

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES
FUNCIONALES DEL GEN FRATAXIN HOMOLOGUE (FH)
EN DROSOPHILA

JUAN ANTONIO NAVARRO LANGA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de Desembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D^a. Rosa de Frutos Illán
- D^a. Núria Paricio Ortiz
- D. José Antonio Botella Muñoz
- D. Francesc Palau Martínez
- D. Víctor Volpini Bertrán

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Dolores Moltó Ruiz

©Copyright: Servei de Publicacions
Juan Antonio Navarro Langa

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6470-8

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



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Departament de Genètica

Obtención y caracterización de
mutantes funcionales del gen *frataxin*
homologue (fh) en *Drosophila*

TESIS DOCTORAL
Juan Antonio Navarro Langa
2005

VNIVERSITATIS VALÈNCIA  Facultat de Química

D^a María Dolores Moltó Ruiz, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia y D^a María José Martínez Sebastián, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación recogido en esta memoria y que lleva por título “Obtención y caracterización de mutantes funcionales del gen *frataxin homologue (fh)* en *Drosophila*”, ha sido realizado bajo su codirección en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, por D. Juan Antonio Navarro Langa, Licenciado en Ciencias Químicas, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia, y

AUTORIZAN:

Su presentación en la Facultad de Químicas de la Universidad de Valencia.

Para que conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Burjassot a 20 de Julio de 2005.

Dra. M^a Dolores Moltó

Dra. M^a José Martínez

A todos aquellos que han participado en la realización de esta tesis, pero, por encima de todos y muy especialmente, a mi familia y a Olga.

Acción de gracias

Bueno, pues parece que POR FIN voy a depositar y defender la tesis y es que, como diría el maestro Yoda, todo lo que tiene un principio tiene un final. Así que, después de 7 años como miembro del departamento, primero como becario y después como técnico superior, ya va siendo hora de dar un paso más. Tantos años conllevan mucha gente a la que agradecer su ayuda, consejo y colaboración. Espero no haberme olvidado de nadie.

En primer lugar quiero dar las gracias a Milagros Redal y a Carmen Mascarell por despertar en mí el gusanillo de la Biología y de la Química y por animarme a estudiar lo que realmente me gustaba.

En estas líneas merecen y deben ocupar un lugar de honor mis mentoras, Loli y M^a Jose, a veces directoras, a veces madres pero siempre amigas. Gracias no sólo por la oportunidad de emprender esta aventura sino también por, una vez acabada mi beca, seguir confiando en mí y ofrecerme la posibilidad y la financiación para poder llevarla a buen puerto.

A Rosa de Frutos por sus consejos siempre sabios y sus constantes ánimos.

El becario es un ser temporal por naturaleza, y en 7 años son muchos los que han ido llegando y marchándose, pero todos han colaborado a convertir el laboratorio en un lugar en el que compartir ciencia y amistad. Gracias a Jose, Ximo y Javi por ayudarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación y enseñarme mucho de lo que sé. En mi corazón guardo un recuerdo muy especial de la gente que empezó conmigo y con los que por fortuna aún comparto una hermosa amistad, juntos hemos aprendido y crecido: Miguel, Pili, las Alicia, José Manuel, Santiago, Salva y Rafa. Pero, es la generación actual, la que ha vivido conmigo los momentos más intensos de mi trabajo y a la que he de agradecer el apoyo y la ayuda prestadas: al recientemente incorporado Jose Luis, a Ivette, a Amparo y especialmente a Isabel, la jefa del laboratorio y casi tan vieja y antigua como yo, hemos llorado, hemos reído, nos hemos chillado... quiero que sepas que no ha estado mal, nada mal, suerte allá donde vayas, y a Josep compañero de penas y glorias en el trabajo con las moscas y la ataxia, ahora por fin tienes a nivel científico los resultados que como persona te mereces, espero que mis moscas compensen lo que has padecido por mí.

Mi gratitud no sólo se limita al laboratorio de Genética Molecular, el sentimiento es extensivo al resto de compañeros de Departamento. Gracias a la gente de Desarrollo: Zaida, Silvia, Verónica, Lidón, Marta, Maya... por contestar una y otra vez a mis innumerables dudas siempre con una sonrisa y, a los bioquímicos Joel, Sara, Anna, Ana, Sales... y de nuevo el omnipresente Salva, por ser como sois y por el GraphPad.

Cada uno de los PAS de este nuestro departamento también ha puesto su granito de arena: Pilar y Begoña, gracias por echarme siempre una mano a la hora de resolver dudas y problemas burocráticos; Javi, por no decirme nunca que no; Fede, ¿cuántos tubos, botellas o placas han sido? ¿70000 en total?, la cifra lo dice todo; Carmen, ante tí no tengo más remedio que quitarme el sombrero, gracias por todas las veces que me has "prestado" disoluciones o has limpiado la máquina de revelar *Southern blots* o has conseguido arreglar los desaguisados que entre todos hacíamos en los microscopios; y, por último, a mi querido Jose Carlos por todas esas cosas que tú y yo sabemos.

La estancia que realicé en Nueva York me permitió generar el material que ha hecho posible completar esta tesis doctoral. Gracias Mary por permitirme formar parte de tu equipo durante unos pocos meses y por el apoyo en los duros días que pasé allí. De aquellos días, guardo como oro en paño los momentos junto a papá Rubén y mamá Irinka que cuidaron de mí en los tres meses que pasé en la Gran Manzana y me iniciaron en el mundo del desarrollo de *Drosophila*.

Las vueltas de la vida me llevaron a realizar la objeción de conciencia en la Asociación Valenciana de Ataxias Hereditarias. Allí conocí a varios enfermos con ataxia de Friedreich, ellos consiguieron que le pusiera caras a mi investigación. Para ellos, los investigadores somos su única esperanza. Gracias no sólo por el tiempo que pasamos juntos, por las excursiones o las partidas de dominó, si no también por la esperanza y fe ciegas que depositasteis en mí.

Además, investigar es trabajar, y por ello es necesario dedicar unas líneas a la gente de la asociación Joves Investigadors y de la FJI, embrutecidos incluidos, por enseñarme que defender los derechos de los investigadores es igual de importante que desarrollar mi labor de becario y que vale la pena invertir parte del tiempo en ello.

Dos de las personas que han jugado un papel importante en la última parte de esta tesis, son José Luis Alonso e Inmaculada Amorós, mis jefes en mi etapa en la Universidad Politécnica, gente maja allá donde las haya. Gracias a los dos por comprender mi situación particular y aún así ofrecerme la oportunidad de trabajar con vosotros. Aunque os visite poco, no os olvido.

Cómo no, a mis amigos: los Juanes, Amado, Jose M^a y toda la tropa de incondicionales, por estar siempre ahí. A Tomás, además de por esto, por su inestimable ayuda con el material multimedia de esta tesis.

A mis padres y hermanos por aguantarme y consolarme en los momentos malos de todos estos años, aún sin entender demasiado bien en que consistía mi trabajo. Y por soportar el estrés y el mal humor que han acompañado en muchos momentos la escritura de esta tesis.

Y finalmente a Olga por la alegría y el equilibrio que me proporciona y por haber completado el círculo de mi vida.

Gracias
Juan Antonio Navarro

-Cuando inicias una investigación se te ofrecen mil caminos, y el problema estriba en que pronto o tarde tienes que decidirte por uno sin saber hacia dónde conduce. Tal vez no lleve a ninguna parte y hayas perdido media vida, pero ese esfuerzo nunca resulta totalmente inútil, puesto que sirve para indicar a los que vienen detrás que ésa era una vía sin salida.

-¿Y con eso te conformas?

-No me importa ser peón que avanza sabiendo que va a ser sacrificado si me sostiene la esperanza que detrás llegarán las torres, los alfiles y las reinas que darán jaque mate a las enfermedades.

-Me asombra que en unos tiempos en que todo el mundo quiere ser torre, alfil o reina, tú aceptes seguir siendo un simple peón.

Bruno Guinea “El Cantaclaro” y Claudia Fonseca en *El señor de las tinieblas* de Alberto Vázquez Figueroa.

ÍNDICE



Introducción	1
1. <i>Drosophila</i> como organismo modelo del análisis genético. De Thomas Morgan a la era postgenómica	3
2. <i>Drosophila</i> como organismo modelo para el estudio de las enfermedades humanas.....	7
3. Aspectos básicos del desarrollo del sistema nervioso y del sistema muscular de <i>Drosophila</i>	10
3.1 El sistema nervioso de <i>Drosophila</i>	10
3.1.1 El Sistema Nervioso Central (SNC).....	10
3.1.2 El Sistema Nervioso Periférico (SNP).....	12
3.2 El sistema muscular de <i>Drosophila</i>	16
3.2.1 Los derivados mesodérmicos.....	16
3.2.2 Formación y desarrollo del sistema muscular en <i>Drosophila</i>	17
3.2.3 Formación y desarrollo del corazón en <i>Drosophila</i>	19
4. Estrategias experimentales para el estudio de la función génica en <i>D. melanogaster</i>	20
4.1 Mutagénesis insercional mediante elementos transponibles P.....	21
4.2 P <i>homing</i>	25
4.3 El sistema UAS-GAL4.....	26
4.4 Silenciamiento génico mediante interferencia de ARN	28
4.5 Técnicas más recientes.....	31
4.5.1 <i>Knock-out</i>	31
4.5.2 Inducción dirigida de lesiones locales o <i>TILLING</i>	31
5. La ataxia de Friedreich.....	32
5.1 Aspectos generales.....	32
5.2 El gen <i>FRDA</i> y la proteína frataxina.....	32
5.3 Causas genéticas y bioquímicas de la patología.....	33
5.4 Función biológica de la frataxina.....	34
5.5 Modelos de ataxia de Friedreich en eucariotas pluricelulares.....	37
Objetivos	39
Materiales y Métodos	43
1. Pautas de redacción.....	45
2. Material biológico.....	46
2.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	46

2.2 Cepas de <i>Escherichia Coli</i>	48
2.3 Cepas de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	48
2.4 Clones de ADN genómico de <i>D. melanogaster</i>	48
3. Métodos moleculares.....	49
3.1 Extracción de ácidos nucleicos	49
3.1.1 ADN genómico de <i>Drosophila</i>	49
3.1.2 ADN clonado en vectores plasmídicos y BACs	50
3.1.3 ADN de Cromosomas Artificiales de Levadura (YACs).....	50
3.1.4 ARN poli(A)+ y ARN total de <i>Drosophila</i>	51
3.2 Análisis de Restricción.....	52
3.3 Amplificación de Ácidos Nucleicos.....	52
3.3.1 Reacción de PCR estándar	52
3.3.2 Reacción de RT-PCR.....	56
3.3.3 PCR inversa..	56
3.4 Purificación de fragmentos de ADN	57
3.4.1 A partir de geles de agarosa	57
3.4.2 A partir de productos de PCR	57
3.5 Clonación	58
3.5.1 Vectores de clonación	58
3.5.2 Métodos de clonación	58
3.5.3 Rescate plasmídico.....	59
3.5.4 Preparación de células competentes.....	59
3.5.5 Transformación y análisis de las colonias transformadas	59
3.6 Electroforesis	60
3.7 Hibridación y detección de los híbridos.....	61
3.7.1 Marcaje de sondas de ADN	61
3.7.2 Marcaje de sondas de ARN.....	61
3.7.3 <i>Southern blot</i>	63
3.7.4 <i>Northern blot</i>	63
3.7.5 Detección de los híbridos.....	63
3.8 Secuenciación y análisis de secuencias.....	64
3.8.1 Reacciones de secuenciación y cebadores	64
3.8.2 Programas empleados para el análisis de las secuencias	65
4. Métodos histológicos y citológicos	65
4.1 Fijación de embriones de <i>D. melanogaster</i>	65
4.2 Hibridación <i>in situ</i> de embriones de <i>D. melanogaster</i> con sondas de ARN	66
4.3 Hibridación <i>in situ</i> en cromosomas politénicos de <i>D. melanogaster</i> con sondas de ADN.....	68
4.4 Detección inmunohistoquímica en embriones de <i>D. melanogaster</i>	70

4.5	Análisis microscópico de retinas de adultos de <i>D. melanogaster</i>	73
4.6	Preparación de cutículas de <i>D. melanogaster</i>	74
4.7	Análisis de las mandíbulas de larvas de <i>D. melanogaster</i>	75
5.	Diseño experimental de la mutagénesis insercional	75
5.1	Los elementos PArB y EP	75
5.2	Movilización de los elementos P1468 y EP1598	77
6.	Obtención de moscas transgénicas mediante microinyección	79
6.1	Obtención de líneas transformadas	79
7.	El sistema UAS-GAL4	83
8.	Tests de supervivencia y de capacidad locomotora	84
8.1	Test de supervivencia	84
8.2	Test de capacidad locomotora	84
	Resultados	87
1.	Movilización de elementos transponibles P localizados en la región 8C/D del cromosoma X	89
1.1	Determinación de la distancia física entre el elemento P1468 y el gen <i>fh</i>	89
1.1.1	Antecedentes	89
1.1.2	Confirmación de la localización cromosómica del gen <i>fh</i>	90
1.1.3	Cálculo de la distancia física	92
1.2	Movilización de los elementos transponibles P1468 y EP1598	95
1.2.1	Movilización del elemento P1468 y análisis de las líneas obtenidas	96
1.2.2	Movilización del elemento EP1598 y análisis de las líneas obtenidas	100
1.2.3	Análisis conjunto de los resultados de ambas movilizaciones	106
2.	Obtención en <i>D. melanogaster</i> de mutantes funcionales transitorios para el gen <i>fh</i> mediante el uso del sistema UAS-GAL4	108
2.1	Obtención de las construcciones UAS del gen <i>fh</i>	108
2.1.1	UAS- <i>fh</i>	108
2.1.2	UAS- <i>fh</i> IR	109
2.2	Obtención de las líneas transgénicas y localización de los transgenes	110
2.2.1	Líneas UAS- <i>fh</i>	110
2.2.2	Líneas UAS- <i>fh</i> IR	111
2.3	Comprobación del funcionamiento de los sistemas de sobreexpresión e interferencia	111

2.3.1 Sobreexpresión e interferencia del gen <i>fh</i> en embriones de <i>D. melanogaster</i> de acuerdo con el patrón del gen <i>engrailed</i>	112
2.3.2 Detección mediante <i>Northern blot</i> de los transcritos del gen <i>fh</i> en embriones sobreexpresados e interferidos según un patrón de expresión generalizado	112
2.4 Análisis de los fenotipos obtenidos por sobreexpresión e interferencia	113
2.4.1 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión generalizada	115
2.4.2 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión específica en el sistema muscular y el corazón	124
2.4.3 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión específica en el sistema nervioso	132
2.4.4 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión en el adulto	139
2.4.5 Análisis de la supervivencia y de capacidad locomotora en adultos	142
Discusión	155
1. Análisis de las metodologías utilizadas para obtener mutantes en <i>Drosophila</i>	157
1.1 Movilización de elementos transponibles P	157
1.2 Aplicación del sistema UAS-GAL4 de levadura para modificar la expresión génica de <i>fh</i>	161
1.3 Aplicación de la técnica de ARNi para silenciar el gen <i>fh</i>	163
2. <i>Drosophila</i> como modelo de estudio de la ataxia de Friedreich	165
2.1 <i>fh</i> es un gen esencial para el desarrollo embrionario del SN y del músculo en <i>Drosophila</i>	166
2.2 La reducción de la expresión de <i>fh</i> afecta a la supervivencia y a la capacidad de escalada	168
2.3 La reducción de la expresión de <i>fh</i> ha generado alteraciones fenotípicas útiles para futuros rastreos genéticos	169
3. La sobreexpresión del gen <i>fh</i> produce el mismo efecto que su interferencia pero con mayor intensidad	169
Conclusiones	177
Bibliografía	181

INTRODUCCIÓN



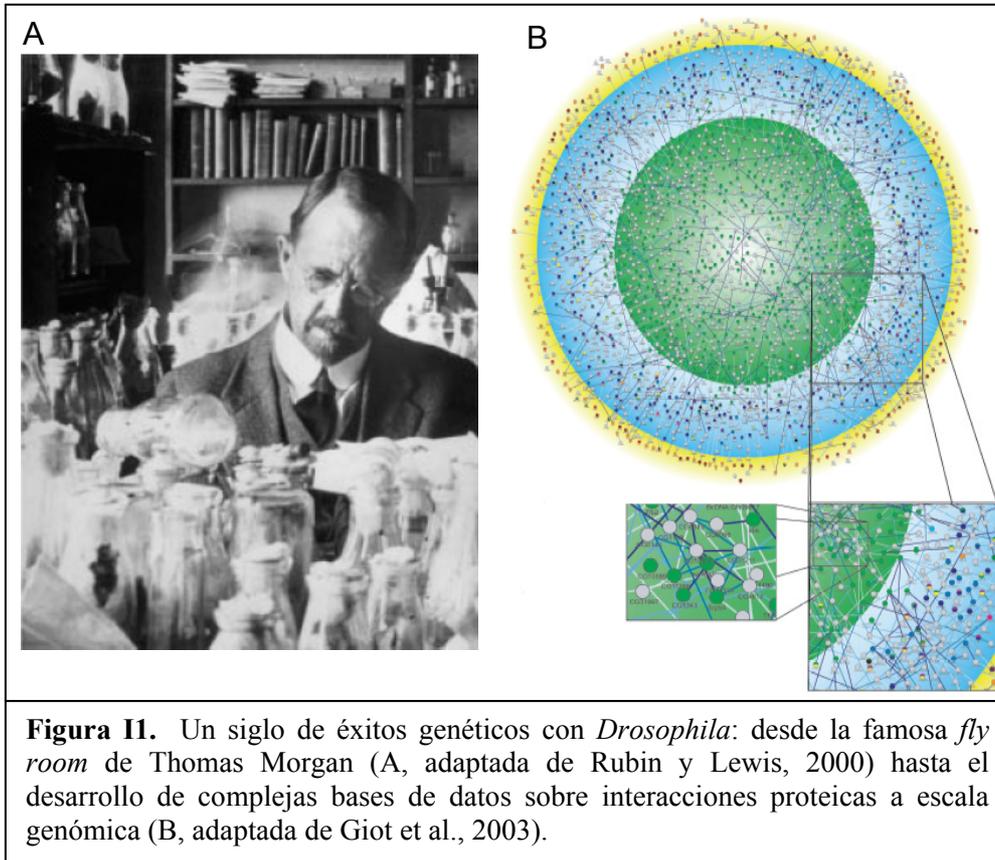
1. *Drosophila* como organismo modelo del análisis genético. De Thomas Morgan a la era post-genómica.

El género *Drosophila*, y en particular la especie *Drosophila melanogaster*, posee una larga y fructífera historia dentro de la investigación genética. Los primeros estudios que utilizan la mosca del vinagre se remontan a finales del siglo XIX, pero no fue hasta que Thomas Hunt Morgan (1866-1945) la eligió en sus estudios sobre la herencia mendeliana, que no se produjo el despegue de la investigación con *Drosophila*. El descubrimiento en 1910 del primer mutante, una mosca de ojos blancos (mutante *white*), supuso un punto de inflexión en la trayectoria de *Drosophila* como organismo modelo.

Todos estos estudios iniciales culminaron con la publicación en 1915 del libro "*The Mechanism of Mendelian Heredity*", en el que se resumen muchos de los principios de la Genética, como es la Teoría Cromosómica de la Herencia. Desde entonces *Drosophila* se ha convertido en el caballo de batalla y en la pionera de un gran número de estudios genéticos: obtención de mutaciones mediante agentes inductores como los rayos X (1927), elaboración de mapas citogenéticos y físicos (1972) gracias al descubrimiento de los cromosomas politénicos, desarrollo de las primeras genotecas y rastreos genéticos (1975), primeros experimentos de clonación posicional (1979), disección del desarrollo temprano (1980), obtención de individuos transgénicos (1983) y así una larga lista en la que podemos incluir, como punto final de una etapa, la obtención de la secuencia del genoma de *Drosophila* (Rubin y Lewis, 2000).

Esto ha sido posible gracias a toda una serie de ventajas que ofrece este organismo en la experimentación genética: genoma pequeño, tiempo de generación corto, clara distinción entre las diferentes fases de su ciclo vital, facilidad de cultivo y manejo en el laboratorio, alta fecundidad con la obtención de abundante descendencia, etc.

Todo el potencial biológico de la mosca del vinagre puede verse reflejado en el incremento exponencial que ha experimentado el número de publicaciones sobre *Drosophila* desde 1900. En la actualidad se supera ya la cifra de las 70.000.



El proyecto de secuenciación del genoma de *Drosophila*, fue iniciado por las organizaciones BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*) y EDGP (*European Drosophila Genome Project*). Dentro de este proyecto se abordó la elaboración, entre otras herramientas, de un mapa físico basado en clones de tipo BAC que cubrieron la práctica totalidad del genoma (revisado en Kimmerly *et al.*, 1996). Dichos clones se secuenciaron mediante la estrategia denominada *shotgun*, consistente en dividir el clon elegido en numerosos subclones. Posteriormente, los extremos de estos subclones son secuenciados y sus secuencias parciales alineadas para deducir, entre todas, la secuencia del clon del que provienen. De este modo se secuenciaron unas 29Mb, pero esta estrategia resultó ser demasiado lenta para ir cumpliendo los plazos establecidos. Fue en este momento, cuando la empresa *Celera Genomics* entró en escena, ya que había elegido a *D. melanogaster* para probar si su estrategia de *shotgun* directo era aplicable a la secuenciación de genomas eucarióticos más complejos como el humano (Adams *et al.*, 2000).

El genoma de *D. melanogaster* tiene un tamaño de 180Mb, de las cuales un tercio corresponde a heterocromatina. La heterocromatina está formada, en su mayor parte, por secuencias repetitivas y por ello su secuenciación no ha podido ser abordada siguiendo la misma estrategia de *shotgun*. Sin embargo, ello no ha sido obstáculo para que se haya iniciado ya su propio proyecto de secuenciación (Hoskins *et al.*, 2002).

Tras la primera entrega en marzo del año 2000, se han producido tres actualizaciones (octubre de 2000, abril de 2003 y noviembre de 2004) en las que se han ido agrupando las secuencias de los diferentes clones, eliminando los huecos existentes, hasta disponer de la secuencia casi completa de cada brazo cromosómico. Al mismo tiempo se han ido corrigiendo errores de orden, de secuenciación y de anotación. Una secuencia para ser realmente útil debe ser anotada, es decir, debe proveer la estructura de los genes en ella incluidos y la mayor cantidad de información sobre su posible función biológica (Pennisi, 2000). Actualmente, se han anotado un total de 13676 genes (revisado en Celniker y Rubin, 2003) y a pesar de las constantes actualizaciones, aún se siguen identificando genes que escapan a la capacidad de los programas informáticos empleados en el proceso de anotación (Stapleton *et al.*, 2002).

La obtención de la secuencia del genoma de *D. melanogaster* no ha sido más que el fin del principio. Hoy en día, en el inicio de la era post-genómica, el principal objetivo de la investigación con *Drosophila* es llevar a cabo la anotación funcional de los genes.

Para conseguir este fin, los investigadores han desarrollado una triple vía de trabajo:

- I. Creación de una serie de bases de datos en las que incorporar y ordenar toda la información que continuamente se va generando, en especial en los casos de genes relacionados con enfermedades humanas. En la Tabla I1 se presenta una muestra de estas bases de datos, junto con su dirección en internet y una breve descripción de su contenido.
- II. Generación de multitud de aplicaciones de *software* para extraer, de la secuencia de ADN, la mayor cantidad de información útil (revisado en Mungall *et al.*, 2002; revisado en Lewis *et al.*, 2002; Ohler *et al.*, 2002; Henrich *et al.*, 2004).
- III. Experimentos a escala genómica para conocer el patrón de expresión embrionario de un gran número de genes (Tomancak *et al.*, 2002), describir el nivel de expresión de cada gen a lo largo del ciclo vital de *Drosophila* (Arbeitman *et al.*, 2002), estudiar cómo se regulan dichos niveles en diferentes condiciones ambientales como, por ejemplo, el estrés oxidativo (Zou *et al.*, 2000; Girardot *et al.*, 2004), determinar las redes de interacción entre proteínas relacionándolas, además, con su localización subcelular (Giot *et al.*, 2003), etc.

Tabla II. Relación de bases de datos y páginas *web* que contienen información y recursos esenciales para la investigación con *D. melanogaster*.

