.M., Daly, A.K., Di Monte, D.A., Langston, J.W. y Idle, J.R. (1996) CYP2D6 allelic frequencies in young-onset Parkinson's disease. *Neurology.* **47**, 225-230.
- Sanson, B., White, P. y Vincent, J.P. (1996) Uncoupling cadherin-based adhesion from *wingless* signalling in *Drosophila*. *Nature.* **383**, 627-630.
- Shih, H.P., Hales, K.G., Pringle, J.R. y Peifer, M. (2002) Identification of septin-interacting proteins and characterization of the Smt3/SUMO-conjugation system in *Drosophila*. *J Cell Sci.* **115**, 1259-1271.
- Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S. y Selkoe, D.J. (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science.* **293**, 263-269.



- Singh, S.P., Coronella, J.A., Benes, H., Cochrane, B.J. y Zimniak, P. (2001) Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur J Biochem.* **268**, 2912-2923.
- Sluss, H.K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R.J. y Ip, Y.T. (1996) A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* **10**, 2745-2758.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. y Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* **362**, 318-324.
- Son, J.H., y col. (2005) Neurotoxicity and behavioral deficits associated with Septin 5 accumulation in dopaminergic neurons. *J Neurochem.* **94**, 1040-1053.
- Spiliotis, E.T. y Nelson, W.J. (2006) Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci.* **119**, 4-10.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. y Goedert, M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 6469-6473.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J. y Rotin, D. (1996) WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *Embo J.* **15**, 2371-2380.
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. y Rotin, D. (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J.* **16**, 6325-6336.
- Stilwell, G.E., Saraswati, S., Littleton, J.T. y Chouinard, S.W. (2006) Development of a *Drosophila* seizure model for in vivo high-throughput drug screening. *Eur J Neurosci.* **24**, 2211-2222.
- Surka, M.C., Tsang, C.W. y Trimble, W.S. (2002) The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol Biol Cell.* **13**, 3532-3545.
- Tautz, D. y Pfeifle, C. (1989) A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma.* **98**, 81-85.
- Tickoo, S. y Russell, S. (2002) *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol.* **2**, 555-560.
- Toba, G., Ohsako, T., Miyata, N., Ohtsuka, T., Seong, K.H. y Aigaki, T. (1999) The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **151**, 725-737.

- Tomlinson, A. y Ready, D.F. (1987) Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev Biol.* **120**, 366-376.
- Valente, E.M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A.E., Caputo, V., Romito, L., Albanese, A., Dallapiccola, B. y Bentivoglio, A.R. (2004) *PINK1* mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* **56**, 336-341.
- van der Reijden, B.A., Erpelinck-Verschueren, C.A., Lowenberg, B. y Jansen, J.H. (1999) TRIADs: a new class of proteins with a novel cysteine-rich signature. *Protein Sci.* **8**, 1557-1561.
- Vidal, M. y Cagan, R.L. (2006) *Drosophila* models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev.* **16**, 10-16.
- Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J.M., Lim, K.L., Sasaki, M., Hess, E.J., Dawson, V.L. y Dawson, T.M. (2004) Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 10744-10749.
- Walkinshaw, G. y Waters, C.M. (1995) Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest.* **95**, 2458-2464.
- Wessells, R.J. y Bodmer, R. (2007) Age-related cardiac deterioration: insights from *Drosophila*. *Front Biosci.* **12**, 39-48.
- Whitworth, A.J., Theodore, D.A., Greene, J.C., Benes, H., Wes, P.D. y Pallanck, L.J. (2005) Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 8024-8029.
- Whitworth, A.J., Wes, P.D. y Pallanck, L.J. (2006) *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov Today.* **11**, 119-126.
- Wolf, M.J., Amrein, H., Izatt, J.A., Choma, M.A., Reedy, M.C. y Rockman, H.A. (2006) *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 1394-1399.
- Wolff, T. (2000) Histological techniques for the *Drosophila* eye Part II: Adult. In *Drosophila Protocols*. Sullivan, W., Ashburner, M., Hawley, R. S. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 229-243.
- Yagi, M., Zieger, B., Roth, G.J. y Ware, J. (1998) Structure and expression of the human septin gene *HCDCREL-1*. *Gene.* **212**, 229-236.
- Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R. y Lu, B. (2003) Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron.* **37**, 911-924.

- Yang, Y., y col. (2005) Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 13670-13675.
- Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H. y Lu, B. (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 10793-10798.
- Zaffran, S. y Frasch, M. (2002) Early signals in cardiac development. *Circ Res.* **91**, 457-469.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L. y Dawson, T.M. (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 13354-13359.
- Zieger, B., Hashimoto, Y. y Ware, J. (1997) Alternative expression of platelet glycoprotein Ib(beta) mRNA from an adjacent 5' gene with an imperfect polyadenylation signal sequence. *J Clin Invest.* **99**, 520-525.
- Zieger, B., Tran, H., Hainmann, I., Wunderle, D., Zgaga-Griesz, A., Blaser, S. y Ware, J. (2000) Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. *Gene.* **261**, 197-203.