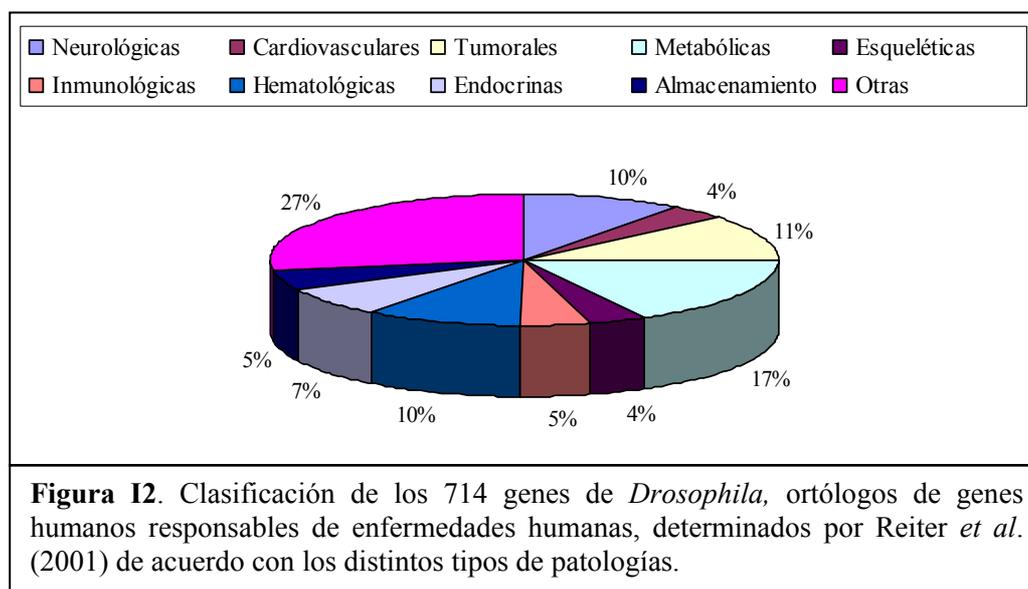
Nombre	Dirección web	Descripción
Flybase	http://www.flybase.org/	Principal base de datos que integra información relacionada con <i>Drosophila</i> : genes, cepas, mapas, inserciones...
BDGP	http://www.fruitfly.org/	Página <i>web</i> del Proyecto Genoma de <i>Drosophila</i> .
DHGP	http://www.dhgp.org	Base de datos sobre el proyecto de secuenciación de la heterocromatina de <i>Drosophila</i> .
G. O.	http://www.geneontology.org	Base de datos sobre la función de cada proteína inferida de su secuencia y su localización celular.
Curagen	http://www.curagen.com	Base de datos de interacciones entre proteínas.
Homophila	http://superfly.sdsc.edu/homophila/	Base de datos de genes de <i>Drosophila</i> que muestran homología con genes responsables de enfermedades humanas.
Mitodrome	http://bighost.area.ba.cnr.it/BIG/MitoDrome/	Base de datos sobre genes de <i>Drosophila</i> que intervienen en procesos mitocondriales.
Interactive fly	http://sdb.bio.purdue.edu/	Página <i>web</i> sobre el papel de cada gen en el desarrollo y función de órganos y tejidos de <i>Drosophila</i> .
Flymove	http://flymove.uni-muenster.de/	Página <i>web</i> con gran cantidad de recursos multimedia sobre el desarrollo de <i>Drosophila</i> .

Pero no sólo se ha secuenciado el genoma de *Drosophila*. Los proyectos genoma de diferentes organismos han revelado que en *Saccharomyces cerevisiae*, el número de genes es de 6591 (www.yeastgenome.org), mientras que en *Caenorhabditis elegans* (revisado en Felix, 2004) y *D. melanogaster* (revisado en Celniker y Rubin, 2003), dos metazoos simples, es de 20621 y 13676, respectivamente, y por su parte en los seres humanos es de alrededor de 25000 (Stein, 2004). El genoma de *Drosophila* aporta nuevas evidencias a la idea de que la evolución a formas más complejas de vida depende más de la aparición de interacciones nuevas entre los genes ya existentes, que de la generación de nuevos genes (Jasny, 2000). Parece ser que los mecanismos genéticos principales son muy similares en todos los seres vivos y, por tanto, la investigación del genoma de *D. melanogaster* juega un papel fundamental en el descubrimiento de los procesos compartidos por todos los organismos.

2. *Drosophila* como organismo modelo para el estudio de enfermedades humanas.

La clonación y caracterización funcional de muchos genes de *Drosophila* y de sus ortólogos humanos, ha permitido conocer que procesos como el establecimiento de los ejes del cuerpo, el control de la proliferación celular y el desarrollo de las extremidades, del sistema nervioso, de los ojos y del corazón están muy conservados entre la mosca y el hombre. Del mismo modo, muchos tipos de genes como, por ejemplo, los que codifican factores de transcripción, proteínas estructurales, proteínas cromosómicas, canales de iones o proteínas de señalización, presentan gran homología funcional en ambos organismos (Kornberg y Krasnow, 2000; revisado en O’Kane, 2003). Estos descubrimientos hacen pensar que tales procesos no han evolucionado de forma independiente en las moscas y en los humanos. De hecho, cuando dichos sistemas están afectados, a menudo se observan defectos muy similares en ambos tipos de organismos. Por tanto, *Drosophila* es un modelo a tener en cuenta en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades en los mamíferos. La menor redundancia genética que existe en *Drosophila* la hace muy útil para el análisis de ciertos aspectos de las enfermedades humanas que no pueden resolverse en modelos de ratón o de cultivos celulares.

Basándose en esta idea, Reiter *et al.* (2001), compararon la secuencia de todos los genes humanos causantes de alguna enfermedad con la secuencia completa del genoma de *Drosophila*. Los resultados fueron ordenados por tipos de enfermedades y se creó la base de datos denominada Homophila, para permitir el acceso a la información a través de internet. Se identificó que un 75-77% de los genes humanos escogidos presentaban similitud con alguna secuencia de *Drosophila*. Tal y como se aprecia en la figura I2, esas similitudes se han encontrado en genes relacionados con desórdenes del desarrollo, enfermedades neurológicas, esqueléticas o metabólicas, o con procesos cancerosos, entre otros.



Uno de los procesos que mayor similitud presenta, entre *Drosophila* y el ser humano, es el establecimiento y la degeneración del sistema nervioso. En *Drosophila*, se han aislado varios mutantes que han permitido estudiar la neurodegeneración, la cual se caracteriza en este organismo por una aparición tardía en el desarrollo, por un deterioro progresivo de las estructuras adultas del sistema nervioso y por elevados niveles de apoptosis neuronal, tal y como ocurre en los seres humanos (revisado en Bonini, 2001). Gracias a estos mutantes se han identificado algunas proteínas clave en este proceso (revisado en Mutsuddi y Nambu, 1998). Algunos de estos mutantes presentan similitudes con los fenotipos de algunas enfermedades humanas, por ejemplo: mutante *eggroll* - enfermedad de Tay-Sachs (Min y Benzer, 1997); mutante *drop-dead* - síndrome de Werner (Rogina, 1997); mutante *spongecake* - enfermedades espongiiformes humanas (Min y Benzer, 1997); gen *SOD* - esclerosis lateral amiotrófica (Phillips *et al.*, 1995); mutante *bubblegum* - adrenoleucodistrofia (Min y Benzer, 1999).

Tabla I2. Enfermedades humanas neurodegenerativas apropiadas para el estudio en *D. melanogaster* (revisado en Bier, 2005).

Enfermedad Humana	Símbolo Gen Humano	Símbolo Gen <i>Drosophila</i>
Ataxia Espinocerebelar	<i>SCA1</i>	<i>CG4547</i>
	<i>SCA2</i>	<i>CG5166</i>
	<i>SCA6</i>	<i>cac</i> *
	<i>SCA14</i>	<i>inaC</i> *
	<i>SCA17</i>	<i>Tbp</i> *
Ataxia de Friedreich	<i>FRDA</i>	<i>fh</i>
Enfermedad de Huntington	<i>HD</i>	<i>huntingtin</i> *
Enfermedad de Parkinson	<i>PARK2</i>	<i>park</i> *
	<i>PARK5</i>	<i>Uch</i>
	<i>PARK7</i>	<i>CG6646</i>
	<i>NR4A2</i>	<i>Hr38</i> *
	<i>MAPT</i>	<i>tau</i> *
	<i>PINK1</i>	<i>CG4523</i> *
Enfermedad de Alzheimer	<i>PSEN1, PSEN2</i>	<i>Psn</i> *
	<i>APP</i>	<i>Appl</i> *
Síndrome del X Frágil	<i>FMRI</i>	<i>Fmr1</i> *
Síndrome de Angelman	<i>UBE3A</i>	<i>dube3A</i> *
Adrenoleucodistrofia	<i>ABCD1</i>	<i>Bgm</i> *

* indica que para estos genes se han aislado alelos mutantes.

Otra gran ventaja de *Drosophila* es la posibilidad de crear modelos de enfermedades humanas, introduciendo mediante transgénesis alelos alterados de los genes responsables. Siguiendo esta estrategia se están estudiando enfermedades como las causadas por expansiones de poliglutaminas (Fernandez-Funez *et al.*, 2000; Mutsuddi *et al.*, 2004), la enfermedad de Parkinson (Feany y Bender, 2000; Greene *et al.*, 2003) y la enfermedad de Alzheimer (Wittmann, 2001; Iijima *et al.*, 2004). En todos los casos se ha observado un fenotipo muy similar al de los pacientes de tales patologías, respecto a la degeneración neuronal, la presencia de agregados proteicos, de inclusiones nucleares en el sistema nervioso central y la disminución de la capacidad de supervivencia, apoyando la idea de que los mecanismos de toxicidad de las enfermedades son comunes en ambos organismos.

El desarrollo y la función del corazón presenta también enorme similitud entre *Drosophila* y los humanos (revisado en Bier y Bodmer, 2004). A pesar de las diferencias anatómicas entre el corazón de los dos organismos, su desarrollo embrionario es muy similar (revisado en Bodmer y Venkatesh, 1998). Muchos de los genes responsables de enfermedades cardiovasculares son compartidos por ambos organismos y muy probablemente algunos de ellos actúen en los mismos procesos. Un ejemplo lo tenemos en el trabajo de Manh *et al.* (2005) para el estudio de la miopatía hipertrófica familiar.

Un tercer ejemplo de estructura que también está muy conservada entre la mosca y el hombre es el caso de la mitocondria. El ADN mitocondrial (ADNmt) de *Drosophila* codifica el mismo conjunto de polipéptidos que los ADNmt de vertebrados, más los ARNs ribosómicos y ARNs de transferencia necesarios para la síntesis de las proteínas mitocondriales. Además, todos los enzimas de transporte mitocondrial, la maquinaria de mantenimiento y expresión del ADNmt y la maquinaria para el ensamblaje de las proteínas que contienen centros Fe-S, también están muy conservadas entre ambos organismos (revisado en Jacobs *et al.*, 2004).

Sin embargo, *Drosophila* sería un modelo de características limitadas si no pudiera ser empleado en el ensayo de drogas o fármacos para el tratamiento de las enfermedades humanas (revisado en Manev *et al.*, 2003). Afortunadamente, se ha comprobado que la mosca es capaz de responder a drogas, como la cocaína o el etanol, de un modo similar a los mamíferos (Li *et al.*, 2000 y Heberlein, 2000). También se ha descrito una respuesta positiva a ciertos tratamientos empleados en el hombre, como la utilización del aceite de Lorenzo contra la adrenoleucodistrofia (Min y Benzer, 1999) y la L-DOPA o sus derivados para combatir la enfermedad de Parkinson (Pendleton *et al.*, 2002).

Finalmente, destaca la posibilidad de emplear *Drosophila* para identificar modificadores de fenotipos, como una de las aplicaciones más valiosas como sistema modelo para el estudio de enfermedades humanas. Este tipo de rastreos, que no puede realizarse en ningún vertebrado (revisado en Reiter *et al.*, 2001), nos permite identificar interacciones funcionales entre los genes, así como nuevas dianas terapéuticas.

3. Aspectos básicos del desarrollo del sistema nervioso y del sistema muscular de *Drosophila*.

Puesto que vamos a emplear a *Drosophila* como modelo de estudio de una enfermedad neurodegenerativa, hemos considerado conveniente introducir algunos aspectos básicos del desarrollo y formación de sus sistemas nervioso y muscular, ya que cada uno de ellos depende íntimamente del otro.

3.1 El sistema nervioso de *Drosophila*.

3.1.1 El Sistema Nervioso Central (SNC).

El SNC de *Drosophila* se divide en cerebro y cordón nervioso ventral. El cerebro se genera desde la región procefálica del neuroectodermo, mientras que el cordón nervioso ventral surge de la región más ventral del mismo. En el estadio 5 del embrión, la expresión en gradiente de un conjunto de genes proneurales a lo largo de los ejes corporales, induce la determinación de dominios de equivalencia neuronal. Ejemplos de estos genes son: los genes del complejo *Achaete-Scute*, *daughterless* y *ventral nervous system condensation defective*. Los genes neurogénicos, como *Notch*, *Delta*, *Enhancer of split* y *big brain*, provocan la selección, dentro de los dominios, de células que adquieren potencial neurogénico y que se convertirán posteriormente en neuroblastos (en Campos-Ortega, 1993). Entre los estadios 9 al 11, por cada hemisegmento se separan 30 neuroblastos del ectodermo neural en 5 fases diferentes. Rápidamente, cada neuroblasto se divide asimétricamente 8 veces para producir nuevos neuroblastos y una serie de Células Madre Ganglionares (GMC). Trabajos recientes muestran que existe una red temporal de genes que impulsa a las GMC, nacidas a diferentes tiempos dentro del linaje del mismo neuroblasto, a adquirir destinos diferentes. Cada GMC se divide una única vez, durante el estadio 13, para generar dos neuronas postmitóticas (figura I3-A). Del conjunto de 30 neuroblastos de cada hemisegmento se generan unas 400 neuronas, que se pueden dividir en tres clases principales: neuronas motoras que inervan músculos (5%), células de la glía (4%) e interneuronas que inervan a otras neuronas (90%) (revisado en Skeath y Thor, 2003). Existe también un reducido porcentaje (1%) de neuronas secretoras (en Goodman y Doe, 1993). Bossing *et al.* (1996) y Schimidt *et al.* (1997) identificaron *in vivo* cada neuroblasto determinando su posición, tiempo de formación y patrón de expresión de genes. Estos autores, además, estudiaron su linaje para descubrir qué GMC y posteriormente qué tipo de neuronas se derivaban de cada uno e incluso hacia dónde proyectan sus axones.

Desde el estadio 13 las diferentes neuronas empiezan a desarrollar prolongaciones axonales (figura I3-B). Gracias a una serie de señales morfogénicas que van atrayendo o repeliendo a los conos de crecimiento de cada axón, todos los axones son capaces de llegar a su destino. Se ha demostrado que las células de la glía juegan el papel de guías durante el crecimiento de los axones y, una vez el desarrollo se completa, las células de la glía envuelven al conjunto de axones (revisado en Hidalgo, 2003). Dentro de la estructura del SNC existe una población de neuronas, llamadas neuronas de la línea media, que derivan del mesectodermo y que se encuentran entre los dos haces de axones longitudinales. Este conjunto de neuronas parece que también participa en el establecimiento del esqueleto axonal del SNC, sobre todo a la hora de guiar a las prolongaciones para formar las comisuras transversales (en Goodman y Doe, 1993).

Al inicio del estadio 14 el cordón nervioso central empieza a condensarse. La condensación implica un proceso coordinado de disminución del tamaño y aumento de la densidad celular. En este momento se inicia la actividad del SNC. En el estadio 17 se completa todo el proceso de formación del SNC.

La estructura del SNC situada en cada segmento se conoce con el nombre de neurómero (figura I3-C). En cada uno se desarrolla un esqueleto de proyecciones axonales incluyendo tres axones longitudinales simétricos bilaterales, un par de comisuras transversales conectando ambos lados y un par de raíces nerviosas a cada lado para la salida de los axones motores y la entrada de los sensoriales.

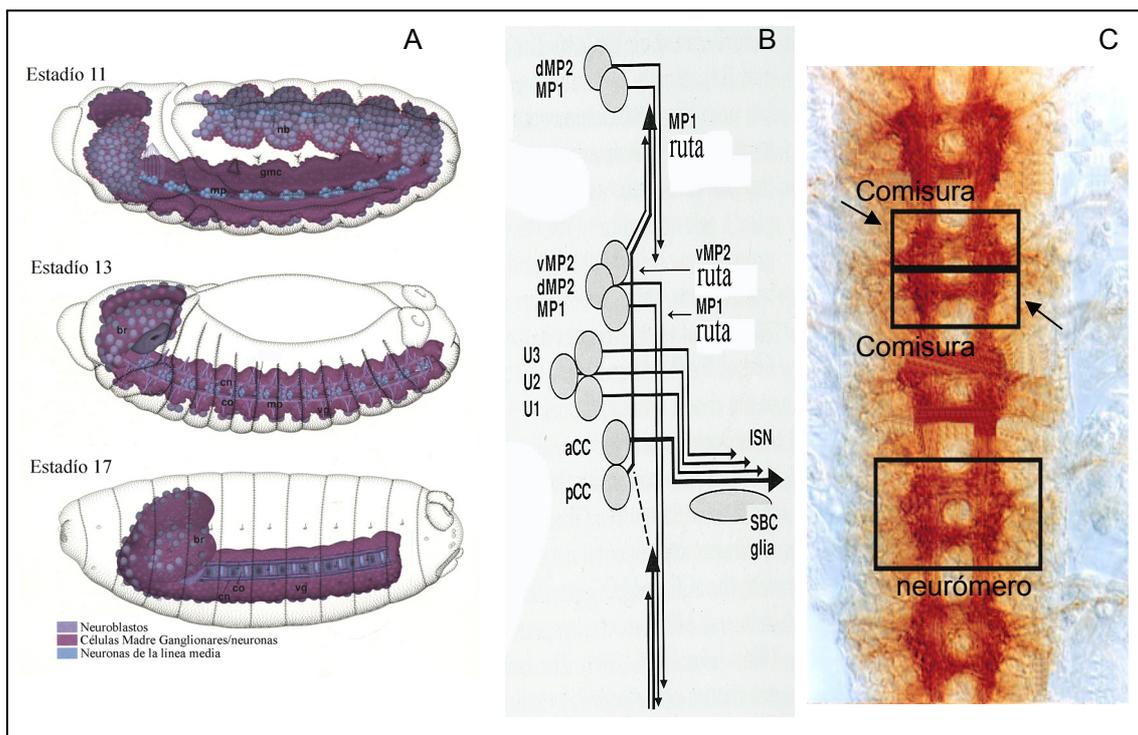


Figura I3. El SNC embrionario. (A) Desarrollo embrionario del SNC. En la imagen, **nb** corresponde a neuroblastos, **gmc** a células madre ganglionares, **mp** a células de la línea media, **br** al cerebro, **cn** a las conexiones axonales, **co** a las comisuras y **vg** al cordón nervioso ventral. (B) Esquema de la formación del complejo esqueleto de axones del sistema nervioso embrionario. MP2, MP1, aCC, pCC y U son diferentes tipos de neuronas del SNC, así aCC y U son neuronas motoras, mientras que las MP1, MP2 y pCC son interneuronas que participan en la formación de los axones longitudinales. (C) Estructura de la escalera del SNC. Imágenes adaptadas de Hartenstein (1993), Goodman y Doe (1993) y de la *flymove*, respectivamente.

El SNC embrionario sufre, al final del desarrollo, profundos cambios morfológicos como el desarrollo en el cerebro de los lóbulos ópticos y una proliferación masiva de neuroblastos para alargar el cordón nervioso ventral.

Gran parte del SNC embrionario persiste hasta el estadio adulto. Así por ejemplo, muchas de las interneuronas del cerebro adulto son de origen embrionario. A este conjunto de células se les añaden también un gran número de neuronas durante el estadio larvario y al inicio de la pupación. En general, las interneuronas adultas de origen embrionario o larvario, aunque no son histolizadas, sufren grandes remodelaciones para adquirir nuevas funciones. Durante el primer estadio larvario tiene lugar una segunda fase de neurogénesis, en la que se forman, de nuevo, unos 60 neuroblastos por cada segmento. Cada uno de ellos reinicia una fase proliferativa en la que genera una neurona y una célula madre ganglionar cada vez que se replica. Todo este conjunto de precursores neuronales permanece indiferenciado hasta el inicio de la pupación. Algunos estudios sugieren que la mayoría de neuronas específicas del adulto son interneuronas, dedicadas al procesamiento de información desde el sistema sensorial del adulto y, en algunas partes del adulto, a coordinar funciones locomotoras (en Hartenstein, 1993).

3.1.2 El Sistema Nervioso Periférico (SNP).

El SNP consta de un componente sensorial y de un componente motor. Las neuronas sensoriales se encuentran en la periferia y proyectan sus axones hacia el SNC, mientras que las motoneuronas se encuentran en el SNC y sus axones se extienden periféricamente para inervar los músculos.

El componente sensorial.

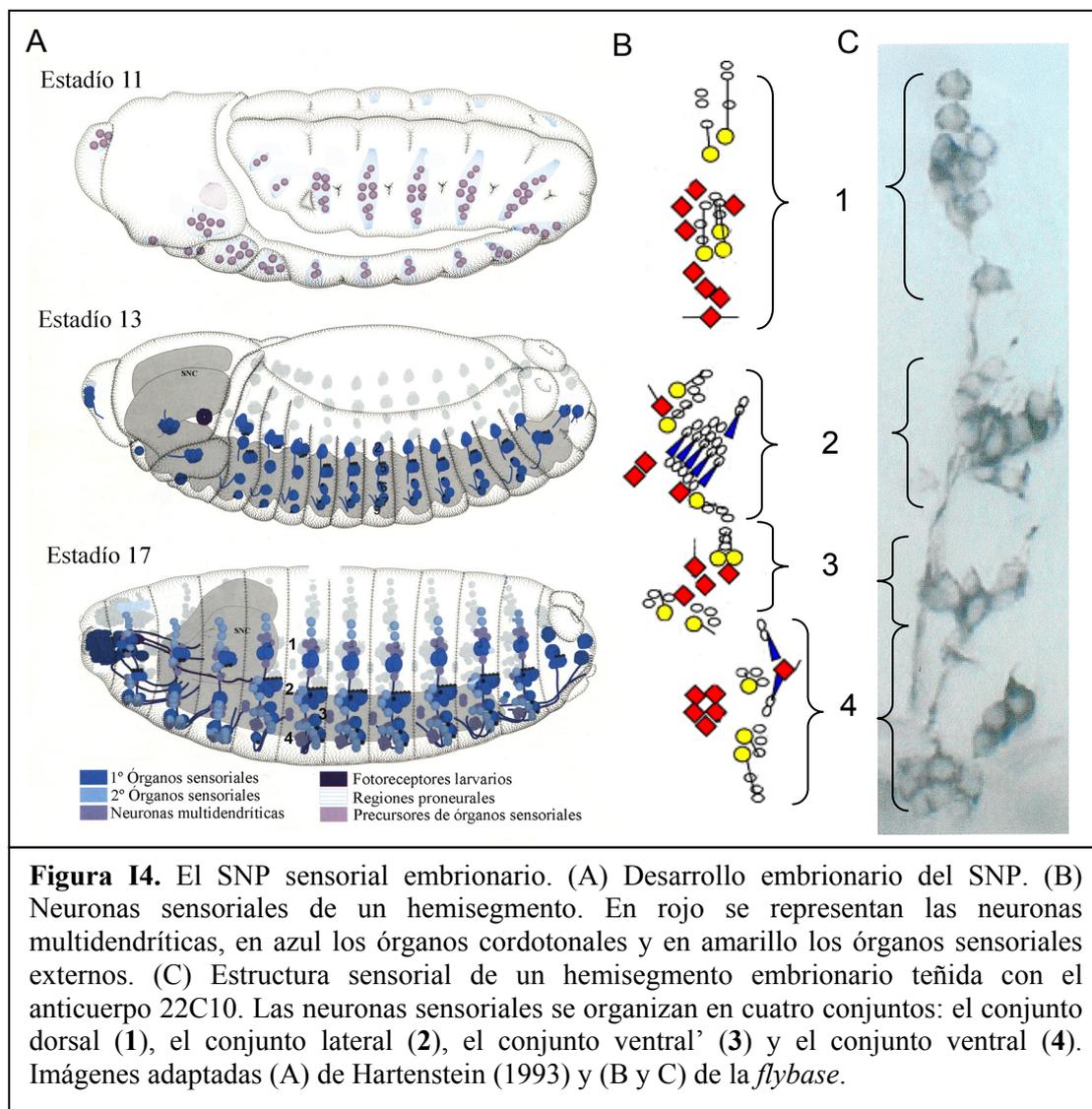
Las células precursoras aparecen en regiones proneurales del embrión a partir del estadio 11. En los estadios 11 y 12, los precursores se dividen 2 o 3 veces para producir el conjunto de células que formarán los órganos sensoriales. La diferenciación de los mismos se produce durante los estadios 13 al 15. Al mismo tiempo empieza a producirse el crecimiento de los axones sensoriales hacia el SNC.

El proceso de diferenciación y formación del sistema sensorial embrionario requiere la expresión secuencial de grupos de genes con papeles muy distintos. En primer lugar, los genes del complejo *Achaeta-Scute* confieren a un grupo de células la posibilidad de convertirse en precursores neuronales. A continuación, se expresan los genes neurogénicos que restringen, por inhibición lateral, esa posibilidad a una sola de las células del grupo en la que vuelven a expresarse los genes proneurales. A partir de entonces, se induce la expresión de genes que le conferirán propiedades neuronales, de genes que especificarán la identidad de la neurona y de genes que controlarán la división celular para formar los órganos sensoriales (en Jan y Jan, 1993). El crecimiento de los axones sensoriales hacia el SNC se inicia en el estadio 13. Una vez el axón sensitivo alcanza el SNC debe navegar a través de la compleja red de nervios del mismo para encontrar su neurona diana.

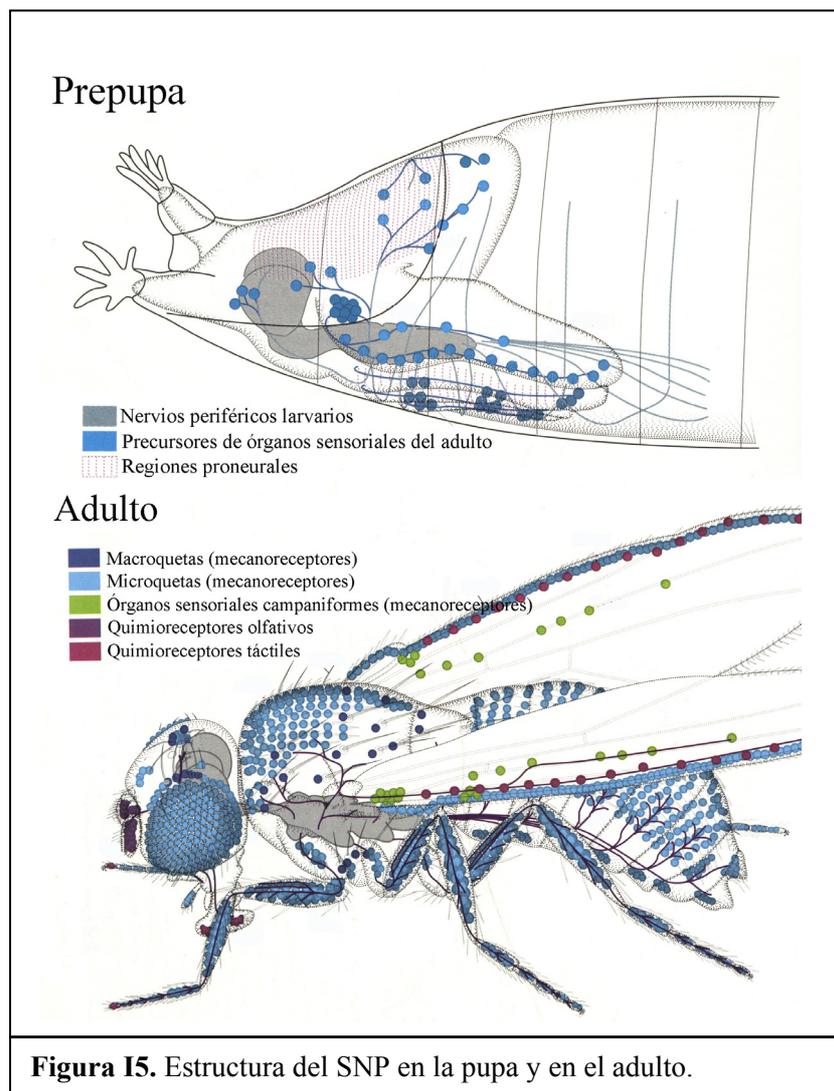
Al final del desarrollo embrionario, en el estadio 17, todos los órganos sensoriales larvarios se han diferenciado y los axones sensoriales han alcanzado el SNC (figura I4-A).

El sistema sensorial consta de tres tipos de órganos o neuronas sensoriales. Los órganos sensoriales de tipo I se originan a partir de una célula llamada precursor de órgano sensorial (SOP) y se clasifican en dos grupos: los órganos sensoriales externos y los órganos cordotonales. Los primeros se encargan de traducir la información de tipo químico o mecánico y poseen estructuras sensoriales externas como quetas, órganos campaniformes y órganos basicónicos. Por su parte, los órganos cordotonales son tenso-receptores y están situados internamente (en Jan y Jan, 1993). Los órganos sensoriales de tipo II están compuestos por neuronas con múltiples dendritas que, parece ser, funcionan como propioceptores, termorreceptores y osmorreceptores. Al parecer derivan de los linajes tanto de los órganos sensoriales externos como de los cordotonales (en Jan y Jan, 1993).

Los órganos sensoriales de cada hemisegmento embrionario están formados por 42 neuronas sensoriales, divididas en cuatro grupos a lo largo del eje dorso-ventral embrionario (figura I4-B y C).



Los órganos sensoriales de la larva permanecen intactos a lo largo de los tres estadios larvarios pero son eliminados durante la fase de pupación, con muy pocas excepciones como el órgano de Keilin. A partir de las células madre sensoriales situadas en los discos imaginales surge un nuevo y completo conjunto de órganos sensoriales (figura I5). La mayoría de los precursores surge en el tercer estadio larvario. El proceso de división y diferenciación de estos precursores es muy semejante al proceso de establecimiento del patrón sensorial embrionario (en Hartenstein, 1993).

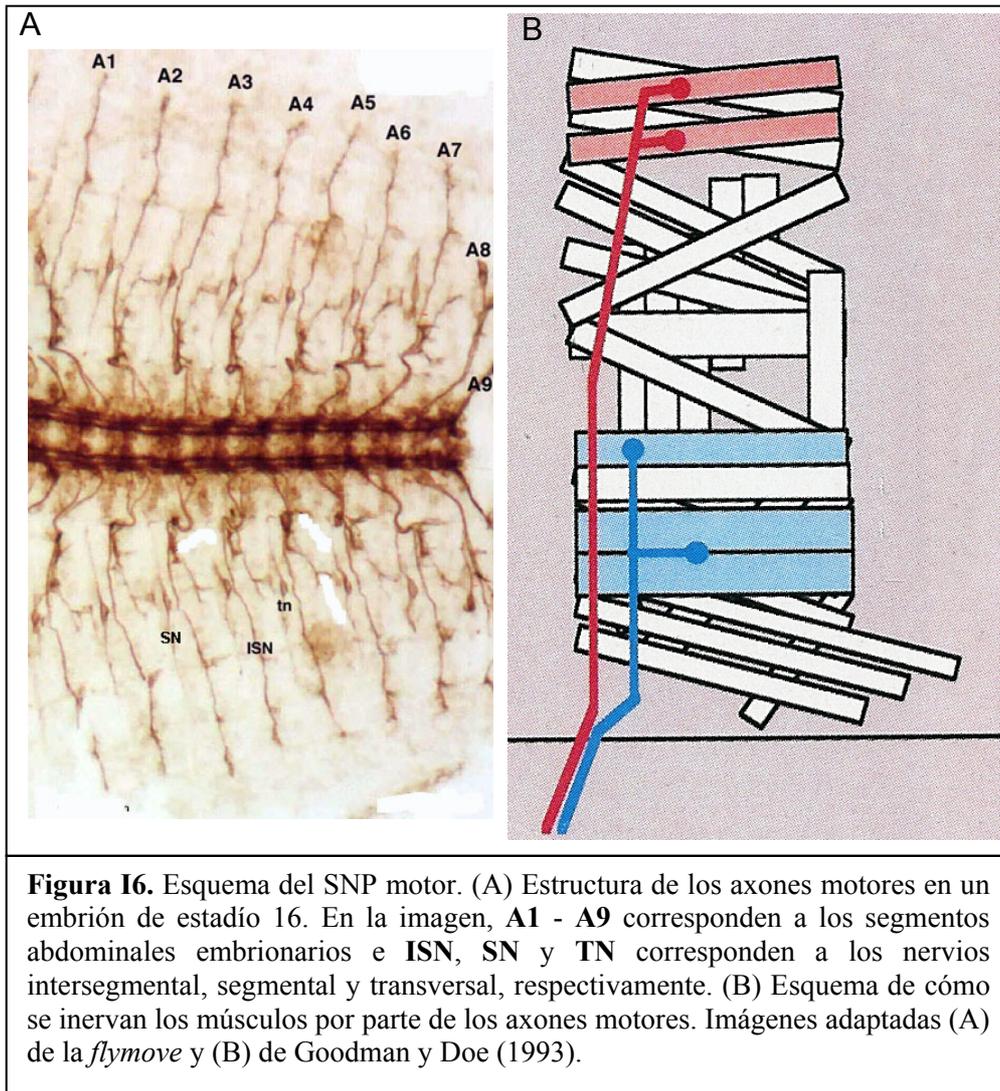


El componente motor.

Al igual que en el caso de los axones sensoriales, el crecimiento de los axones motores, se inicia en el estadio 13 del desarrollo embrionario. Landgraf *et al.* (1997) crearon un mapa embrionario de las motoneuronas, según su posición en el SNC y según los músculos diana a los que inervan. Las 70 motoneuronas de cada segmento derivan de unos pocos neuroblastos situados ventralmente en el ectodermo neural. Los axones de todas las motoneuronas de cada segmento abandonan el SNC a través de un punto común de salida en cada lado. Se han descrito 3 axones motores en cada hemisegmento: un axón intersegmental (ISN) en la parte más anterior del hemisegmento, un axón segmental (SN) en la región central y un pequeño nervio transversal (TN). Los axones motores SN están situadas en el mismo segmento de los músculos que inervan, mientras que los ISN se localizan en el segmento anterior (revisado en Keshishian *et al.*, 1996). Los axones ISN inervan músculos internos situados en la región más dorsal del hemisegmento, mientras que los axones SN y los TN inervan músculos externos de la región ventral y media respectivamente (figura I6).

La gran mayoría de las neuronas del sistema motor adulto son simples remodelaciones de su homólogo larvario, sólo que podrán desarrollar nuevas funciones. Es curioso observar cómo estas motoneuronas sobreviven, a pesar de que pierden temporalmente el músculo al que inervaban. Un caso especial son las motoneuronas de los músculos de las patas, ya que también proceden de una neurona larvaria aunque ésta carece de patas. Sólo cuando los músculos de la pata comienzan a desarrollarse se inicia el crecimiento axonal hacia ellos. Por otra parte, las neuronas que se histolizan en mayor cantidad son las del abdomen larvario, porque la función locomotora en el adulto cambia del abdomen al tórax durante la pupación (revisado en Tissot y Stocker, 2000).

Se ha demostrado, en muchos trabajos, que existe una íntima e intensa relación entre el desarrollo de los sistemas muscular y motor, tanto larvarios como adultos, de manera que cada uno necesita del otro para una correcta formación. Por ejemplo, músculos relacionados funcionalmente son inervados por neuronas motoras que comparten dominios de arborizaciones dendríticas aunque su linaje no sea el mismo (Landgraf *et al.*, 1997). También se ha visto que todos los axones motores necesitan de una serie de señales, proporcionadas por los músculos que se están formando en el embrión, para crecer en la dirección adecuada (revisado en Keshishian *et al.*, 1996). Recíprocamente, las neuronas motoras juegan un papel importante en la diferenciación de las fibras musculares y en otros sucesos del desarrollo muscular temprano como la división de los mioblastos (Fernández y Keshishian, 2005).



3.2 El sistema muscular de *Drosophila*.

3.2.1 Los derivados mesodérmicos.

El mesodermo deriva de un grupo de células situadas en la región más ventral del blastodermo celular, que se distinguen por coexpresar uniformemente los genes *twist* y *snail*. A partir del estadio 10, se empieza a compartimentar el mesodermo por la expresión modulada de diferentes genes. Por ejemplo, la expresión de *twist* empieza a segmentarse a lo largo del eje antero-posterior, con un dominio de baja expresión y otro de alta expresión en cada segmento. El mesodermo se divide entonces en cuatro dominios por segmento, cada uno de los cuales formará uno de los cuatro derivados mesodérmicos diferentes. La expresión del gen *tinman* en los dominios de alta expresión de *twist* señalará las células que formarán el corazón; las células que, situadas en las zonas de alta expresión de *twist*, no expresen ni *tinman* ni *bagpipe* formarán la musculatura somática; las células que expresen los genes *tinman* y *bagpipe* en el dominio dorsal de expresión baja de *twist* formarán el mesodermo visceral y las que lo hagan en el dominio ventral darán lugar al cuerpo graso (en Bate, 1993).

3.2.2 Formación y desarrollo del sistema muscular en *Drosophila*.

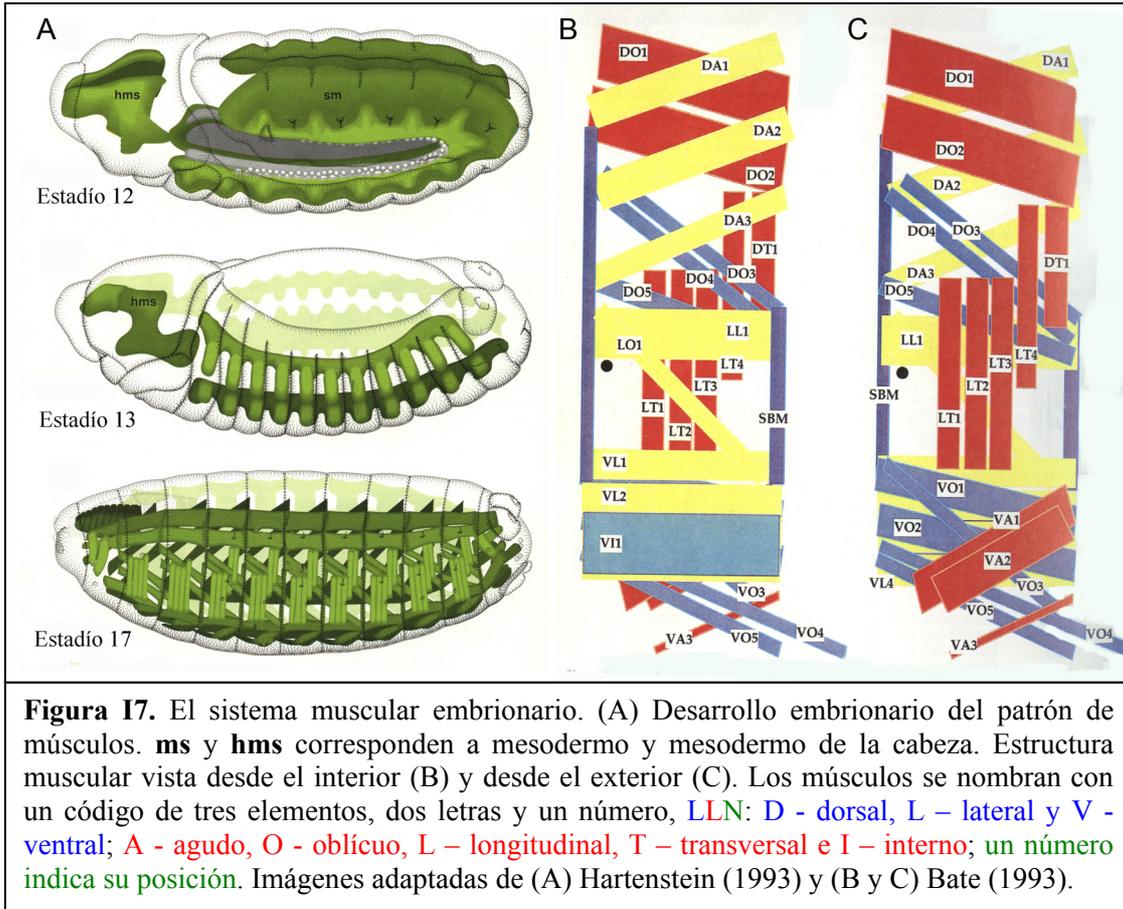
El mesodermo miogénico es el derivado mesodérmico más estudiado en *Drosophila*. Su especificación depende de la integración de la expresión de los genes *wingless* y *sloppy paired* en dominios de expresión elevada de *twist*. Es importante destacar que el gen *daughterless*, que está expresándose uniformemente en todo el embrión, es el responsable principal del establecimiento de los niveles críticos de *twist*.

Actualmente, la formación del patrón muscular de *Drosophila* se explica mediante la hipótesis de la célula fundadora (Frasch, 1999). Según esta hipótesis, cada fibra muscular se especifica a partir de una célula única o célula fundadora, que contiene la información sobre el tamaño, la orientación, la posición, etc. de un músculo en concreto. Junto a esta célula, se encuentran un conjunto de mioblastos indiferenciados y competentes para la fusión, que se fusiona a la célula fundadora para dar lugar al músculo final.

Una vez se han determinado las zonas del mesodermo somático, se activa la expresión del gen proneural *letal of scute* en un conjunto de células que darán lugar a las células llamadas progenitoras de los músculos somáticos, las cuales, a su vez, son las precursoras de las células fundadoras.

Para cada subgrupo de músculos, los progenitores y las células fundadoras comparten la expresión de una serie de genes como, por ejemplo, *slouch*, *ladybird* y *Krüppel*, que le confieren una identidad individual. Cada progenitor se divide asimétricamente en dos células fundadoras. Esta división asimétrica implica un mantenimiento diferente de la expresión de los genes de identidad en cada una de las dos. Por ejemplo, un progenitor que expresa *Krüppel* y *slouch* genera dos células fundadoras: una de ellas expresa los dos genes, mientras que la otra no lo hace, dando lugar a dos músculos distintos, en concreto VA1 y VA2 respectivamente. Así pues, la expresión diferencial de genes de identidad concretos va a determinar la diferenciación particular de cada músculo. La diferenciación depende de nuevo de la expresión de toda una red de genes, aún bastante desconocida. La determinación de la identidad de cada músculo y el proceso de fusión empiezan en los estadios 12 y 13. La fusión se inicia con la expresión de dos proteínas transmembrana diferentes, “Dumdfounded” en las células fundadoras y “Sticks and stones” en las competentes para la fusión. Ambas proteínas promueven el contacto entre las dos células y permiten que la maquinaria de fusión las una (revisado en Baylies y Michelson, 2001, y Dworak y Sink, 2002).

En el estadio 17, el sistema muscular larvario está totalmente establecido (figura I7-A). El esqueleto muscular de *Drosophila* consiste en un esqueleto de fibras únicas y multinucleadas que se anclan a la cutícula. Los músculos forman un complejo patrón de 30 fibras por hemisegmento. Cada una de las fibras es única por su tamaño, orientación, posición, inervación y lugar de anclaje (figura I7-B y C).



La formación de la musculatura adulta ha sido analizada en profundidad en el trabajo de Roy y VijaRaghavan (1999). Dicha musculatura se formará, casi por completo, a partir de unos conjuntos de células derivadas del mesodermo embrionario y que se caracterizan por mantener la expresión del gen *twist* hasta la pupación. Estas células se han identificado en diferentes partes de la larva: grupos de 6 células en cada hemisegmento abdominal y abundante cantidad en los segmentos torácicos. Además, estas células se encuentran asociadas, en los diferentes segmentos, a estructuras del SNP y a los discos imaginales. Llegado el momento, un gran número de genes comienzan a expresarse en estos mioblastos adultos para iniciar los procesos de formación de la musculatura adulta, pero este mecanismo no ha sido estudiado con tanta profundidad como en el caso del establecimiento de la musculatura embrionaria. Al inicio de la pupación, la mayoría de los músculos larvarios se histolizan y son eliminados por fagocitosis. Sin embargo, existe un reducido grupo de músculos abdominales que escapan al proceso de histolisis, porque son necesarios para la emersión y desaparecen inmediatamente después del nacimiento del adulto (en Hartenstein, 1993).

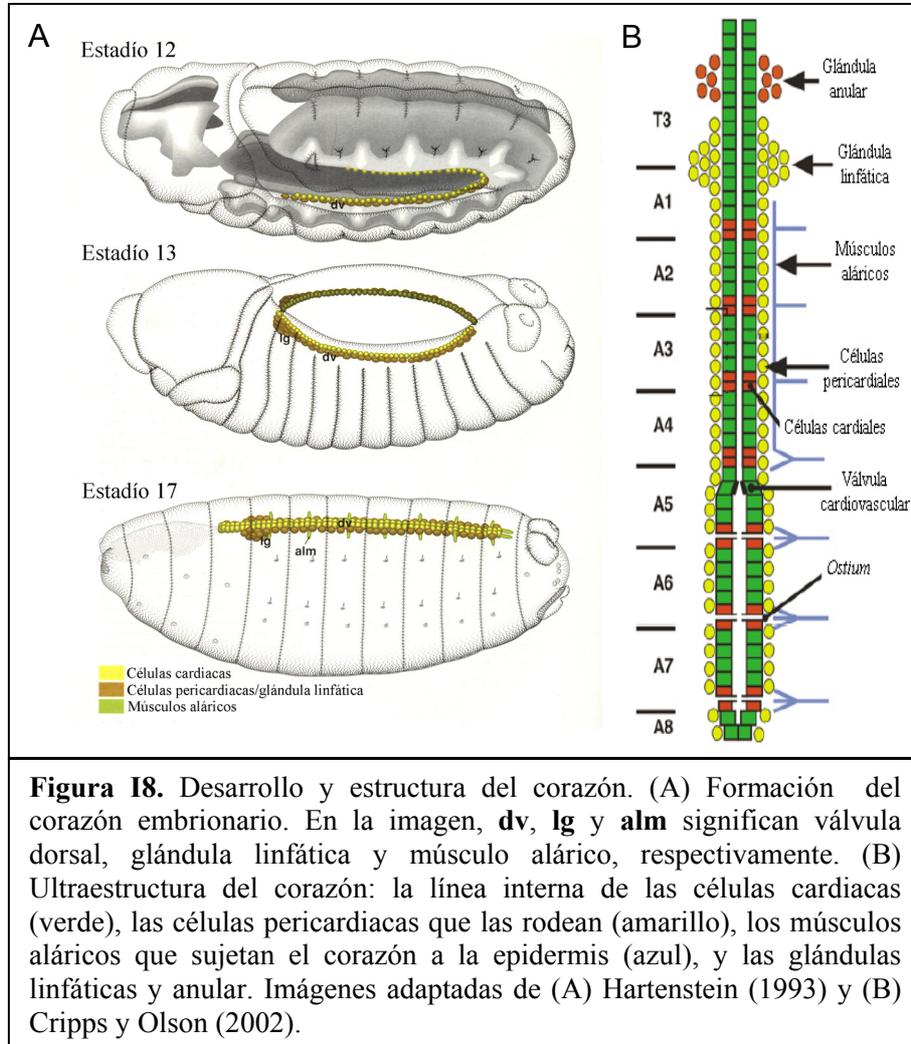
Los músculos del tórax y abdomen se forman desde los mioblastos situados en estos segmentos. Los músculos del vuelo, tanto directos como indirectos, se forman a partir de los mioblastos asociados a los discos de ala y los músculos de las patas y el músculo del salto se generan desde los mioblastos que se encuentran en los discos de pata.

3.2.3 Formación y desarrollo del corazón de *Drosophila*.

La formación del corazón de *Drosophila* comienza con el solapamiento de la expresión de los genes *twist* y *tinman* en el mesodermo durante el estadio 10, determinándose el dominio mesodérmico que formará esta estructura. En el estadio 11 o 12, dicha expresión se restringe a dos líneas de células mesodérmicas, las células cardíacas y pericardíacas, que desde el estadio 13 comienzan a migrar dorsalmente (en Hartenstein, 1993). En el estadio 17, una vez se ha completado el cierre dorsal, las dos líneas de células cardíacas se fusionan para adquirir la estructura tubular final y surgen los músculos alárícos que anclan el corazón a la epidermis (figura I8-A). La diferenciación de los cardiomiocitos y el proceso de formación del corazón dependen de la acción de múltiples genes y señales, gran parte de los cuales se describen en Cripps y Olson (2002).

El corazón embrionario de *Drosophila* es un simple tubo lineal, situado en la parte media dorsal del embrión, que bombea la hemolinfa a toda la cavidad embrionaria o larvaria (revisado en Bodmer y Venkatesh, 1998). El corazón presenta dos partes bien diferenciadas: la posterior, más ancha, que es propiamente el corazón y la parte más estrecha denominada aorta. Estas dos partes están separadas por un par de células que forman la válvula cardiovascular. En el corazón embrionario encontramos dos tipos de células: las células cardíacas más internas, que forman la luz del corazón, que tienen función contráctil y que expresan proteínas típicas musculares y las células pericardíacas más externas, de origen no miogénico y cuya función parece relacionada con la filtración de la hemolinfa (Su *et al.*, 1999). El número de células pericardíacas es menor en los segmentos anteriores del corazón, donde está rodeado por estructuras accesorias llamadas glándula anular y glándulas linfáticas. Éstas últimas son las encargadas de producir la hemolinfa (figura I8-B).

La estructura embrionaria se mantiene intacta durante el desarrollo larvario, pero sufrirá, durante la pupación, la degeneración y la reorganización de parte de su estructura junto con el reclutamiento de células específicas adultas. Durante esta fase se pierde la expresión del gen *tinman* en las partes del corazón que se encuentran en los segmentos A6-A8. Estos segmentos se histolizan y, a partir de los segmentos anteriores, se forman las nuevas secciones posteriores del corazón adulto, que cubrirán unos pocos segmentos más que el corazón larvario. En este momento, desde los mioblastos surgen también nuevas fibras longitudinales para reemplazar los músculos alárícos larvarios. Finalmente, el corazón adulto se divide en la aorta, correspondiente a la parte anterior del órgano, que se extiende a lo largo del tórax hacia la cabeza, y el corazón contráctil situado en la parte posterior y que se ubica en la parte más dorsal del abdomen (en Bate, 1993).



4. Estrategias experimentales para el estudio de la función génica en *D. melanogaster*.

La secuenciación completa del genoma de diferentes organismos modelo ha permitido identificar que un importante porcentaje de genes está altamente conservado en secuencia y/o función a lo largo de la evolución. Es lógico suponer que los estudios funcionales en dichos organismos aportarán información aplicable a organismos superiores como el ser humano.

El conocimiento de la función de los genes depende de la información que se posea sobre su patrón de expresión y su localización subcelular, pero ante todo, de la obtención de mutantes en los que se altere su actividad.

A lo largo del siglo de historia de *D. melanogaster* como modelo de estudios genéticos, se han desarrollado numerosas estrategias para la obtención de fenotipos alterados por pérdida o ganancia de la función génica. Dentro de las estrategias más clásicas, destaca la utilización de los agentes químicos y de las radiaciones ionizantes. Los primeros son más apropiados para generar mutaciones puntuales o pequeñas deleciones, mientras que las radiaciones son más eficientes a la hora de provocar grandes reordenamientos cromosómicos (en Greenspan, 1997). Se han empleado varios agentes químicos como, por ejemplo, etilnitrosourea (ENU), metilmetanosulfonato (MMS), formaldehído o etilmetanosulfonato (EMS) (Lewis y Bacher, 1968). A las dosis normales de aplicación, los resultados obtenidos, para un locus determinado, son en promedio de una mutación por cada 1000 cromosomas analizados (en Greenspan, 1997 y Ashburner, 2004). En cuanto a las radiaciones ionizantes, se han empleado sobre todo tres tipos: los rayos X, los rayos gamma y la radiación ultravioleta.

Estas estrategias más clásicas presentan evidentes limitaciones que se han intentado superar con el desarrollo de técnicas útiles para llevar a cabo experimentos de genética molecular en *Drosophila*. Estas técnicas incluyen el uso de elementos transponibles modificados, la posibilidad de obtener individuos transgénicos, la generación de un sistema versátil para la sobreexpresión de genes, la supresión específica de genes mediante ARN de interferencia, etc.

4.1 Mutagénesis insercional mediante elementos transponibles P.

Los elementos transponibles han sido ampliamente empleados en la manipulación genética en bacterias. Sin embargo, este potencial es mucho menor en eucariotas superiores, por la presencia de un alto número de copias de cada elemento transponible en su genoma y por la baja movilidad de la mayoría de ellos. Una excepción es la familia de pequeños transposones no retrovirales de *D. melanogaster* llamados elementos P (en Rubin, 1983), ya que muchas cepas de laboratorio de *Drosophila* carecen de ellos.

El elemento P fue aislado como responsable del fenómeno de la disgénesis híbrida, en el que se observaban elevados porcentajes de mutación, reordenamientos cromosómicos, recombinación y esterilidad en los machos, dependientes de la temperatura (en Kidwell, 1977). El elemento P pertenece a la clase de elementos transponibles que se transponen vía ADN generando, al insertarse en el sitio receptor, una duplicación de 8pb (O'Hare y Rubin, 1983). Tiene un tamaño de 2907 pares de bases y contiene un gen con cuatro exones, que codifica por procesado alternativo la enzima transposasa y su propio represor, y repeticiones terminales invertidas necesarias para la transposición (O'Hare y Rubin, 1983).

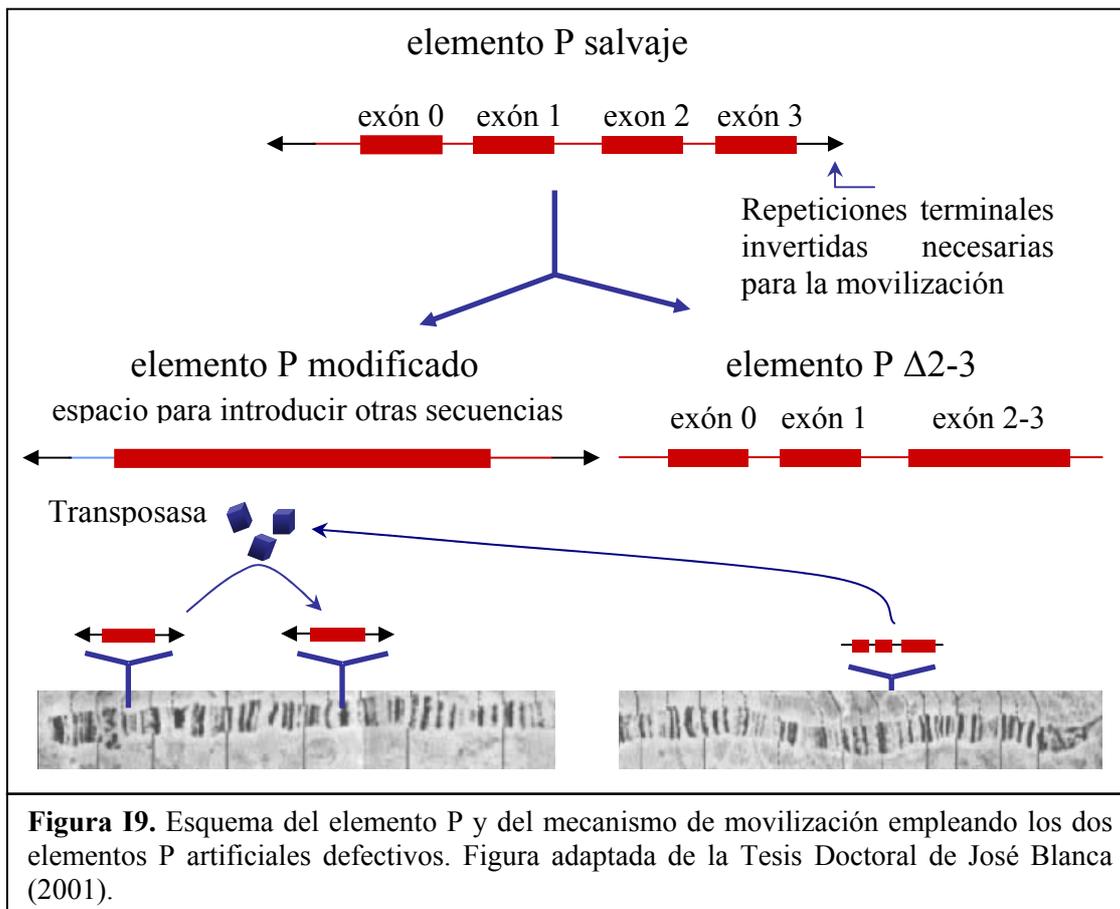
La transposición ocurre únicamente a lo largo del desarrollo de la línea germinal, ya que sólo en ella se procesa el intrón entre los exones 2 y 3, produciéndose el ARNm que codifica para la transposasa de 87kDa (Kaufman y Rio, 1991). En la línea somática se produce una enzima de 97kDa que impide el procesamiento del intrón 2 (Tseng *et al.*, 1991) generándose una proteína de 66kDa que actúa como represor (Lemaitre *et al.*, 1993).

Las primeras tentativas de movilización emplearon cepas naturales que contenían un elevado número de elementos P. Las líneas mutantes, generadas tras la movilización, no fueron útiles en estudios genéticos ya que contenían una gran cantidad de elementos no deseados que causaban mutaciones no controladas (en Kidwell, 1986). Por ello, el elemento P requería de una serie de modificaciones que afectasen a su estructura, número de copias y capacidad de movilización para ser realmente útil como herramienta de mutagénesis.

Sin embargo, lo que realmente catalizó el uso de *D. melanogaster* como organismo modelo, fue el desarrollo de un sistema que permitiera la integración estable de ADN en la línea germinal de *Drosophila* (Rubin y Spradling, 1982). El sistema emplea un vector, derivado del elemento P, para la transformación de embriones mediante inyección en las células polares. El gran éxito de esta técnica facilitó, y sigue facilitando, la generación de un gran número de herramientas basadas en este elemento transponible. La mejor estrategia ha resultado ser la división de las propiedades del transponible natural en dos tipos de elementos P defectivos diferentes. Uno de ellos actuará de fuente de transposasa, pero será incapaz de transponerse porque carecerá de las repeticiones terminales invertidas, y el otro podrá transponerse al disponer de tales repeticiones, pero necesitará un aporte externo de transposasa al no codificar dicho enzima (figura I9).

El elemento $P\{ry^+ \Delta 2-3\}(99B)$ es uno de los elementos más utilizados como fuente de transposasa. Es muy estable genómicamente y capaz de codificar la transposasa, tanto en las células germinales como en las somáticas (Robertson *et al.*, 1988). En el segundo tipo de elemento P defectivo, se han mantenido las repeticiones terminales del P original y, en lugar de los 4 exones, se han ido introduciendo distintas secuencias según las necesidades del investigador: un vector que permite clonar secuencias adyacentes al elemento y así conocer su localización (Pirrota *et al.*, 1985), genes marcadores como el gen *lacZ* de *E. coli*, que sirve para identificar y aislar secuencias activadoras en la región de inserción del elemento (O’Kane y Gehring, 1987), secuencias para dirigir la expresión de genes en tejidos específicos durante el desarrollo (Brand y Perrimon, 1993), marcadores fenotípicos como los de color de ojos (gen *rosy*, Rubin y Spradling, 1983 y gen *white*, Pirrota *et al.*, 1985), secuencias UAS para realizar la expresión ectópica de secuencias contiguas (Rorth, 1996 y Rorth *et al.*, 1998) y un largo etcétera.

Con cada uno de los dos tipos de elementos defectivos, se ha generado una línea transgénica diferente (Rubin y Spradling, 1982) y sólo al cruzar ambas líneas se produce la movilización en su descendencia del elemento transponible (figura I9).



En principio se pensaba que la inserción de los elementos P a lo largo del genoma de *D. melanogaster* se producía de forma aleatoria. Sin embargo, se ha ido observando la existencia de regiones o de secuencias con características particulares que les confieren cierta preferencia para la inserción de un elemento P:

- Las secuencias que contienen el octámero GGCCAGAC, tienen más probabilidad de sufrir inserciones de elementos P (O'Hare y Rubin, 1983).
- La eucromatina es alcanzada con mayor frecuencia que la heterocromatina (Berg y Spradling, 1991).
- Los elementos P tienden a insertarse en, o cerca de, otros elementos P (Eggleston, 1992).
- Se ha observado transposición intracromosómica preferencial, a sitios cercanos a la inserción original, entre 0 y 50kb (transposición local), y en dirección opuesta (Tower *et al.*, 1993).
- También se ha detectado un gran número de eventos de movilización al cromosoma homólogo, pero nunca a menos de 50kb de la inserción original (Tower y Kurapati, 1994).
- Los elementos P se transponen preferentemente en el extremo 5' no traducido de los genes (revisado en Spradling *et al.*, 1995).
- Las secuencias con un elevado contenido en GC presentan cierta preferencia en la inserción de estos elementos (Liao *et al.*, 2000).

Todo esto implica la existencia, en el genoma de *D. melanogaster*, de puntos calientes para la inserción de este tipo de elementos. Se ha definido como punto caliente, aquella zona genómica de 50kb que contiene al menos 30 inserciones diferentes (Thibault *et al.*, 2004). Son puntos calientes, por ejemplo, las regiones que contienen al gen *CG9894* con unas 1080 inserciones, al gen *cpo* con 220 o al gen *lola* con 110. Por el contrario, existen grandes huecos con total ausencia de inserciones, como son los complejos *Antennapedia* y *Bithorax* (Bellen *et al.*, 2004).

En 1988, Cooley *et al.* mostraron que un elemento P modificado artificialmente podía ser movilizado a gran escala, para generar miles de líneas mutantes estables. Ello permitió que, simultáneamente al desarrollo del Proyecto de Secuenciación del Genoma de *D. melanogaster*, se pusiera en marcha un Proyecto de Disrupción de Genes mediante elementos transponibles, generándose una colección de líneas de *Drosophila*, cada una con un único elemento P artificial insertado en una región definida del genoma (revisado en Spradling *et al.*, 1995). La localización de estos elementos se estableció mediante hibridación *in situ* en cromosomas politénicos y por PCR inversa o rescate plasmídico en aquellos casos en los que fue posible.

En un primer momento, se generaron unas 3000 líneas que afectaban al 25% de los genes esenciales de *D. melanogaster*. Dicho porcentaje no pudo ser incrementado con el paso de los años, a pesar de que, con la incorporación de mejoras en la técnica, se esperaba conseguir un número de genes afectados del 87%, (Spradling *et al.*, 1999). Para conseguirlo, ha sido necesario el empleo de otros elementos transponibles, como el *P{wHy}* basado en el transponible *hobo*, con el cual se han generado unas 1400 líneas (Bellen *et al.*, 2004), o el elemento *piggyBac*, del virus de la polilla del repollo.

Sumando los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios (figura I10) se ha podido alcanzar la cifra del 40% de genes de *D. melanogaster* afectados (Bellen *et al.*, 2004). Este porcentaje se vería muy incrementado si se incluyen los resultados de todos los laboratorios que han ido generando, de manera independiente, sus propias colecciones de inserciones (Hayashi *et al.*, 2002, Parks *et al.*, 2004, Thibault *et al.*, 2004 y Ryder *et al.*, 2004, a lo largo de todo el genoma; Bourbon *et al.*, 2002, Peter *et al.*, 2002 y Beinert *et al.*, 2004, para el cromosoma X), y la colección propiedad de la empresa coreana GenExel Inc. En conjunto, supone un total de más de 150.000 líneas de *Drosophila* diferentes, muchas de ellas accesibles a través de la página web de la *flybase* (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) o en el laboratorio de Artavanis-Tsakonas en el Departamento de Biología Celular de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard (<http://drosophila.med.harvard.edu/>).

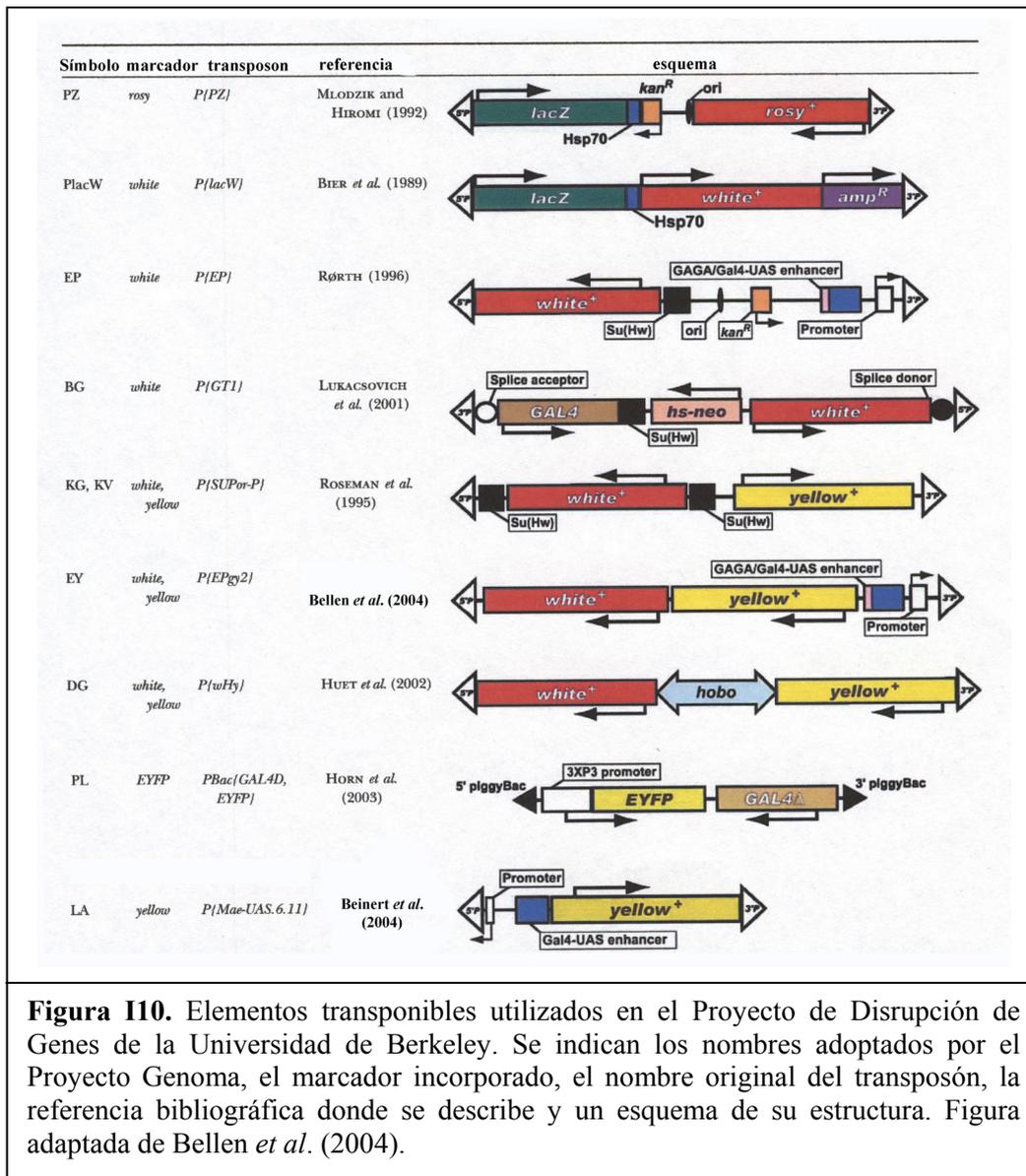


Figura I10. Elementos transponibles utilizados en el Proyecto de Disrupción de Genes de la Universidad de Berkeley. Se indican los nombres adoptados por el Proyecto Genoma, el marcador incorporado, el nombre original del transposón, la referencia bibliográfica donde se describe y un esquema de su estructura. Figura adaptada de Bellen *et al.* (2004).

4.2 P homing.

Una mejora de la mutagénesis insercional, conocida como P *homing*, aumenta la especificidad de inserción de los elementos transponibles en o muy cerca del gen que se desea modificar (*homing*). Este objetivo es posible si en el interior del vector se incorpora un fragmento de ADN correspondiente a las secuencias reguladoras del gen en cuestión. El método ha dado buenos resultados con el gen *engrailed* (Hama *et al.*, 1990 y Whiteley y Kassis, 1997), con los genes de los complejos *Antennapedia* y *Bithorax* (Bender y Hudson, 2000) y con el gen *linotte* (Taillebourg y Dura, 1999), entre otros.

En todos los casos, se ha obtenido entre un 10% y un 20% de inserciones en el gen de interés, muchas de ellas en la misma región. Se sabe que el resultado se debe a una inserción del vector, y no a una recombinación entre las secuencias génicas que incorpora y las secuencias homólogas del cromosoma, porque también está presente la típica duplicación de 8pb de ADN genómico que generan los elementos P al insertarse, cuyos extremos están presentes en este tipo de vectores (Taillebourg y Dura, 1999).

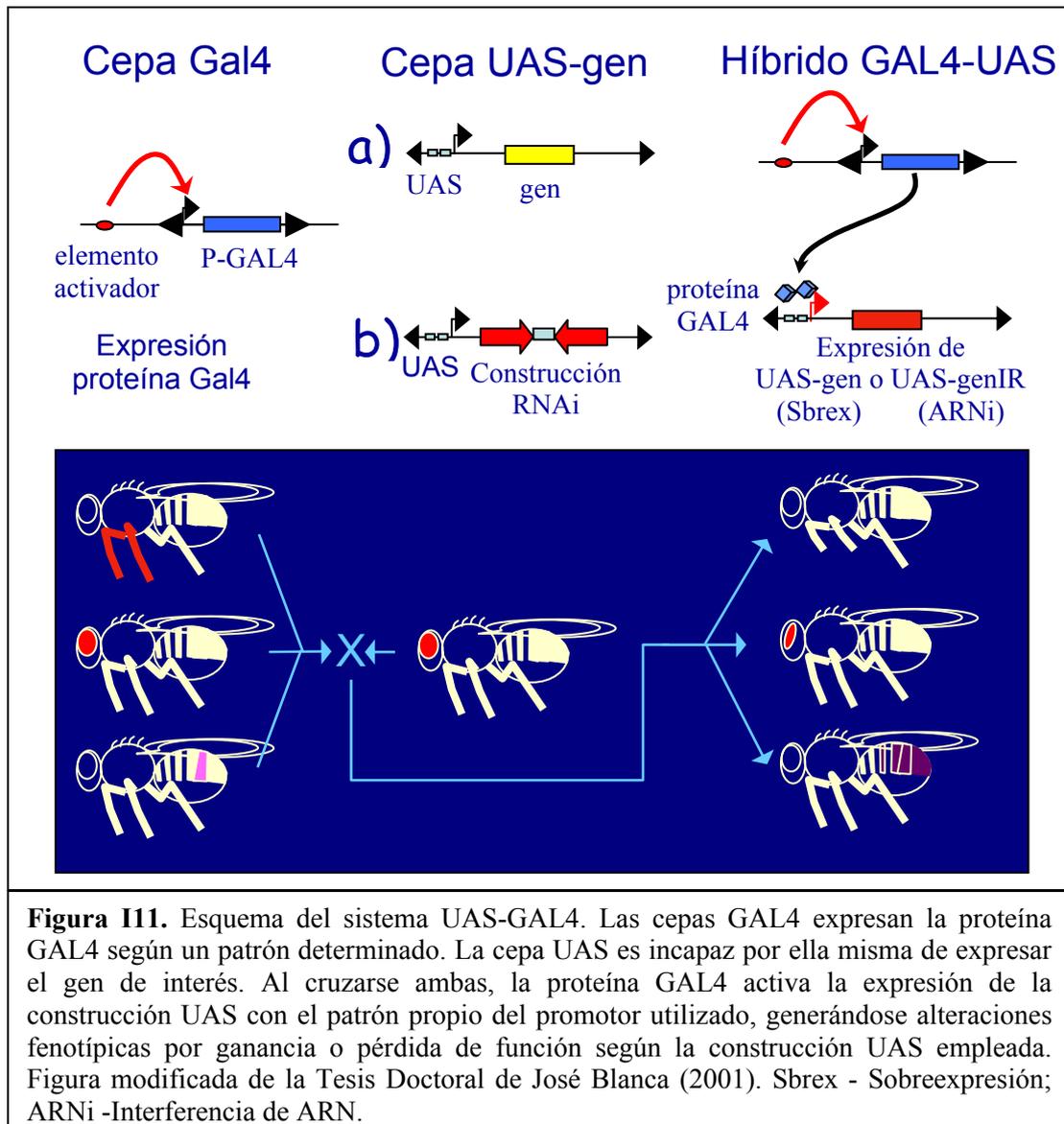
La especificidad del mecanismo del P *homing* se desconoce, pero se sugiere la existencia de una serie de proteínas que se unen al ADN clonado y a su homólogo en el ADN genómico, y que interactúan entre sí para acercar ambas secuencias. Se postula que si la inserción es más o menos específica es porque las proteínas que interactúan también lo serán para este tipo de mecanismo (Bender y Hudson, 2000).

4.3 El sistema UAS-GAL4.

El sistema UAS-GAL4 es originario de levadura. En este organismo, la transcripción de los genes se regula mediante la unión de proteínas GAL a una serie de secuencias activadoras de la transcripción, denominadas UAS, situadas en el promotor de los genes de levadura y que son imprescindibles para un inicio eficiente de la transcripción.

Webster *et al.* (1988) comprobaron que estos dos elementos de *S. cerevisiae*, la proteína GAL4 y las secuencias UAS_G, eran capaces de activar la transcripción en cultivos celulares de mamíferos. Por su parte, Fisher *et al.* (1988) fueron los primeros en demostrar el funcionamiento de esta pareja de elementos en *Drosophila*. No obstante, fueron Brand y Perrimon (1993) quienes desarrollaron ampliamente este sistema binario en la mosca, creando dos tipos de líneas: la línea *driver* y la línea *responder*. Se construyeron varios vectores derivados del elemento P para, por un lado, clonar el gen de la proteína GAL4 tras un promotor o permitir la identificación de secuencias intensificadoras en el genoma (líneas *driver*) y, por otro lado, para incorporar el gen de estudio bajo el control de las secuencias UAS (líneas *responder*). Al separar el gen de estudio de su activador transcripcional se consigue que ambas líneas sean viables, y que sólo en la descendencia del cruce entre ellas se puedan observar los efectos de la modificación de la expresión del gen en cuestión (figura I11).

Este sistema ha resultado de gran utilidad para el estudio de la función génica, ya que, expresar un gen en una cantidad mayor de la fisiológica (sobreexpresión), expresarlo en un momento del desarrollo en el que no se expresa o en células o tejidos diferentes (expresión ectópica), puede aportar mucha información sobre el papel de dicho gen. Esta estrategia se ha aplicado también en aquellos casos en los que la pérdida de función no ha generado ningún fenotipo o no ha sido posible obtener mutantes estructurales. De hecho, se calcula que alrededor de dos tercios de los genes de *Drosophila* no van a mostrar un fenotipo obvio por pérdida de función (revisado en Miklos y Rubin, 1996).



Con el tiempo, se han ido introduciendo modificaciones que han permitido flexibilizar más el sistema y aumentar el control de la expresión de la proteína GAL4 (revisado en Duffy, 2002 y McGuire *et al.*, 2004). Actualmente, es posible controlar el momento exacto del inicio de la inducción génica y así poder evitar la letalidad provocada por expresiones tempranas. Para ello han sido muy útiles una serie de avances como:

- ✓ La introducción del sistema FLP-FRT para controlar la expresión, tanto de la construcción GAL4 como de la construcción UAS. La recombinasa FLP se caracteriza por provocar la recombinación entre dos secuencias específicas denominadas FRT. Se han generado una serie de casetes en los que, entre dos secuencias FRT, se introducen terminadores de la transcripción. Dicho casete se coloca entre las secuencias UAS y el gen bajo su control, o entre el gen de la proteína GAL4 y el promotor que la controla. Mediante choque térmico se controla en qué momento se expresa el gen de interés, al inducirse de esta manera la expresión de la proteína FLP que eliminará el casete que bloquea la expresión del sistema.

- ✓ La incorporación de los sistemas *Tet-On* o *Tet-Off*. Se coloca una versión modificada del transactivador sensible a la tetraciclina (rtTA-M2-alt) tras las repeticiones UAS, y el gen de interés bajo el control de las secuencias TetO. Sólo en presencia de tetraciclina o doxiciclina se activa la transcripción.
- ✓ El uso de receptores hormonales. Se han empleado los receptores de estrógenos y de la progesterona para regular la expresión de la proteína GAL4 y únicamente la adición del ligando adecuado inicia la expresión del conjunto.

El sistema UAS-GAL4 permite también la obtención de fenotipos por pérdida de función. La única diferencia reside en la construcción colocada tras las secuencias UAS (figura I11-B). En este sentido, recientemente, se ha combinado este sistema con la técnica de interferencia de ARN, generándose una nueva y poderosa herramienta para el silenciamiento de genes de modo específico, en los tejidos y células que se desee.

4.4 Silenciamiento génico mediante interferencia de ARN.

La interferencia de ARN (ARNi) fue descubierta al advertir que la inyección de moléculas de ARN anti-sentido o con-sentido de un gen provocaban, en *C. elegans*, la aparición de los mismos mutantes (Fire *et al.*, 1991; Guo y Kemphues, 1995). Los autores comprobaron que, en ambos experimentos, se generaban moléculas de ARN de doble cadena (ARNds) gracias a la presencia de promotores crípticos en los transgenes. Montgomery *et al.* (1998) concluyeron que eran las moléculas de ARNds las que destruían de manera catalítica el mensajero endógeno, pero no cualquier mensajero, sino específicamente aquel de secuencia complementaria a la estructura de doble cadena; y además, que la reacción tenía lugar con cantidades subestequiométricas del ARNds. El silenciamiento por ARNi es de aplicación muy sencilla en *C. elegans* ya que sólo requiere alimentar a los gusanos con bacterias que expresen el ARNds específico (Timmons y Fire, 1998) o empaparlos en una solución de dicho ARNds (Tabara *et al.*, 1998).

Esta técnica fue adaptada rápidamente para su uso en *D. melanogaster*. Inicialmente, se microinyectó el ARNds en los embriones, pero el efecto era bastante variable y en algunos genes se limitaba a la zona de la inyección (Kennerdell y Carthew, 1998; Misquitta y Paterson, 1999). También se ha probado la inyección en el abdomen de los adultos, obteniéndose cierto éxito en tejidos como el sistema nervioso (Dzitoyeva *et al.*, 2001). Muchos de los problemas en *Drosophila* se han superado al combinar la técnica de ARNi y el sistema UAS-GAL4. La primera aproximación, en este sentido, consistió en clonar en el *pUAST* dos copias invertidas del gen en cuestión, de modo que el ARNds se expresara como una horquilla extendida (Kennerdell y Carthew, 2000). Sin embargo, este tipo de construcciones eran muy difíciles de conseguir por la gran inestabilidad que manifiestan cuando se introducen en las bacterias para obtener múltiples copias. Se ha logrado aumentar la estabilidad de las construcciones introduciendo un espaciador entre las dos copias invertidas (Piccin *et al.*, 2001 y Negeri *et al.*, 2002), clonando la estructura genómica en sentido contrario al ADNc del gen (Kalidas y Smith, 2002) o incluso empleando una cepa bacteriana especial, que aumenta la estabilidad de secuencias que contienen repeticiones invertidas (Enerly *et al.*, 2002).

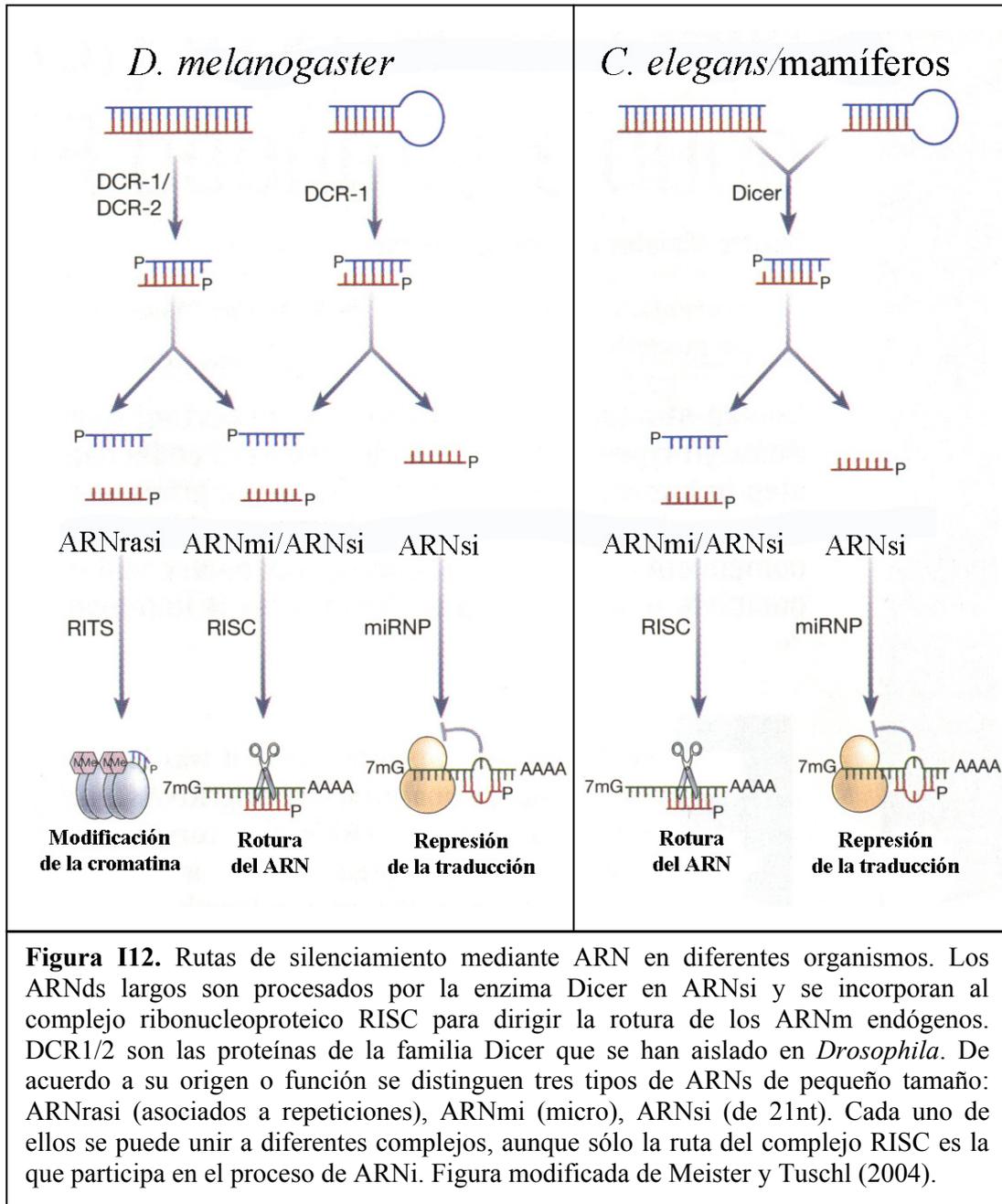
Otros autores han ido generando nuevos vectores que faciliten la formación de la estructura de doble cadena, como el vector *Sym-pUAST* con dos copias de las secuencias UAS (Giordano *et al.*, 2002), o el vector *pWIZ*, que incluye como espaciador un intrón con las secuencias consenso de procesamiento de *Drosophila* (Lee y Carthew, 2003).

El sistema se ha empleado también para eliminar la expresión de genes en otros organismos como *Trinaposoma brucei*, planarias, pez cebra y ratón (revisado en Boshier y Labouesse, 2000).

En el mecanismo de interferencia de ARN participan un número importante de genes, muy conservados, en los diferentes organismos en los que se ha descrito (*C. elegans*, *D. melanogaster* y mamíferos), así como en otros procesos de silenciamiento como el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) en las plantas, la represión en los hongos y la cosupresión en *Drosophila* y en plantas.

Este mecanismo es bastante complejo, pero se puede resumir en la acción de una ARN endonucleasa tipo 3, denominada Dicer, sobre el ARN de doble cadena para generar unos fragmentos pequeños, de 21 nucleótidos, llamados ARNsi, verdaderos agentes catalizadores del proceso. Estos ARNsi son recolocados en el interior de un complejo ribonucleoproteico llamado RISC. El complejo, guiado por los ARNsi, provoca la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del mensajero endógeno (revisado en Meister y Tuschl, 2004). En la figura I12 se muestra un esquema de los mecanismos de silenciamiento que emplean moléculas de ARN en *Drosophila*, *C. elegans* y mamíferos.

Se ha sugerido que la interferencia de ARN es un mecanismo ancestral que juega un importante papel en procesos como el control de la actividad de los elementos transponibles, la respuesta antiviral, la formación de la heterocromatina, la meiosis, la mitosis, el desarrollo y ciertas enfermedades humanas como el cáncer (revisado en Geley y Muller, 2004).



4.5 Técnicas más recientes.

4.5.1 Knock-out.

El hecho de que la mutagénesis insercional no tenga éxito a la hora de afectar a todos los genes y que la interferencia de ARN no sea, en general, de utilidad para generar alelos nulos, hizo necesario el desarrollo de alguna técnica semejante al *knock-out* empleado en los ratones. En *Drosophila* no se ha descrito un mecanismo de recombinación homóloga entre un ADN exógeno y su equivalente genómico, pero se han desarrollado las herramientas necesarias para llevar a cabo este tipo de estrategia, empleando la maquinaria celular interna de reparación de ADN (Rong y Golic, 2000).

El método consta de tres partes: un transgen que expresa la recombinasa específica FLP, otro que expresa la endonucleasa específica I-SceI y un tercero que posee sitios de unión de ambas enzimas (secuencias FRT y el punto de corte) y el ADN homólogo al gen a mutar. Se generan dos líneas transgénicas diferentes: una que incorpora las dos enzimas y otra con los sitios de unión de ambas enzimas y la secuencia de ADN homólogo. Ambas líneas se cruzan entre sí y, mediante choque térmico, se activan en la descendencia las dos actividades enzimáticas (Rong y Golic, 2000). De esta forma se genera un fragmento lineal, con una rotura en las dos cadenas de ADN, que activa la maquinaria de recombinación celular.

Se han desarrollado dos variantes diferentes de la técnica: el método *ends-in* o inserción de una copia modificada (Xie y Golic, 2004) y el método *ends-out* o reemplazamiento de la copia genómica (Gong y Golic, 2003). La primera variante se ha aplicado con éxito en unos 17 genes y la segunda al menos en tres casos (revisado en Venken y Bellen, 2005).

No obstante, para aumentar su rendimiento, el método debe incorporar mejoras que reduzcan el número de individuos a analizar.

4.5.2 Inducción dirigida de lesiones locales o TILLING.

Este método se basa en la capacidad para detectar de forma rápida cambios en genes específicos, provocados por la acción de agentes químicos. El protocolo se inicia con un experimento de mutagénesis empleando etilmetanosulfonato (EMS). Los machos mutagenizados se cruzan con una línea con dos cromosomas equilibradores para retener mutaciones letales en el cromosoma que interesa. Los machos descendientes de este primer cruce se cruzan de nuevo con la línea equilibrada y en la siguiente generación, se establecen las líneas mutantes al cruzar individuos hermanos. Cada línea se cruza entonces con la línea original, se extrae el ADN de toda la descendencia y se lleva a cabo, en cada línea, una reacción de PCR del gen diana empleando cebadores específicos. Cada fragmento de PCR se calienta y se enfría muy despacio para permitir la formación de fragmentos mixtos en los que una de las hebras es salvaje y la otra mutante. Los fragmentos se someten a digestión con la endonucleasa CEL1 que corta específicamente en los desapareamientos de una sola hebra. Los fragmentos digeridos se corren en geles de secuenciación para visualizar la migración diferencial del fragmento mutado. La secuenciación posterior identifica la lesión molecular. Para un gen que codifica una proteína de tamaño medio (30-50kDa), se aíslan unas 10 mutaciones en un rastreo de 2000 líneas diferentes (revisado en Venken y Bellen, 2005).

5. La ataxia de Friedreich

5.1 Aspectos generales.

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica recesiva. Es la más común de las ataxias hereditarias, con una prevalencia en la población caucásica de entre 2 y 4 afectados por cada 100.000 habitantes (revisado en Delatycki *et al.*, 2000).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1863 por el Dr. Nicolas Friedreich. Esta patología se caracteriza clínicamente por un inicio temprano (pacientes menores de 25 años). Los síntomas más frecuentes son: ataxia progresiva de las extremidades y de la marcha, disartría, pérdida sensorial, ausencia de los reflejos osteotendinosos, debilidad muscular, escoliosis y aumento del riesgo de padecer diabetes mellitus (Harding, 1981). La AF provoca en el SNC degeneración de los cordones posteriores de la espina dorsal, junto con atrofia de los tractos espinoocerebelosos. Las neuronas motoras permanecen intactas, no así las extensiones motoras corticoespinales. En el SNP, se detecta la pérdida de las neuronas sensitivas grandes en los ganglios de las raíces dorsales y una polineuropatía de los axones sensoriales mielinizados. El componente motor de este sistema no se ve afectado.

Aunque la degeneración de las neuronas sensitivas es el rasgo más característico e importante de la enfermedad, el corazón está también seriamente afectado y de hecho, la cardiomiopatía es la causa de muerte en la mayor parte de los enfermos. En los pacientes se observa un alargamiento del corazón con ensanchamiento de las paredes ventriculares y depósitos de hierro en los cardiomiocitos (en Pandolfo y Koenig, 1998).

5.2 El gen FRDA y la proteína frataxina.

El gen responsable de la enfermedad, denominado *FRDA*, se aisló mediante la estrategia de clonación posicional en la región 9q13 (Campuzano *et al.*, 1996). Su tamaño es de 85Kb y consta de 7 exones (figura I13-A). Codifica para varios transcritos, siendo el más abundante el de 1,3kb formado por los exones 1-5a, que se traduce en una proteína de 210 aminoácidos llamada frataxina. Esta proteína se localiza en la membrana interna de la mitocondria (Campuzano *et al.*, 1997, Priller *et al.*, 1997).

Las estructuras primaria y secundaria de la frataxina no han aportado ninguna información sobre su posible función, ya que no se ha identificado en ellas ningún dominio de función conocida. La cristalografía de rayos X de la proteína sólo aporta datos descriptivos, como la existencia de 7 hojas β y 2 hélices α formando un sándwich (Dhe-paganon *et al.*, 2000). Las características de la estructura tridimensional propuesta (figura I13-B) incluyen la capacidad de la His177 para la unión de un átomo de hierro. Sin embargo, es un aminoácido que carece de interacciones con el resto de la estructura.

5.3 Causas genéticas y bioquímicas de la patología.

La AF está producida por una deficiencia de la proteína frataxina. Esta deficiencia está producida, mayoritariamente, por la presencia de una expansión anómala de repeticiones del triplete GAA en el primer intrón del gen *FRDA*. El rango normal de la repetición es entre 6 y 34, mientras que a partir de 67 se inicia el rango patológico hasta un máximo de unas 1700 (revisado en Palau, 2001). La expansión influye sobre la cantidad de transcrito maduro. En el mecanismo propuesto, la expansión afecta al proceso de elongación del ARNm (Ohshima *et al.*, 1998) al formarse con el ADN una estructura en forma de triple hélice (Cavadini *et al.*, 2000) (figura I13-C).

También se han descrito una serie de mutaciones puntuales (revisado en Palau *et al.*, 2001) que sólo se encuentran en el 5% de los pacientes y siempre en heterocigosis con la expansión.

A nivel bioquímico, los pacientes de la AF presentan una reducción en la actividad de varios enzimas mitocondriales, como el enzima málico mitocondrial (Di Donato *et al.*, 1984), la aconitasa y los complejos I, II y III de la cadena de transporte electrónico (Rotig *et al.*, 1997).

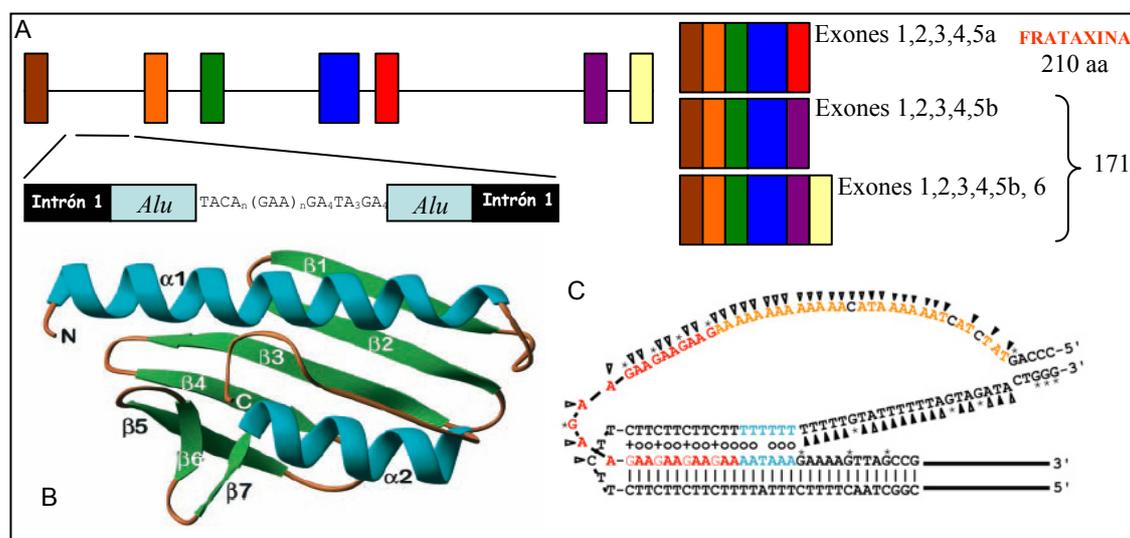


Figura I13. Aspectos genéticos de la ataxia de Friedreich. (A) Estructura del gen *FRDA* y localización de la repetición GAA en la secuencia Alu situada en el primer intrón. Se muestran también los tres posibles transcritos detectados, el más frecuente de los cuales es el que codifica para la frataxina. (B) Estructura tridimensional de la frataxina con las 7 hojas β -plegada situadas entre las 2 hélices α (figura tomada de Dhe-Paganon *et al.*, 2000). (C) Estructura patológica en triple hélice causada por la expansión del trinucleótido GAA que impide la elongación de la transcripción (figura tomada de Potaman *et al.*, 2004).

5.4 Función biológica de la frataxina.

Las claves sobre la función de la frataxina provienen de los diferentes estudios llevados a cabo en varios organismos modelo. Se han aislado los genes ortólogos en un número elevado de organismos desde bacterias al ratón y también en plantas (Cañizares *et al.*, 2000; Busi *et al.*, 2004), encontrándose 3 zonas muy conservadas entre todas las proteínas codificadas (que no incluyen a la His177), lo cual puede ser indicativo de similitudes funcionales. Los trabajos en *S. cerevisiae* han aportado evidencias para plantear diferentes hipótesis, mientras que los resultados obtenidos en cultivos celulares de mamíferos y en los modelos murinos han sido complementarios y han servido para dar mayor peso a unas hipótesis frente a otras. Actualmente, se manejan 5 hipótesis sobre la función de la frataxina (figura I14):

I. Control del flujo del hierro mitocondrial.

La idea de la implicación del hierro en la función de la proteína surge con la observación de depósitos de este elemento en cardiocitos de los pacientes (en Pandolfo y Koenig, 1998). Esta hipótesis se confirmó al observar que el mutante del gen ortólogo al gen *FRDA* en *S. cerevisiae* (*yfh1*), presentaba un exceso de hierro en las mitocondrias y un déficit en el citosol, acompañado del descenso de algunas actividades enzimáticas característico de la patología humana, con disminución de la capacidad respiratoria y pérdida de ADN mitocondrial (Foury y Cazzalini, 1997; Foury, 1999). Además, la expresión del gen *yfh1* restauraba el fenotipo del mutante *bm-8* de levadura, incapaz de crecer en un medio pobre en hierro (Babcock *et al.* 1997).

Se propuso la hipótesis de que la proteína YFH1 estaría, por tanto, implicada en la homeostasis del hierro, controlando los flujos de entrada y salida del mismo de la mitocondria. Su desaparición dificultaría esta salida, provocando la acumulación del elemento (Radisky *et al.* 1999).

Sin embargo, la obtención de letalidad en el estadio E6.5 antes del nacimiento, en el ratón *knock-out* del gen *frda* sin que se observara acumulación de hierro (Cossee *et al.*, 2000), y que en fibroblastos o linfoblastos de pacientes tampoco se observen cambios en la concentración de hierro intramitocondrial (Sturm *et al.*, 2004), cuestiona la alteración del metabolismo del hierro como fenómeno primario.

II. Almacenamiento de hierro.

Otro grupo de autores propone que la frataxina mantendría el hierro almacenado en forma soluble, biodisponible y no tóxica, para hacer frente a las necesidades de la mitocondria (Adamec *et al.*, 2000) de un modo semejante a como la ferritina lo hace en el citoplasma. Estos autores han observado que la proteína YFH1 purificada es un monómero que no une hierro, pero que *in vitro* y en presencia de Fe^{2+} ($\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$) es capaz de formar multímeros esféricos de hasta 60 moléculas de frataxina que pueden almacenar más de 3000 átomos de Fe.

La resolución de la estructura de la frataxina humana, por cristalografía de rayos X, detectó la presencia de un parche ácido en una de sus caras (Dhe-Paganon *et al.*, 2000), muy semejante al existente en la ferritina y que podría ser un dominio de unión a otras proteínas. El análisis de los núcleos de hierro de los multímeros de frataxina mediante espectroscopia de absorción de rayos X, mostró que estos presentaban una estructura idéntica para las frataxinas humana y de levadura y muy similar al núcleo de la ferritina (revisado en Seznec *et al.*, 2004b).

Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible la detección *in vivo* de formas de la frataxina de elevado peso molecular. Los experimentos con electroforesis bidimensional de proteínas nativas sólo detectan la presencia del monómero de 16 kDa (revisado en Seznec *et al.*, 2004b). Recientemente, se ha aislado la ferritina mitocondrial que también es capaz de almacenar hierro y rescatar parcialmente, en levadura, los defectos respiratorios y enzimáticos, y el estrés oxidativo provocado por la deficiencia de frataxina (Campanella *et al.*, 2004).

III. Regulación de la cadena de transporte electrónico.

Hay diversos trabajos que sugieren para la frataxina un papel importante en la producción de ATP. En el músculo esquelético de algunos pacientes FRDA se ha detectado una disminución en la producción de ATP, inversamente proporcional al tamaño de la expansión (Lodi *et al.*, 1999).

Según los resultados de Ristow *et al.*, (2000), la frataxina sería un estimulador de la cadena de transporte mitocondrial. Estos autores observan que al sobreexpresar la frataxina en cultivos celulares de mamífero se produce un incremento de la actividad del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte electrónico, seguido del consiguiente aumento en la producción de ATP. Con lo que la AF sería más una patología debida a una deficiencia de ATP que a defectos del metabolismo del hierro.

Sin embargo, experimentos en levadura no muestran ninguna activación de la cadena respiratoria al sobreexpresar el gen *yfh1* (Chen y Kaplan, 2001). Estos autores observan que en mutantes de levadura incompetentes para el proceso de respiración, la acumulación de hierro sólo ocurre en ausencia de frataxina, con lo que la aparición de los depósitos de hierro es independiente de la actividad respiratoria y por tanto la frataxina no regula el proceso de respiración.

IV. Protección frente a procesos de estrés oxidativo.

Esta posible función de la frataxina se basa en el hecho de que los átomos de hierro, que se acumulan en la mitocondria cuando hay disminución de frataxina, provocan la aparición de radicales libres a través de la reacción de Fenton. Estas moléculas reactivas pueden dañar tanto al ADN mitocondrial como a las proteínas y a los lípidos.

Esta hipótesis fue avalada en un primer momento por la hipersensibilidad que los mutantes *yfh1* mostraban frente a una serie de compuestos oxidantes, pero no frente a otros agentes que también dañan el ADN como las radiaciones gamma y ultravioleta (Babcock *et al.* 1997; Karthikeyan *et al.*, 2002).

Además, cuando la frataxina se sobreexpresa o se reduce su expresión, se produce una activación de mecanismos de detoxificación de los radicales libres generados, como las rutas de la glutatión peroxidasa (Shoichet *et al.*, 2002) y la ruta JNK, implicada también en la respuesta al estrés oxidativo (Pianese *et al.*, 2002).

Sin embargo, los estudios con el modelo murino proponen que se revise la idea de que la AF está relacionada con el estrés oxidativo (Seznec *et al.*, 2004c). Los autores observan que la sobreexpresión, en el modelo de ratón afectado, de un gen con propiedades antioxidantes como la superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu,ZnSOD), o el tratamiento con el antioxidante mitocondrial MnTBAP, no aportan ninguna mejora al fenotipo de los individuos.

V. Biogénesis de centros Fe-S.

Dado que la AF se caracteriza por una elevada deficiencia en la actividad de enzimas que presentan en su estructura complejos Fe-S, como la aconitasa y la succinato deshidrogenasa, y por una actividad normal en enzimas que no los contienen, como los complejos IV y V de la cadena de transporte electrónico (Rotig *et al.*, 1997), se sugirió la hipótesis de que la frataxina estaba implicada en el mantenimiento de la integridad de los enzimas con centros ferro-sulfurados, ya fuera directa o indirectamente.

Se ha comprobado que, en levadura, los mutantes de los distintos enzimas de la maquinaria de ensamblaje de los centros Fe-S, presentan un fenotipo muy similar al mutante de frataxina, incluida la presencia de depósitos de hierro (Chen *et al.*, 2002), con lo que parece lógico que la frataxina esté involucrada en la misma ruta.

Esta hipótesis se ve reforzada por las interacciones físicas, descubiertas en levadura, de la frataxina con las proteínas ISU1 y NSF1 de la maquinaria de ensamblaje de los centros Fe-S (Gerber *et al.*, 2003 y Ramazzotti *et al.*, 2004), y por las interacciones con proteínas que contienen este tipo de centros, como la aconitasa (Bulteau *et al.*, 2004) o como las dos subunidades de la succinato deshidrogenasa (González-Cabo *et al.*, 2005). En estudios, mediante microchips de ADN, de la expresión génica diferencial entre fibroblastos y linfoblastos de controles y de pacientes, sólo se han encontrado diferencias significativas en los genes de la biosíntesis de los centros Fe-S y no en los genes involucrados en el resto de hipótesis sobre la función de la frataxina (Tan *et al.*, 2003).

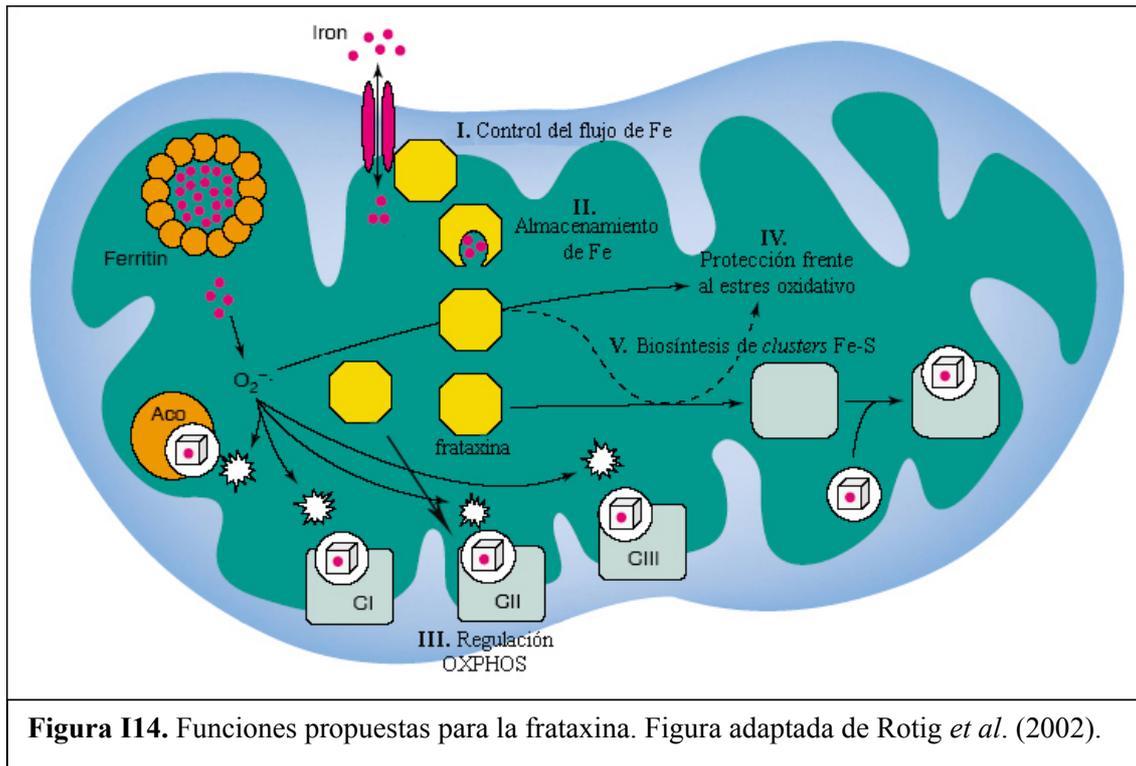


Figura I14. Funciones propuestas para la frataxina. Figura adaptada de Rotig *et al.* (2002).

5.5 Modelos de ataxia de Friedreich en eucariotas pluricelulares.

Los modelos de levadura y los cultivos celulares pueden presentar grandes limitaciones a la hora de extrapolar resultados por tratarse de modelos unicelulares y, en el caso de la levadura, por ser un organismo demasiado alejado evolutivamente del ser humano. Los modelos establecidos en el ratón son de enorme importancia no sólo para el estudio de la función de la frataxina sino también para el ensayo de posibles terapias.

El modelo de ratón *knock-out* presenta la delección del exón 4 del gen *frda*, lo cual produce una ausencia total de frataxina. Los experimentos con este ratón sugirieron la idea de que la relación con el hierro podía ser un efecto secundario (Cossee *et al.*, 2000), ya que los individuos morían en estadio embrionario pero sin observarse acumulaciones de hierro en la mitocondria. Para superar los problemas experimentales que esta letalidad embrionaria implicaba, se generaron dos tipos de mutantes condicionales. En uno de ellos, se reducía la expresión de la frataxina en el músculo esquelético y cardíaco, y en el otro en los tejidos neuronales y algunos no neuronales. En conjunto, ambas líneas mutantes reproducen muchos aspectos de la enfermedad humana, observados también con otros modelos, como la pérdida de ADN mitocondrial, la disminución de la concentración de hierro mitocondrial y las deficiencias en la actividad enzimática de la aconitasa y el complejo II de la cadena de transporte electrónico (Puccio *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003;). Pero además, reproducen también otros aspectos cuyo estudio es imposible en los modelos de levadura o celulares, como la progresiva neurodegeneración, la ataxia, la menor esperanza de vida, la pérdida selectiva de neuronas sensoriales, la hipertrofia cardiomiopática y la detección de procesos de apoptosis y autofagia en los tejidos más afectados (Simon *et al.*, 2004).

Con la intención de establecer un entorno lo más parecido posible a los pacientes, se generó otro modelo de ratón en el que se habían introducido unas 230 repeticiones GAA en el gen *frda* (Miranda *et al.*, 2002). En él no se consiguió una reducción de la expresión suficientemente elevada para producir una patología, por ello se obtuvo un individuo heterocigoto con las repeticiones en un cromosoma y el gen *frda* con el exón 4 delecionado en el otro. En este nuevo modelo, el descenso de la frataxina fue elevado pero aún compatible con un desarrollo embrionario normal. Además, no se observó ninguna alteración fisiológica, enzimática o de comportamiento, al menos durante el primer año de vida de los individuos. Tampoco se observó ningún defecto en los ratones en los que se sobreexpresó el gen *frda* (Miranda *et al.*, 2004).

El modelo de ratón se ha empleado también para comprobar la eficacia de algún tratamiento como la idebenona. Este compuesto reduce, en el modelo murino, el daño oxidativo y estimula la función mitocondrial, pero sólo en el músculo cardiaco, sin aportar ninguna mejora al estado neurológico al igual que ocurre en los pacientes (Seznec *et al.*, 2004a). Por último, se están ensayando, también en ratones, tratamientos basados en antioxidantes dirigidos específicamente a la mitocondria como la Mitoquinona y más recientemente la Mitovitamina E (revisado en Voncken *et al.*, 2004).

Actualmente, se están desarrollando modelos en *Arabidopsis Thaliana*, *C. elegans* y *D. melanogaster*. En el primero, se aisló el gen ortólogo en el cromosoma 4 del genoma de *Arabidopsis*. Este gen codifica para una proteína de 187 aminoácidos y un péptido señal de localización mitocondrial y comparte una elevada homología con las frataxinas identificadas en otros organismos. Se ha observado una alta expresión de este gen en un órgano de gran demanda energética como son las flores (Busi *et al.*, 2004).

En el segundo caso, el gen ortólogo denominado como *frh-1*, se enmarca en el seno del operón CEOP2232. El gen se expresa en el conjunto de neuronas sensitivas y de la cabeza, así como en el intestino, la faringe, las espermatecas y la glándula anal. La interferencia de ARN de este gen afecta a las neuronas sensitivas, a la puesta de huevos, al bombeo faríngeo y a la defecación (en Vázquez, 2003). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en los modelos establecidos hasta el momento, otros autores han observado que una disminución importante de la frataxina confiere a los gusanos resistencia frente al estrés oxidativo y aumenta su tiempo de vida en un 25% de modo similar a otras mutaciones mitocondriales en este organismo (Ventura *et al.*, 2005).

Finalmente, en *Drosophila* se ha aislado el gen *fh*, ortólogo al gen *FRDA* humano. Es un gen que se localiza en el cromosoma X, con un tamaño de aproximadamente 1kb y que consta de dos exones separados por un pequeño intrón. Codifica para una proteína de 190 aminoácidos que incluye el péptido señal de importación a mitocondria, y que presenta una alta homología, a nivel de estructura primaria y secundaria, con la frataxina humana y el resto de proteínas frataxina. El gen se expresa a lo largo de todo el desarrollo de *Drosophila* y presenta un patrón ubicuo de expresión embrionaria (Cañizares *et al.*, 2000).

OBJETIVOS



Esta Tesis Doctoral forma parte de un Proyecto más amplio consistente en desarrollar en *Drosophila*, un modelo de estudio de la ataxia de Friedreich, enfermedad neurodegenerativa humana causada por la pérdida de función del gen *FRDA*.

El objetivo central de este trabajo ha sido la obtención de fenotipos mutantes del gen *frataxin homologue* de *D. melanogaster* (*fh*), que nos permitieran el estudio de su función. Para ello se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Generación de mutantes estructurales del gen *fh* mediante movilización de elementos transponibles P.
- ✓ Generación de mutantes funcionales transitorios del gen *fh* mediante la interferencia de ARN de doble cadena y el sistema UAS-GAL4
- ✓ Análisis de la sobreexpresión del gen *fh* en distintos tejidos y/o momentos del desarrollo de *Drosophila*.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Pautas de redacción.

Para designar los genes, mutaciones y fenotipos se atiende a las pautas indicadas en el apartado “*Genetic nomenclature for Drosophila melanogaster*” de la *flybase* (www.flybase.org/doc/nomenclature/lk/nomenclature.html). Estas normas se basan en las publicadas por Lindsley y Zimm (1992). A continuación señalamos las normas más utilizadas en la redacción de este trabajo:

- En la designación de los genotipos, cuando un mismo cromosoma presenta varios genes mutantes, los símbolos de los alelos de los diferentes *loci* se separan con un espacio. Cuando los genes se encuentran en cromosomas homólogos, los símbolos se separan por una barra. Si por el contrario están en cromosomas no homólogos, la separación es con punto y coma seguido de un espacio.
- Alelos de un mismo gen tienen el mismo nombre y símbolo y se distinguen por superíndices particulares. El símbolo + se reserva para el alelo salvaje.
- En el caso de los transgenes, si su inserción provoca un fenotipo mutante se nombran como alelos mutantes y como aberraciones, si no solamente como aberraciones.
- El genotipo completo de un transgen consta del transposón del cual se han empleado los extremos, de los genes incluidos, del símbolo de la construcción y de un identificador de la inserción. Todo ello sigue la estructura, *transposón fuente{genes=símbolo}identificador*.
- En *Drosophila* las aberraciones más habituales y sus símbolos son: translocaciones, $T(n1,n2...)m$; cromosomas en anillo, $R(n)m$; inversiones, $In(nA)m$; transposiciones, $Tp(n1;n2)m$; deleciones, $Df(nA)m$; duplicaciones, $Dp(n1;n2)m$; letales, $l(n)m$ y cromosomas equilibradores (se pueden describir por su genotipo total o parcial, pero de modo habitual se identifican mediante un símbolo para cada uno, por ejemplo: *TM3*, *FM7c*, *Cyo*). En estos símbolos, *n* hace referencia al cromosoma implicado, *m* a un marcador particular de la aberración y *A* al brazo cromosómico.
- Para los genes identificados únicamente durante los proyectos de secuenciación del genoma, se emplean las iniciales EG o BG (según se identificaran en el Proyecto de Secuenciación Europeo o en el de la Universidad de Berkeley, respectivamente) seguidas del nombre del clon donde se identificaron. Si los genes fueron identificados durante la anotación de las secuencias, se nombran con las iniciales CG más un número.
- Para los genotipos, se escriben en cursiva los nombres de los genes, alelos, transgenes, transposones y aberraciones. Las designaciones citológicas no se transcriben en cursiva, lo mismo ocurre cuando el nombre de un gen se emplea para indicar fenotipo y no genotipo. Para indicar superíndices se emplean los corchetes [] y doble corchete [[]] para los subíndices.
- En lo referente a los productos de los genes, los mensajeros carecen de reglas en su nomenclatura. Para las proteínas se emplea el nombre del gen con la inicial en mayúscula o el símbolo del gen todo en mayúsculas.

En la nomenclatura de los compuestos químicos se han seguido las normas de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). No obstante, se ha preferido emplear los acrónimos castellanizados ADN y ARN para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente.

2. Material biológico.

2.1 Cepas de *Drosophila melanogaster*.

Las distintas cepas de *D. melanogaster*, que han sido utilizadas a lo largo de este trabajo se detallan a continuación en las Tablas M1a M3, divididas por experimentos.

La mayoría de las líneas empleadas proceden del *Bloomington Stock Center* de Indiana (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) en Estados Unidos. En el caso de las líneas de *Drosophila* que han sido cedidas por investigadores particulares, hemos añadido el nombre de estos investigadores en la columna “Nº Stock”.

Tabla M1. Cepas de *D. melanogaster* empleadas para el cálculo de la distancia física entre el elemento P1468 y el gen *fh*.

Cepa	Genotipo	Nº stock	Puntos de Rotura
<i>Df(1)18.1.15</i>	<i>Df(1)18.1.15 y[1] /FM7c</i>	3689	8C10; 8E01-02
<i>Df(1)9a4-5</i>	<i>Df(1)9a4-5 y[1] cv[1] v[1] f[1] car[1]/FM7c</i>	3694	8D07-08; 8E01-02
<i>Df(1)RA2</i>	<i>Df(1)RA2 /FM7c</i>	950	7D10; 8A04-05
<i>Df(1)KA14</i>	<i>Df(1)KA14 /FM7c</i>	951	7F01-02; 8C06
<i>Df(1)C52</i>	<i>Df(1)C52 /FM7c</i>	952	8E; 9C-D
P1468	<i>P{ry[+t7.2]=1ArB}lz[A27.1F1]; ry[506]</i>	11468	8C-D
Oregon R (OrR)	Salvaje	----	-----

Tabla M2. Cepas de *D. melanogaster* utilizadas en los experimentos de mutagénesis insercional. *La línea 2994 ya no está disponible en el *Bloomington Stock Center*.

Cepa	Genotipo	Nº stock
<i>EP(X)1356</i>	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}EP1356</i>	11273
<i>EP(X)1598</i>	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}EP1598</i>	11274
P1468	<i>P{ry[+t7.2]=1ArB}lz[A27.1F1]; ry[506]</i>	11468
<i>w[*] P{Δ2-3}</i>	<i>w[*]; Dr¹/TMS P{ry^{+t7.2}=Delta2-3}99B</i>	1610
<i>P{Δ2-3}</i>	<i>Dr¹/TMS P{ry^{+t7.2}=Delta2-3}99B</i>	406
<i>FM6/FM7</i>	<i>FM6/FM7c; cn¹; ry⁵⁰⁶</i>	2994*

Tabla M3. Cepas de *D. melanogaster* con diferentes *drivers* de la proteína GAL4.

Cepa	Genotipo	Crom	Nº stock
<i>arm</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GAL4- <i>arm</i> .S}11	2	1560
<i>da</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GAL4- <i>da</i> .G32}UHI	3	5460
<i>Ve.NEE</i>	y[1] w[*]; P{w[+mC]=GAL4- <i>ve.NEE</i> }1	2	2518
<i>48Y</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}48Y	2	4935
<i>T80</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}T80/CyO	2	1878
<i>24B</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}how[24B]/TM3 Sb[1]	3	1767
<i>1151</i>	w[*], 1151-GAL4	1	(John Sparrow)
<i>C23</i>	P{w[+mW.hs]=GawB}C23, w[*];	1	2703
<i>5053A</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}5053A/TM6B, Tb[+]	3	2702
<i>MHC</i>	+/+Y; P[MHC-Gal4;ry+]; ry-; +	2	GWD 276 (Graham W. Daevis)
<i>SG29.1</i>	w[*] P{w[+mW.hs]=GawB}sd[SG29.1]	1	(John Sparrow)
<i>act88F</i>	w[*]; act88F-GAL4	2	(David M Standiford)
<i>Dot</i>	P{w[+mC]=Dot-GAL4.K}43A w[*]	1	6903
<i>V55</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}V55	2	2683
<i>I(3)</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}I(3)31-1[31- 1]/TM6c Sb[1] Tb[1]	3	5820
<i>elav</i>	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155]	1	458
<i>389</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}389	2	1874
<i>V85</i>	P{w[+mW.hs]=GawB}V85 w[*]	1	2689
<i>1407</i>	1407-GAL4	2	(Gerhard Technau)
<i>neur</i>	w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}neur[GAL4- A101]Kg[V]/TM3 Sb[1]	3	6393
<i>atonal</i>	y[1] w[*]; P{w[+mC]=ato-GAL4.3.6}14a	2	6480
<i>c698a</i>	P{w[+mW.hs]=GawB}c698a w[1118]	1	3739
<i>C81</i>	w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}C81	3	3738
<i>D42</i>	w[*]; +; D42-gal4/TM3	3	(Grabrielle Boulianne)
<i>4G</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}4G	2	6927
<i>Ddc</i>	w[1118]; P{w[+mW.hs]=Dcd-gal4.L}4.36	3	7009
<i>ey</i>	w[*]; P{w[+m*]=GAL4-ey.H}4-8/CyO	2	5535
<i>Dll</i>	P{w[+mW.hs]=GawB}Dll[md23]/CyO	2	3038
<i>dpp</i>	y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=dpp- GAL4.PS}6A/TM3 Sb[1] Ser[1]	3	7007
<i>ptc</i>	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}559.1	2	2017 (A. García Bellido)
<i>en</i>	en-GAL4/CyO; A101/MKRS	2	233 (A. García Bellido)
<i>klu</i>	klu-GAL4 UAS GFP/TM6B	3	245 (A. García Bellido)
<i>ap</i>	y w; P{GawB}ap[md544]/CyO	2	230 (A. García Bellido)
<i>K25</i>	Sevenless-GAL4	3	(Mary K. Baylies)
<i>GMR</i>	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR}12	2	1104
<i>UAS-LacZ</i>	w[1118]; P{UAS-LacZ NZ}20b	2	3955
<i>UAS-GFP</i>	w[*]; UAS-GFP S65T	2	(Alberto Ferrús)

Cada una de estas cepas se cultivó en masa (25-100 individuos), en botellas de 200ml o en tubos de 40ml en cámaras isoterma (19°C o 25°C) con luz constante. El medio de cultivo fue el habitual para *Drosophila*.

2.2 Cepas de *Escherichia coli*.

Se ha utilizado una única cepa de *E. coli* para la clonación de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos: XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r_k⁻,m_k⁺) supE44, relA1, λ- Δ(lac) {f⁺ proAB lacIqZΔM15 Tn10(tet^R)}*).

2.3 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el análisis de tres cromosomas artificiales de levadura (YACs) se ha empleado la cepa AB1380 (*MATa ade2-1 can1-100 lys2-1 trp1 ura3 his5 [psi+]*). Estos cromosomas se describen en el siguiente apartado.

2.4 Clones de ADN genómico de *D. melanogaster*.

a) Cósmidos.

125A12. Clon de ADN genómico de la cepa *OrR* de *Drosophila*, de 12,7kb de tamaño, que cubre la región del cromosoma X comprendida entre 8D1-8D12. La librería que contiene el cósmido fue construida a partir de ADN aislado de microamplificaciones de las divisiones cromosómicas (Madueno *et al.*, 1995).

Este clon fue suministrado por el *European Drosophila Genome Project* (EDGP).

b) BACs (Cromosomas Artificiales de Bacteria).

RP98-21N6. Clon de ADN genómico de la cepa *OrR* de *Drosophila*, de 189kb de tamaño, que cubre parte de la región del cromosoma X situada en 8C-8D.

RP98-27A8. Clon de ADN genómico de la cepa *OrR* de *Drosophila*, de 177kb de tamaño, que cubre parte de la región del cromosoma X situada en 8C-8D.

Estos clones proceden de la genoteca de ADN genómico de *Drosophila* del “Children’s Hospital Oakland Research Institute” (CHORI) (Hoskins *et al.*, 2000).

c) YACs (Cromosomas Artificiales de Levadura).

DYN28-60. Clon de ADN genómico de embriones de *Drosophila*, de 260kb de tamaño, que cubre la región del cromosoma X comprendida entre 8D9-11 y E3-4.

DYE01-42. Clon de ADN genómico de adultos de *Drosophila*, de 325kb de tamaño, que cubre la región del cromosoma X comprendida entre 8C13-14 y D10-11.

Estos clones fueron cedidos por el Dr. Ian Duncan del Departamento de Biología de la Universidad de Washington.

3. Métodos moleculares.

3.1 Extracción de ácidos nucleicos.

3.1.1 ADN genómico de *Drosophila*.

La extracción de ADN genómico de *Drosophila* se realizó siguiendo el método de Junakovic *et al.* (1984) con una serie de modificaciones establecidas en nuestro laboratorio para un número diferente de individuos. El método original fue diseñado para la extracción de ácidos nucleicos de un número reducido de individuos (de 1 a 10). Cuando se aplica a 100 individuos, las modificaciones afectan al volumen de los distintos tampones y a la incorporación de pasos de purificación mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, dado que con 80-100 individuos la cantidad de restos celulares e impurezas es considerablemente mayor.

En el caso concreto del análisis de las líneas procedentes de la movilización de elementos transponibles P, se partió de 5 individuos y se varió ligeramente la composición de los tampones para asegurar un mayor rendimiento y estabilidad del ADN.

Como el paso de precipitación de ácidos nucleicos con etanol absoluto y NaCl se va a emplear en otros protocolos de esta tesis doctoral, es importante describirlo con un poco más de detalle. Se basa en el uso de una concentración moderada de un catión monovalente como el Na⁺ para conseguir la formación del precipitado. Consiste en añadir a la muestra la cantidad necesaria de NaCl 5M para que quede a una concentración final de 0,1-0,2M y a continuación, 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se homogeniza la mezcla por inversión y se deja al menos 30min en hielo o a -20°C. Luego se recupera el precipitado por centrifugación.

En la Tabla M4 se presenta un esquema donde se comparan el método de Junakovic *et al.* (1984) y las modificaciones realizadas en este trabajo.

Tabla M4. Comparación entre el método original de Junakovic *et al.* (1984) y los métodos de extracción empleados.

Pasos	Métodos	Junakovic (1-10 ind.)	Modificado para 80 ind.	Modificado para 5 ind.
Solución I		100µl (Tris-Cl 0,1M; EDTA 0,1M pH 9)	400µl (Tris-Cl 0,1M; EDTA 0,1M pH 9)	160µl (Tris-Cl 0,01M; NaCl 60mM; Sacarosa 5%; EDTA 0,01M, pH 7,8)
Solución II		400µl SDS 2%	400µl SDS 2%	200µl (Tris-Cl 0,3M; SDS 1,25%; Sacarosa 5%; EDTA 0,01M, pH 8)
Incubación I		60min	45min	30min
Precipitación Proteínas		24µl KOAc 8M	105µl KOAc 8M	60µl KOAc 3M
Incubación II		30min en hielo	30min en hielo	20min a -20°C
Purificación I		-----	Si	-----
Precipitación ADN I		100µl Isopropanol	700µl Isopropanol	400µl Isopropanol
Redisolución ADN I		50µl TE	300µl TE esp.	20µl TE
Purificación II		-----	Si	-----
Precipitación ADN II		-----	Etanol abs. y NaCl 5M	-----
Redisolución ADN II		-----	50µl TE	-----

3.1.2 ADN clonado en vectores plasmídicos y BACs.

Para la obtención de ADN a pequeña escala (para mapas de restricción, subclonaciones, etc.) se siguió el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001).

Para la secuenciación automática, el marcaje de sondas de ARN y la obtención de moscas transgénicas por microinyección, el ADN fue aislado empleando los siguientes kits comerciales de Roche: *Genopure Plasmid Maxi kit* (Cat. N° 3143422), *Genopure Plasmid Midi kit* (Cat. N° 3143414) y *High Pure Plasmid Isolation kit* (Cat. N° 1754785), según la cantidad de ADN requerida.

3.1.3 ADN de Cromosomas Artificiales de Levadura (YACs).

Como estos clones de ADN genómico iban a ser empleados única y exclusivamente para el cartografiado físico de la región 8C-D, abordamos el aislamiento mediante electroforesis en campo pulsante para la posterior realización de *Southern blot*.

El protocolo es el siguiente:

- Se inocula una colonia de la cepa AB1380 en 2,5ml de medio AHC y se incuba a 30°C durante 48 h.
- Se diluyen 500µl de cultivo en 25ml de medio fresco con ampicilina [20µg/ml] y se incuba a 30°C durante 24-48 h.
- Se recuperan las células por centrifugación a 2100rpm y se resuspenden en 1ml de sorbitol 1M.
- Se determina la concentración de células midiendo la densidad óptica (OD) a 600nm, en el espectrofotómetro. Una OD 600=0,1 corresponde a 3×10^6 células/ml aproximadamente.
- Se centrifuga a 2100rpm durante 5min, se decanta y se resuspenden las células en un volumen de EDTA 100mM pH 8 con el que se obtenga una concentración de 1×10^9 células/ml.
- Se incuba durante 30min a temperatura ambiente y con agitación.
- Se colocan 300µl de la suspensión de células en tubos de 1,5ml. Se centrifuga a 2100rpm durante 5min y se decanta.
- Se resuspende en 100µl de SCE y se guarda a 4°C hasta su utilización.
- Se añade β-mercaptoetanol 30mM (para 100µl de SCE; 0,2µl de β-mercaptoetanol 15M) y 23U de lincasa (Sigma Cat. N° L-2524).
- Se incuba 1h a 30°C en baño o bloque seco.
- Se mezclan en proporciones iguales agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% en TBE 0.5x y la solución de células.
- Se homogeneiza evitando crear burbujas y se preparan bloques de aproximadamente 200µl (3×10^8 células/ml) en los moldes adecuados.
- Se incuban los bloques con una solución de proteinasa K durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Se realizan tres lavados de 1h con TE 1x pH 8 a temperatura ambiente y con agitación de los bloques.
- Se guardan los bloques en EDTA 0,5M pH 8 a 4°C.
- Se prepara el gel a partir de agarosa de uso múltiple (Roche Cat. N° 1388991) al 1% en TBE 0,5x y se deja solidificar 30-45min.

- Se prepara el sistema de electroforesis. Se equilibran los bloques con varios lavados en TBE 0,5x.
- Se cargan los bloques y el marcador de cromosomas de levadura (New England Biolabs Cat. N° 345) y de λ concatémicos (New England Biolabs Cat. N° 340) en los pocillos, con ayuda de una espátula y se rellenan los pocillos con agarosa de bajo punto de fusión si es necesario.
- Se coloca el gel en la cubeta y se programa la electroforesis. En nuestro caso: Tiempo A inicial: 20s; Tiempo A final: 50s; Relación A/B: 1; Modo: 1; Tiempo total: 26h.
- Se tiñe el gel con una solución acuosa de 0,5 μ g/ml de EtBr durante 30min con agitación suave y se destiñe el exceso de tinción con H₂O_d durante 30min en agitación.
- Se observa a luz UV y se fotografía el resultado.

Disoluciones a destacar:

- ✓ **Medio Δ HIC:** Para un litro de medio, 6,7g de Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 10g de Caseína hidrolizada, 20mg de Adenina hemisulfato y 20g de Glucosa.
- ✓ **SCE:** 1M Sorbitol, 0,1M NaCl, 10mM EDTA pH 8.
- ✓ **Solución de Proteinasa K:** 0,5M EDTA pH 8, 1% Laurilsarcosina (Serva Cat. N° 27570), Proteinasa K 0,05mg/ml (Roche Cat. N° 10038200).

3.1.4 ARN poli(A)⁺ y ARN total de *Drosophila*.

Para la extracción del ARN poli(A)⁺, se utilizó el kit *QuickPrepTM mRNA Purification* de Amersham Bioscience (Cat. N° 27-9255-01). Con él la fracción poli(A)⁺ se obtiene mediante cromatografía de afinidad en columnas de oligo(dT)-celulosa. El ARN poliadenilado queda retenido en la columna en condiciones de alta fuerza iónica, y su elución se produce utilizando un tampón de baja fuerza iónica. El mensajero obtenido se trató con *RQ1 Rnase-Free Dnase* (Promega Cat. N° M6101) 15min a 37°C para eliminar el ADN genómico contaminante. La ADNasa se elimina por fenolización y el ARNm se precipita con 3 volúmenes de etanol absoluto y NH₄⁺Ac 4M.

El mensajero total se extrajo mediante *TriPure Isolation Reagent* (Roche Cat. N° 1667157) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo hace que se separen en dos fases diferentes la fracción del mensajero y la fracción proteínica junto con la de ADN genómico. Estas extracciones se emplearon en los *Northern blots*, por ello se cuantificaron con un espectrofotómetro (A₂₆₀) y se determinó su pureza (A₂₆₀/A₂₈₀). En todos los casos se obtuvo una cantidad adecuada y de una pureza situada en el rango correcto entre 1,9-2,3.

Tanto en la extracción del ARN poli(A)⁺ como del ARN total, se empleó como material de partida 150mg de embriones, obteniéndose unas cantidades de 1-5 μ g y 50-150 μ g respectivamente.

3.2 Análisis de Restricción.

En las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción, se emplearon habitualmente 2U de la enzima correspondiente por μg de ADN. Las digestiones se realizaron en tubos de microcentrifuga de 1,5ml con un volumen final de 20-50 μl . Para las digestiones dobles se eligieron tampones de reacción para los que ambas enzimas presentaban un elevado porcentaje de corte. Las mezclas de reacción se incubaron en un baño a 37°C durante un mínimo de 2h. Los resultados de las digestiones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8% a los que se añadió 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr.

3.3 Amplificación de Ácidos Nucleicos.

La amplificación se llevo a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.)

3.3.1 Reacción PCR estándar.

dNTPs	0,5 μl de una solución <i>stock</i> 20mM para una concentración final de 200 μM . (Roche Cat. N° 1969064).
cebador directo	1 μl de una dilución a 10pmol/ μl .
cebador inverso	1 μl de una dilución a 10pmol/ μl .
ADN	100ng de ADN genómico, 50ng de ADN plasmídico, 5 μl del producto de la RT-PCR.
tampón PCR	5 μl de tampón 10x (15mM MgCl_2).
polimerasa	1U de <i>Netzime</i> (Fermentas Cat. N° NE-002). 2U de <i>Expand High Fidelity</i> (Roche Cat. N° 1732641). En la obtención del ADNc de <i>fh</i> y para el análisis de la movilización.
H ₂ Od	hasta 50 μl .

En las tablas siguientes M5 a M7, se detallan los cebadores y condiciones empleadas en cada caso.

Tabla M5. Análisis de los experimentos de mutagénesis insercional.					
Amplificación	Cebadores		Condiciones de amplificación		
Rescate Plasmídico del P1468	REST3 REST7	TCTGCACTTGCCAATCCAT CTGTTACATCTGCTTGGTAA	95°C 5min	94°C 30s 50°C 40s 35 ciclos	72°C 90s 72°C 7min 4°C
PCR inversa extremo 3' EP	Pry1 Pry2 3ext 3int	CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT CTTGCCGACGGGACCACTTATGTTATT CGCTGTCTCACTCAGACTCAATACGACAC GCGAGTACGCAAAGTTTGGCTGC	95°C 5min	94°C 30s 60°C 40s 35 ciclos	72°C 90s 72°C 7min 4°C
PCR inversa extremo 5' EP	Pwht1 Plac1 Pwht1 Sp1 5ext 5int	GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCACA CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCACA ACACAACCTTCTCTCAACAA CGTGCACTGAATTTAAGTGTATACTTCGG CGGAACCATTTAGAGCGAACC GAATCG			
Región en 3' de <i>fh</i>	MEDAR ZDFH8081R	ACTAATTCTAGAATTA ACTACAGTAGGGCA CGTTGAACTCGGTGTGGGA	95°C 5min	94°C 30s 55°C 45s 35 ciclos	72°C 90s 72°C 7min 4°C
Región en 5' de <i>fh</i>	MECAD TEJGT3	AAGTTGCGGCCCGCCGCAACTGGGATTTGTA ACCAAGTTCAAGGCTTCGG			

Tabla M6. Amplificación de diferentes fragmentos de <i>fh</i> .				
Amplificación	Cebadores	Condiciones de amplificación		
cDNA <i>fh</i>	MECAD AAGTTGCGGCCCGCCGCAACTGGGATTTGTA MEDAR ACTAATTCTAGAATTA ACTACAGTAGGGCA	<u>95°C 5min</u>	<u>94°C 30s</u>	<u>72°C 60s</u> <u>72°C 7min</u> <u>60°C 40s</u> 35 ciclos <u>4°C</u>
Vector <i>pUAST</i>	PUASTDIR CACCACAGAAGTAAGGTTCC PUASTREV CTGCAACTACTGAAATCTGCC	<u>95°C 5min</u>	<u>94°C 30s</u>	<u>72°C 3min</u> <u>72°C 7min</u> <u>55°C 40s</u> 30 ciclos <u>4°C</u>
Fragmento sonda Northern <i>fh</i>	MECAD AAGTTGCGGCCCGCCGCAACTGGGATTTGTA T7MEDAR TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACTAATTCTAGAATAACTACAGT	<u>95°C 5min</u>	<u>94°C 30s</u>	<u>72°C 90s</u> <u>72°C 7min</u> <u>60°C 40s</u> 35 ciclos <u>4°C</u>

Tabla M7. Amplificación de otros genes.					
Amplificación	Cebadores		Condiciones de amplificación		
Fragmento sonda Northern <i>rp49</i>	R22 D22	TCACACAGGAAACAGCTATGAC ACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<u>95°C 5min</u>	<u>94°C 30s</u> <u>60°C 40s</u> 35 ciclos	<u>72°C 90s</u> <u>72°C 7min</u> <u>4°C</u>
Gen <i>CG7065</i> en clon CBD	PBA D22	AACATGTTGTAAAGTGCG ACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	<u>95°C 5min</u>	<u>94°C 30s</u> <u>50°C 45s</u> 35 ciclos	<u>72°C 90s</u> <u>72°C 7min</u> <u>4°C</u>
Fragmentos clonados en <i>pCR-Script</i>	T3 T7	AATTAACCCTCACTAAAGG GTAATACGACTCACTATAGGGC	<u>95°C 5min</u>	<u>94°C 30s</u> <u>60°C 40s</u> 30 ciclos	<u>72°C 60s</u> <u>72°C 7min</u> <u>4°C</u>
Fragmento <i>GFP</i>	GFPRNAiF GFPRNAiR	CCCAAGCTTCACGAATTCTTCAAGTCCGCC CCGCTCGAGCTGGATCCGGACTTGTACAGC			

materiales y métodos

3.3.2 Reacción de RT-PCR.

A partir de 1µg de ARNm poli(A)+ se sintetiza la cadena de ADN complementaria siguiendo el siguiente protocolo:

- Se calienta el mensajero a 65°C 5min para eliminar estructuras secundarias y se enfría en hielo otros 5min.
- Se prepara la mezcla de reacción sin añadir la enzima, y se deja 10min a temperatura ambiente para permitir la unión del cebador.
- Se añade la transcriptasa reversa.
- Se incuba la mezcla completa 45min a 37°C para generar la cadena de ADNc.
- Se calienta a 65°C 5min para inactivar la enzima.
- Se emplean varios µl del producto (ADNc) como molde para la reacción de PCR subsiguiente.

La mezcla de reacción utilizada fue:

tampón de la retrotranscriptasa 5x	4µl
dNTPs (20mM)	1µl
inhibidor RNasa (1U/ µl) (Promega Cat. N° N2111)	1µl
cebador (10pmol/µl)	1µl
ARNm	100ng
AMV transcriptasa reversa (10U/ µl) (Promega Cat. N° M5108)	2µl
H ₂ O libre de RNAsas	hasta 20µl

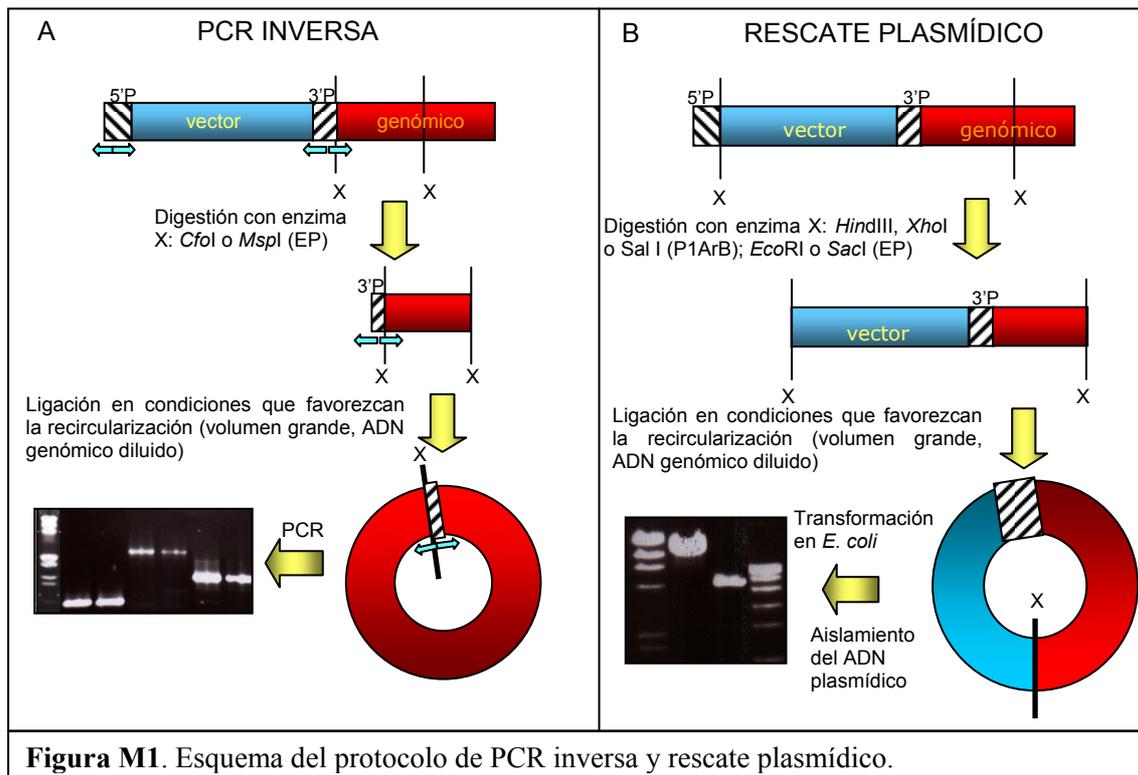
3.3.3 PCR inversa.

Las regiones de ADN genómico adyacentes a las inserciones de los elementos transponibles artificiales tipo EP, se obtienen mediante este tipo de PCR.

El método que hemos empleado puede encontrarse en la dirección *web* del proyecto genoma de *Drosophila* (www.fruitfly.org/about/methods/pcr.inverse.html). Brevemente consiste en:

- Se digieren 500ng de ADN genómico de *Drosophila* con las enzimas adecuadas. En nuestro caso, hemos empleado *MspI* y *CfoI* (isoesquizomero de *HinP1I*) para ambos extremos del elemento.
- Se inactiva la enzima de restricción mediante calor (20min a 65°C) y se precipita la reacción con etanol absoluto y NaCl.
- Se liga el ADN genómico digerido en un volumen elevado (400µl), para favorecer la recircularización de los fragmentos frente a la unión de distintos fragmentos entre sí. Se incuba toda la noche a 4°C. Para la ligación se emplea 1-2U de T4 ADN ligasa (Roche Cat. N° 481220).
- Se precipita la reacción con etanol absoluto y NaCl 5M.
- Se disuelve en 50µl de H₂O.
- Se prepara la reacción de PCR, empleando las parejas de cebadores de la Tabla M5.
- El fragmento resultante será posteriormente purificado según se ha descrito en la sección 3.4.2 y se secuenciará con los mismos cebadores que aparecen enumerados en la Tabla M8 de la sección 3.8.

En la figura M1-A se presenta un esquema de este proceso.



3.4 Purificación de fragmentos de ADN.

3.4.1 A partir de geles de agarosa.

Se han seguido dos métodos para el aislamiento de ADN a partir de fragmentos de agarosa:

-Electroelución: se introduce la banda de agarosa en una sección de membrana de diálisis (*Visking dialysis tubing 16mm*, Serva Cat. N° 44110), se añaden 300µl de TBE 1x y se introduce en la cubeta de electroforesis. Tras 1h a 120V el ADN habrá migrado desde el fragmento de gel hasta el tampón contenido en la bolsa de diálisis. Se recupera el tampón y se precipita el ADN con etanol absoluto y NaCl.

-*GFXPCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Bioscience Cat. N° 27-9602-01). Se basa en fundir la agarosa en un tampón especial que permite al ADN quedar retenido en la matriz de una columna. El ADN posteriormente se recupera eluyendo en H₂O.

3.4.2 A partir de productos de PCR.

Hemos empleado el kit *Jetquick PCR Purification spin Kit/250* (Genomed Cat. N° 400250). Se basa en la utilización de unas columnas capaces de retener el ADN pero no los nucleótidos ni los cebadores que no han sido incorporados en la reacción de PCR.

3.5 Clonación.

3.5.1 Vectores de clonación.

-pCR-ScriptTMSK(+). Este vector es una modificación del fagémido *pBluescript IISK(+)*. Incluye un gen de resistencia a la ampicilina, zonas de unión para la ARN polimerasa T3 y T7 y la zona de clonación múltiple SK, que ha sido modificada para incluir la secuencia diana de la endonucleasa de restricción *Srf* I. Este vector permite clonar el mismo tipo de fragmentos que los *pUC*.

-pSL1180. Vector derivado de los *pUC* que conserva el gen de resistencia a la ampicilina y el sistema de selección de clones positivos mediante el gen de la β -galactosidasa. Su característica más notable es la presencia de una zona de clonación múltiple con muchos más sitios de restricción que el resto de vectores de su clase.

-pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, *TOPO TA CLONING KIT* Cat. N° 4500-01). Vector diseñado para la clonación de productos de PCR. Presenta doble resistencia a ampicilina y kanamicina. Se suministra en forma lineal, con dos timidinas desapareadas en los extremos. Además, posee una topoisomerasa localizada físicamente sobre el sitio de clonación de los fragmentos, que es la responsable de la unión del producto de PCR al vector de manera tan rápida y efectiva.

-pUAST. Vector derivado de la familia *pCasper*. Se utiliza en la obtención de moscas transgénicas para el empleo del sistema UAS-GAL4. Está estructurado en dos partes, por un lado tenemos el vector *pUC18* y por otro lado los extremos de un elemento transponible P, el gen *white* como marcador fenotípico y la zona de clonación múltiple junto con las secuencias UAS.

3.5.2 Métodos de clonación.

A lo largo de este trabajo hemos empleado tres métodos que, de mayor a menor complejidad, son:

.1) **Clonación de fragmentos con extremos romos**. Este método se ha empleado para clonar productos de PCR. Se digiere 1 μ g de ADN del vector con una enzima que deje extremos romos, como por ejemplo *EcoRV*, luego se defosforila para que en la ligación no se produzca la reasociación del mismo y se purifica para eliminar las enzimas y demás elementos que pueden interferir en la ligación.

Se rellenan los extremos del inserto obtenido por PCR con la polimerasa *Klenow* (Roche Cat. N° 1008412) hasta hacerlos romos y posteriormente se fosforilan para posibilitar la acción de la ligasa.

La reacción de ligación se prepara del siguiente modo: una cantidad de vector e inserto adecuada para su relación de tamaños, 1U de ligasa, 1 μ l de tampón 10x y H₂O estéril hasta un volumen de 10 μ l. Se deja toda la noche a 4°C.

Este método se empleó para la clonación del ADNc del gen *fh*.

.2) **Clonación de fragmentos con extremos cohesivos**. Se ha empleado para la subclonación de fragmentos ya clonados, y para la clonación de productos de PCR amplificados con cebadores que incorporan secuencias de restricción. Para ello se realiza la digestión de 1 μ g de ADN de vector e inserto, se purifican y se prepara la reacción de ligación. En el caso de emplear una única enzima de restricción, se defosforila y purifica el vector previamente a la reacción de ligación.

Este método se empleó para la clonación del ADNc de *fh* en el vector *pUAST*.

.3) Clonación de fragmentos de PCR. Se ha empleado el kit comercial *TOPO TA CLONING KIT* (Invitrogen, Cat. N° 4500-01). Las características de este kit permiten realizar la ligación y la transformación en un mismo día, incluso sin necesidad de purificar la reacción de PCR.

3.5.3 Rescate plasmídico.

Se trata de otro método, alternativo a la PCR inversa, que permite conocer la localización exacta de la inserción de elementos P artificiales (figura M1-B), en nuestro caso la de los elementos insertados en las líneas P1468 y EP1598 y en las líneas resultantes de la movilización de ambos.

En primer lugar, se procede a la digestión de los ADNs genómicos de las líneas citadas. Para el P1ArB se pueden emplear las enzimas *HindIII*, *SalI*, *XhoI* y *KpnI* (que se encuentran en la sección PL3 del elemento artificial) y para el EP se pueden emplear *EcoRI* y *SacI*, tal como se indica en Rorth *et al.* (1996 y 1998). Según se describe en Bellen *et al.* (1988), se digieren 3µg de ADN genómico en 20µl de reacción. Si el ADN se ha digerido adecuadamente, se añade a cada reacción 52µl de H₂O estéril y 8µl de NaAc 3 M (pH 6.3). A continuación se fenolizan las muestras y se precipitan con etanol absoluto y NaCl. Tras disolver el ADN en 50µl de H₂O, se ligan en un volumen total de 400µl con 1U de T4 ADN ligasa durante toda la noche. Una vez finalizada la ligación se precipita con etanol absoluto y NaCl, se resuspende en 20µl de H₂O y se transforman las células competentes.

3.5.4 Preparación de células competentes.

De los diversos métodos existentes se ha seguido el método del cloruro de rubidio descrito en Sambrook y Russell (2001).

3.5.5 Transformación y análisis de las colonias transformadas.

En nuestro laboratorio se sigue el método habitual de transformación por choque térmico de bacterias quimiocompetentes. A 200µl de células competentes, se añade la mezcla de ligación y se mantienen en hielo durante 20min. A continuación se someten a un choque térmico durante 2min en un baño a 37°C, inmediatamente se transfieren de nuevo a hielo durante 2min. En condiciones de esterilidad se añaden 800µl de medio líquido LB y se incuban en agitación (250rpm) a 37°C durante 1h. Al cabo de ese tiempo el contenido se reparte en 2-3 placas Petri de 90mm, que han sido preparadas con medio de cultivo al que se le ha añadido agar para solidificarlo y un antibiótico (ampicilina o kanamicina), que ejerce presión selectiva para permitir el crecimiento sólo de las bacterias que hayan incorporado nuestro plásmido.

Los plásmidos y cepas bacterianas que se emplean en la actualidad presentan características que facilitan la selección de transformantes, pudiendo distinguir entre las colonias de bacterias que han incorporado sólo el vector plasmídico y las que han incorporado el plásmido recombinante. En nuestro caso se ha empleado la selección de colonias azules/blancas, ya que la mayoría de vectores que se han utilizado incluyen un fragmento del gen *lacZ*, cuyo producto, la β -galactosidasa, es capaz de catalizar una reacción colorimétrica con el sustrato X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, Roche Cat. N° 651745). El fragmento del gen *lacZ* incluido en el vector sólo contiene una parte de su secuencia codificante. Por su parte la estirpe bacteriana incorpora un gen *lacZ* que también está incompleto, de manera que ambos complementarán (complementación α). El segmento del gen *lacZ* presente en el vector está fragmentado en dos partes por la zona de clonación múltiple. De este modo la incorporación de un fragmento de ADN exógeno en la zona de clonación múltiple, supone invariablemente la imposibilidad de sintetizar un péptido adecuado para la complementación α . Así pues, el color azul indica la presencia de una colonia bacteriana cuyo plásmido no ha incorporado el inserto, mientras que el color blanco señala un clon que ha incorporado el inserto.

Para que se produzca la reacción colorimétrica es preciso añadir al medio LB, con el que se preparan las placas de cultivo, el sustrato X-gal y, para algunas cepas bacterianas, también un inductor de la expresión del gen *lacZ* como es el IPTG (tioisopropil- β -D-galactósido, Roche Cat. N° 724815).

Este método ha sido útil para todos los vectores empleados excepto para el vector *pUAST*, dado que carece de este sistema de selección.

Disoluciones a destacar:

- ✓ **Medio LB** (Luria-Bertani): Para un litro de medio, 10g de Bacto-triptona (Pronadisa Cat. N° 1612), 5g extracto de levadura (Pronadisa Cat. N° 1702), y 10g de NaCl (JTBaker Cat. N° 0277). Se esteriliza en autoclave y se guarda a temperatura ambiente.
- ✓ **Placas de LB**: Medio LB más 15g de Bactoagar (Pronadisa Cat. N° 1800). Se esteriliza en autoclave, se deja enfriar a 55°C y se añade la cantidad adecuada de antibiótico y cualquier otro compuesto que deseemos añadir a la composición de las placas (p.ej. IPTG, X-Gal...), se mezcla, se vierte en la placas Petri de 90mm, se dejan solidificar y se guardan a 4°C en oscuridad.

3.6 Electroforesis.

Se han empleado geles de agarosa (Roche Cat. N° 1685678) de 0.8% en TBE 1x. La agarosa se prepara llevándola a ebullición dos veces en un microondas y una vez enfriada a 55°C se añade el bromuro de etidio (Sigma Cat. N° E-8751) hasta una concentración de 0,5 μ g/ml. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales empleando TBE 1x como tampón de electroforesis y a voltaje constante de 90V. La visualización de los fragmentos de ADN se realizó iluminando los geles con luz UV de 312nm de longitud de onda.

Los marcadores de pesos moleculares utilizados, han sido:

DNA Molecular Weight Marker II (Roche Cat. N° 236250); *VI* (Roche Cat. N° 1062590); *VII* (Roche Cat. N° 1209264); *XIII* (Roche Cat. N° 1721925); *XIV* (Roche Cat. N° 1721933) y *Lambda DNA/Hin dIII Marker 2* (Fermentas Cat. N° SM0101).

3.7 Hibridación y detección de los híbridos.

Se han realizado tres tipos de hibridaciones de ácidos nucleicos, en filtro (*Southern* y *Northern blot*), en cromosomas politénicos y en embriones de *Drosophila* (las hibridaciones *in situ* se describen en las secciones 4.4 y 4.5).

3.7.1 Marcaje de sondas de ADN.

Se ha utilizado el marcaje con Digoxigenina-11-dUTP (Roche, *Dig DNA labelling Mix* Cat. N° 1277065) y se ha seguido el protocolo recomendado por la casa comercial, que utiliza hexanucleótidos (Roche Cat. N° 1277081) como cebadores para la polimerasa *Klenow*. La cuantificación del marcaje se realizó siguiendo el protocolo descrito en *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization* (1993), de la casa comercial Boehringer Mannheim.

3.7.2 Marcaje de sondas de ARN.

En las hibridaciones del tipo *Northern blots* o *in situ* en embriones de *Drosophila* es muy conveniente utilizar este tipo de sondas, puesto que son mucho más sensibles que las de ADN por ser la hibridación entre las dos cadenas de ARN mucho más favorable energéticamente que la del híbrido ARN:ADN (*Nonradiative In Situ Hybridization Application Manual*, 1996 de la casa comercial Boehringer Mannheim).

Se han empleado dos métodos alternativos para el marcaje de las sondas de ARN, el paso previo en ambos es clonar el fragmento de ADN necesario en un vector con promotor para las ARN polimerasas T3 y T7. En las hibridaciones *in situ*, se marcaron las dos cadenas, con sentido y antisentido, para disponer de un control negativo de las hibridaciones.

Método 1º-Marcaje a partir de un clon de ADN.

Una vez obtenida la cantidad de ADN del plásmido necesaria (1-2,5 µg) se digiere con una enzima de restricción que cree extremos 5' protuberantes o romos. Esta digestión determinará el punto final del segmento marcado, siendo el inicial el promotor de la ARN polimerasa elegida.

Tras la digestión del ADN se procede a una fenolización para eliminar las ARNasas antes de poder utilizarlo en la reacción de marcaje. A partir de este punto las condiciones deben ser libres de ARNasas.

El protocolo es el siguiente:

- Se prepara la mezcla de marcaje:

ARN polimerasa T3 o T7 (17 o 15U/ µl)	1µl
(Promega Cat. N° P2083 y P2075 respectivamente)	
tampón de transcripción 5x	2µl
mezcla de marcaje de ARN 10x	1µl
(Roche, Dig RNA labelling Mix Cat. N° 1277073)	
DTT(100mM)	1µl
Inhibidor ARNasa (1U/ µl)	1µl
- Se añade entre 1 y 2,5µg de ADN.
- Se ajusta el volumen a 10µl y se incuba 2h a 37°C.

materiales y métodos

- Si la sonda se va a utilizar en un *Northern blot*, el protocolo se finaliza en este punto, deteniendo la reacción y guardando el producto a -80°C . En caso de necesitar la sonda para hibridación *in situ* se prosigue con un tratamiento para degradarla, creando fragmentos pequeños que puedan entrar en los embriones.
- Se añaden 15 μl de H_2O y 25 μl de tampón carbonato (120mM Na_2CO_3 , 80mM NaHCO_3 , pH 10,2). Se incuba la mezcla resultante a 65°C durante 20min. Este paso es crítico y debe hacerse en estas condiciones exactamente, sin descuidar el pH ni el tiempo, puesto que un pH más básico o un tiempo más dilatado degradarían demasiado la sonda y con un pH más ácido o un tiempo más corto obtendríamos fragmentos demasiado grandes para introducirse en el embrión.
- Se añaden 50 μl de solución de parada (acetato sódico 0,2M, pH 6,0).
- Se precipita con 15 μl de LiCl 4M y 5 μl de ARNt [10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$].

En el caso del clon de *fh* empleado, la digestión con *Bam*HI generó la sonda (secuencia complementaria al mensajero) y la digestión con *Hind*III sirvió para obtener la sonda control (la misma secuencia que el mensajero).

Método 2°-Marcaje a partir de un fragmento de PCR.

Hemos empleado una variante del método descrito por Worby *et al.* (2001). Se resume en los siguientes pasos:

- Se diseña una pareja de cebadores que amplifiquen la región del gen de la cual queremos diseñar la sonda de ARN. Al cebador que va a amplificar la cadena complementaria al mensajero hay que añadirle en su extremo 5' el sitio de unión de la T7 ARN polimerasa (5'-TTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3').
- Se prepara una reacción estándar de PCR.
- Se purifica la reacción de PCR, pero con la salvedad de que la elución es con H_2O libre de RNAsas, intentando conseguir una concentración de 125ng/ μl .
- Se realiza la transcripción a ARN mediante el kit *MaxiScriptTM T7* (Ambión Cat. N° 1326). En un tubo de 1,5ml se prepara la siguiente mezcla de reacción: 2 μl de ribonucleótidos marcados, 2 μl de tampón de reacción, 1 μg de DNA molde, 2 μl de la mezcla enzimática y H_2O libre de RNAsas hasta 20 μl .
- Se incuba la reacción a 37°C durante 2-3h.
- Se añade a la mezcla 1 μl de ADNasa I para eliminar el ADN del producto de PCR y se deja 15min a 37°C .
- Se añaden 1 μl de EDTA 0,5M para proteger el ARN formado y se incuba la mezcla a 65°C durante 15min para inactivar la ADNasa.
- Se añade H_2O libre de RNAsas hasta 50 μl .
- Se deja precipitando el ARN sintetizado toda la noche a -20°C con 3 volúmenes de etanol absoluto y 5 μl NH_4Ac 5M.
- Al día siguiente se centrifuga la mezcla a 14000rpm durante 15 min a 4°C y se elimina el sobrenadante.
- Se lava el precipitado con EtOH 70% y se seca al vacío.
- Se disuelve en 50 μl de H_2O libre de RNAsas.
- Se guarda a -80°C en alícuotas de 10 μl .

3.7.3 *Southern blot.*

Para la transferencia, hibridación y detección de los híbridos se han seguido los protocolos recomendados por Roche para las sondas de ADN marcadas con digoxigenina descritos en *The DIG System User's guide for filter hybridization* (1993) y Sambrook y Russell (2001). El tampón de hibridación usado ha sido el estándar sin formamida.

En el caso de los *Southern blots* realizados para establecer la distancia entre el gen *fh* y la inserción P1468 era de gran importancia que cada calle contuviera la misma cantidad de ADN. Por ello, cada extracción fue cuantificada con un fluorímetro modelo DyNA Quant 200 de la compañía Hoefer, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En los geles de agarosa preparados para *Southern blot* se han empleado dos marcadores de pesos moleculares marcados con digoxigenina, de la casa comercial Roche: *DNA Molecular Weight Marker II dig-labeled* (Cat. N° 1218590) y *VII dig-labeled* (Cat. N° 1669940).

3.7.4 *Northern blot.*

Para la transferencia, hibridación y detección de los híbridos se han seguido los protocolos recomendados por Roche para las sondas de ARN marcadas con digoxigenina descritos en *The DIG System User's guide for filter hybridization* (1993) y Rueger *et al.* (1997). El tampón de hibridación usado ha sido el estándar sin formamida.

3.7.5 *Detección de los híbridos.*

Dado que las sondas empleadas en las diferentes hibridaciones están marcadas con digoxigenina, todo el sistema se basa en la detección de este compuesto.

El primer elemento del sistema es un anticuerpo que se une específicamente a la digoxigenina (*Antidioxigenin fab fragments*, Roche Cat. N° 1093274). Este anticuerpo lleva conjugado la enzima fosfatasa alcalina.

La detección de la señal se consigue al provocar una reacción química en la que esta enzima descomponga algún sustrato con características adecuadas. Se han empleado dos métodos, uno de tipo colorimétrico, basado en el uso de NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche Cat. N° 1383213) y X-fosfato (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine Salt, Roche Cat. N° 1383221). En este método se prepara una mezcla, añadiendo 45µl de NBT (100mg/ml en 70% de dimetilformamida) y 35µl X-fosfato (50mg/ml en dimetilformamida) por cada 10ml de Genius-3. La mezcla se vierte sobre el filtro y se deja en oscuridad hasta la aparición de la señal.

El otro método es quimioluminiscente, en este caso el sustrato de la reacción se llama CSPD (Disodium 3-(4-methoxyxyloxy-1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1³,7]decan}-4-yl)phenyl phosphate, Roche Cat. N° 1755633). El filtro empapado en este sustrato se sella y se coloca junto con una película fotográfica (*High performance Chemiluminescence films*, Amersham Bioscience Cat. N° RPN2103K; *X-OMAT UV film*, Kodak Cat. N° 0459) en una casete de autorradiografía (*Hypercassette*, Amersham Bioscience, Cat. N° RPN13642), el tiempo necesario y finalmente se revela la película en la máquina normal de revelado, en nuestro caso hemos empleado el modelo Curix 60 de la casa Agfa.

3.8 Secuenciación y análisis de secuencias.

3.8.1 Reacciones de secuenciación y cebadores.

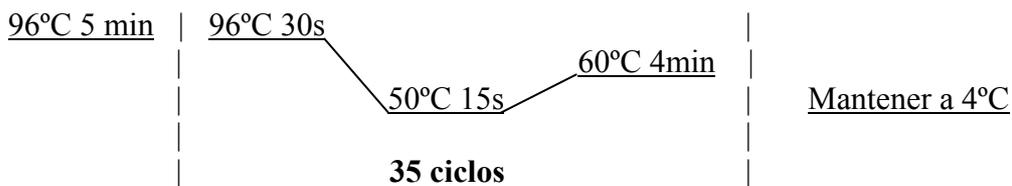
Las reacciones de secuenciación fueron realizadas con el kit *BigDye® terminator v3.1 Cycle sequencing kit* (Applied Biosystems Cat. N° 4336911) que se basa en el método de Sanger *et al.* (1977).

La lectura de las secuencias se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia y, en algunos casos, en la empresa Sistemas Genómicos de Valencia.

La mezcla de reacción utilizada fue:

ADN	500ng de ADN plasmídico, 50ng del producto de PCR.
Cebador (10pmol/μl.)	1μl
<i>BigDye® terminator v3.1 Cycle sequencing kit</i> (Applied Biosystems Cat. N° 4336911).	2μl
H ₂ O	hasta 10μl

La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el siguiente programa:



Los cebadores que se han empleado en las distintas reacciones de secuenciación se recogen en la Tabla M8:

Extremo 5'cDNA <i>fh</i>	MELEX1	CCCATTGAATAGCAACTGCGGC
Extremo 3'cDNA <i>fh</i>	MELEX2	CGCCCACCAGCGGTCCAAGCG
ADNc <i>fh</i>	CMELDIR CMELREV	GCCGGTCGTTTGATGGTCCG CGGACTGCGACTTCAGTA
Fragmentos clonados en <i>pCR-Script</i>	T7 T3	GTAATACGACTCACTATAGGGC AATTAACCCTCACTAAAGG
Rescate plasmídico P1468	ResT7 ResT3	CTGTTACATCTGCTTGGTAA TCTGCACTTGCCAATCCAT
PCR inversa o rescate plasmídico extremo 3'EP.	ry1 ry2	CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT
PCR inversa o rescate plasmídico extremo 5'EP.	Sp1 pWh1	ACACAACCTTTCCTCTCAACAA GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCACA

3.8.2 Programas empleados para el análisis de las secuencias.

Para el manejo y la resolución de ambigüedades de las secuencias hemos empleado los programas del paquete GCG y el programa *Sequencher* versión 4.0.5 de la empresa *Gene Codes Corporation*, mientras que para su análisis hemos recurrido a distintas bases de datos y programas informáticos localizados en servidores remotos, a los que se accedió mediante el programa *Microsoft Internet Explorer*.

Se han utilizado varios programas basados en el algoritmo BLAST (Altshul *et al.*, 1997), que encuentra similitudes en fragmentos relativamente pequeños de proteínas o ácidos nucleicos, entre ellos: BLAST, BLAST2, BLASTP, TBLASTN y TBLASTX. Se utilizó un programa u otro dependiendo de si la secuencia que queríamos comparar era de ADN o de proteína y de si las bases de datos eran de ADN o de proteínas.

Los análisis se realizaron empleando dos versiones de la secuencia del genoma de *D. melanogaster*, la versión 3.2 en la que las secuencias están organizadas en *Scaffolds* y la versión más reciente 4.0 que incluye la primera versión de las secuencias ensambladas para cada brazo cromosómico. Entre ambas versiones no hemos apreciado ninguna diferencia en la región del *locus fh*.

1. Métodos histológicos y citológicos.

4.1 Fijación de embriones de *D. melanogaster*.

Recogida

- Se recogen los embriones de las placas de puesta con agua, un pincel y un tamiz.
- Se decorionizan con lejía comercial al 50% durante 4min.
- Se lavan los restos de lejía con agua.
- Se lavan con Tritón al 0,1% (detergente no iónico) durante 3min, y después con agua.

Fijación

- Se transfieren los embriones con un pincel a un tubo con paraformaldehído y heptano (1:1). El paraformaldehído será al 10% si los embriones se van a emplear para hibridación *in situ* y al 4% si se van a emplear para inmunohistoquímica.
- Se agitan vigorosamente durante 20min a temperatura ambiente.
- Se golpea suavemente el tubo, hasta que el máximo número de embriones quede en la interfase.
- Se elimina la fase inferior correspondiente al fijador.
- Se añade metanol hasta una proporción 1:1. Se agita fuertemente durante 30s. Los embriones deben caer al fondo del tubo.
- Se elimina todo el líquido y se lava varias veces con etanol absoluto o metanol según se vayan a emplear los embriones para hibridación *in situ* o para inmunohistoquímica respectivamente.
- Se añade etanol absoluto o metanol y se guardan a -20°C hasta su uso.

El proceso de fijación debe hacerse en condiciones libres de ARNasas si se trata de detecciones *in situ* de ARN.

Disoluciones a destacar:

✓ **Agar para recogida de huevos.**

Se añaden 3gr de agar-agar a 175ml de H₂O_d y se hierve la mezcla hasta su disolución. Una vez enfriado a 60°C se añaden 6ml de etanol absoluto y 6ml de ácido acético.

✓ **Paraformaldehído (PFA, Panreac Cat. N° 141451 500g) 4-10%.**

Se pesan 4-10gr respectivamente y se disuelven en 100ml de PBS 1x a 60°C agitando frecuentemente. Se alicuota y se guarda a -20°C. No se debe volver a congelar después de descongelar por primera vez.

Se debe manipular con guantes y mascarilla y preparar en campana de extracción de gases debido a la alta toxicidad por inhalación y por contacto tanto del sólido como de los vapores.

4.2 Hibridación *in situ* de embriones de *D. melanogaster* con sondas de ARN.

Mientras no se indique lo contrario este protocolo ha de realizarse en condiciones libres de ARNasas.

Pretratamientos

- Se hacen dos lavados de los embriones con metanol.
- Se incuban en agitación con una mezcla de paraformaldehído 4% y metanol (1:1) durante 5min.
- Se incuban en agitación con paraformaldehído 4% en PBT durante 25min.
- Se realizan tres lavados con PBT, uno rápido, uno de 10min y otro rápido, en este orden.
- Se incuban durante 2,5min en PBT con proteinasa K a 50µg/ml con agitación. Este tiempo es muy crítico y ha de ser controlado con exactitud.
- Se detiene la digestión con proteinasa K mediante dos lavados de 1min en PBT con glicina (JT Baker, Cat N° 1504) a 2mg/ml.
- Se realizan tres lavados con PBT, dos rápidos y uno de 5min, en este orden.
- Se incuban en agitación con paraformaldehído al 4% en PBT durante 25min.
- Se realizan tres lavados con PBT, uno rápido, uno de 10min y otro rápido, en este orden.

Hibridación

- Se lavan los embriones durante 10min en PBT y tampón de hibridación (1:1) en agitación y a temperatura ambiente.
- Se realiza un lavado rápido con tampón de hibridación (cuando se realizan lavados con la solución de hibridación hay que tener cuidado, pues los embriones tardan en caer al fondo).
- Se prehibridan con 1ml de solución de hibridación durante 1 o 2h a 55°C con agitación. En este punto, es muy importante el movimiento, ya que si se dejasen quietos los embriones se apelmazarían.

- Se hibridan en un volumen de 100µl de solución de hibridación con una concentración de la sonda entre 1:10 y 1:1000. Para preparar la sonda se calienta la dilución escogida a 80°C durante 5min, se enfría en hielo/agua y se añade al tubo.
- Se incuban durante toda la noche a 55°C sin rotación. Se recupera la sonda.
- Se preabsorbe el anticuerpo (apartado específico al final).

Lavados y Detección

A partir de este punto no es necesario que las condiciones sean libres de ARNasas.

- Se realizan un par de lavados con 500µl de tampón de hibridación.
- Se incuban los embriones dos veces con 1ml de tampón de hibridación durante 1 hora.
- Se rehidratan haciendo dos lavados de 15min en solución de hibridación y PBT (1:1).
- Se realizan tres lavados con PBT, uno rápido, uno de 10min y otro rápido, en este orden.
- Se lavan con PBT-0,15% BSA (Roche, *Bovine serum albumin fraction V* Cat N° 735086) entre 15 y 30min con agitación.
- Se incuban durante al menos 1h (mejor 3-4h) con anticuerpo anti-digoxigenina preabsorbido en PBT-0,1% BSA a una concentración 1:2000. Después se recupera el anticuerpo, ya que se puede emplear varias veces.
- Se realizan tres lavados en PBT, uno rápido, uno de 1h y otro rápido para eliminar el exceso de anticuerpo.
- Se transfieren los embriones a un recipiente donde puedan ser observados bajo una lupa binocular (por ejemplo una placa multipocillo) y se lavan en solución de detección durante 5min.
- Se prepara la siguiente mezcla de detección: se añaden 9µl de NBT a 1ml de Genius-3 1x, se mezcla bien y se agregan 7µl de X-fosfato.
- Se añade esta mezcla a los embriones y se mantiene la reacción en la oscuridad verificando periódicamente su progresión.
- La reacción se detiene realizando varios lavados con PBT.
- Se realiza el montaje de los embriones. Para ello se sustituye el PBT por glicerol al 80% y se colocan los embriones en los portaobjetos para su observación al microscopio óptico.

Preabsorción del anticuerpo

- Se lavan algunos embriones de los almacenados en etanol absoluto con etanol absoluto nuevo.
- Se enjuagan 3 veces con PBT y se lavan durante 5min en el mismo tampón.
- Se preabsorbe el anticuerpo anti-digoxigenina en PBT durante toda la noche.

Disoluciones a destacar:

✓PBS 10x.

18,6 mM Na H₂PO₄ (2,56gr NaH₂PO₄·H₂O por litro)

84,1 mM Na₂ HPO₄ (11,94gr Na₂ HPO₄ por litro)

1,75 M NaCl (102,2gr NaCl por litro)

Se ajusta a pH 7,4 con HCl o NaOH. Se guarda a temperatura ambiente

✓**PBT.**

PBS 1x, 0,1% Tween 20 (Panreac Cat. N° 212312).

✓**Tampón de hibridación para *in situ* en embriones.**

Formamida desionizada 50%
(Merck Cat. N° 109684 desionizada con resina AG 501-X8 (D) Bio-Rad Cat. N°142-6425, 5gr de resina por cada 100ml de formamida, se deja 1h a temperatura ambiente en agitación, se filtra a continuación y se guarda a -20°C).

SSC 20x (Roche Cat. N° 1666681) 5x
ARNt (Roche Cat. N° 109541) 200 µg/ml
ADN esperma de salmón (Sigma Cat. N° D7290) 222µg/ml
Denhardt's 50x (Sigma Cat. N° D9905) 1x
Tween 20 0,1%

Se debe manipular el tampón con precaución, empleando guantes y mascarilla, puesto que la formamida es muy tóxica por inhalación y por contacto.

✓**Genius 3.**

Tris-Cl 100mM pH 9,5; NaCl 100mM; MgCl₂ 50mM.

4.3 Hibridación *in situ* en cromosomas politénicos de *D. melanogaster* con sondas de ADN.

Se ha seguido el protocolo desarrollado por De Frutos *et al.* (1990). El método consiste en el uso de sondas no radiactivas marcadas con digoxigenina-dUTP para la hibridación *in situ* de cromosomas politénicos de *Drosophila*.

Obtención de preparaciones de cromosomas politénicos

Uno de los requisitos imprescindibles es la obtención de buenas preparaciones citológicas. Por una parte, los cromosomas deben estar bien extendidos sobre el portaobjetos, no se deben apreciar refringencias y el grado de aplanamiento debe permitir que sea perfectamente distinguible su patrón de bandas; por otra parte, debe eliminarse cualquier resto celular que rodee a los cromosomas, para evitar la aparición de ruido de fondo.

- Las glándulas salivares se extraen de larvas de tercer estadio, en NaCl 100mM bajo una lupa binocular y eliminando con agujas enmangadas todos los cuerpos grasos que rodean a las glándulas.
- A continuación se colocan en ácido acético frío al 45% durante 30-180s, con ello se eliminan parcialmente las proteínas básicas del cromosoma y se facilita el aplastado y la accesibilidad de los reactivos.
- Sobre un portaobjetos se colocan 7µl de una mezcla fría de ácido acético, ácido láctico y H₂O_d (en relación 3:1:2) que actúa como fijador y se depositan las glándulas en ella.
- Se fraccionan con la ayuda de las agujas enmangadas y se dejan inmersas en el fijador durante 5min.
- Se coloca el cubreobjetos sobre las glándulas y se aplastan con el extremo de un lápiz, al tiempo que se realizan desplazamientos laterales del cubreobjetos sobre el portaobjetos (así se consigue una mejor extensión de los cromosomas).
- Se seleccionan, al microscopio de contraste de fases, las preparaciones que cumplan las condiciones anteriormente descritas.

- Las preparaciones escogidas se sumergen inmediatamente en nitrógeno líquido durante 5-15min. Se les retira el cubreobjetos y se deshidratan con dos lavados en etanol 70% y otros dos en etanol absoluto de 10min de duración cada uno de ellos. Se secan al aire.

Pretratamientos térmicos. Desnaturalización de las preparaciones

- Las preparaciones se incuban 30min en solución SSC 2x precalentada a 65°C.
- Se lavan con SSC 2x una vez durante 5min.
- Se realiza la desnaturalización alcalina de los cromosomas mediante un tratamiento con NaOH 0,07N durante 3min.
- Se lavan las preparaciones con SSC 2x una vez durante 5min.
- Se deshidratan con dos lavados de 5min con etanol 70% y otros dos con etanol absoluto y se secan al aire.

Hibridación

- La mezcla de hibridación (sonda marcada y tampón de hibridación) se calienta a 90°C durante 5min para desnaturalizar la sonda y se enfría en hielo durante un par de minutos.
- Se deposita la mezcla sobre los cromosomas, se coloca un cubreobjetos y se sella cada preparación con laca de uñas.
- Se colocan las preparaciones en una cámara húmeda en solución SSC 4x.
- Se incuban toda la noche a 40-42°C.

Lavados y Detección

- Se retira el cubreobjetos de cada preparación.
- Se realizan dos lavados de 10min con SSC 4x a 40°C.
- Se realizan dos lavados de 10min con SSC 4x a temperatura ambiente.
- Se realizan dos lavados de 5min con PBS a temperatura ambiente.
- Se realizan dos lavados de 5min con PBTx a temperatura ambiente.
- Se realizan tres lavados de 5min con PBS a temperatura ambiente.
- Se realizan dos lavados de 3min con el tampón 1 de revelado a temperatura ambiente.
- Se realiza una incubación de 30min con el tampón 2 de revelado a temperatura ambiente.
- Se realiza un lavado de 3min con el tampón 1 de revelado a temperatura ambiente.
- Se realiza una incubación de 60min con agitación moderada con una dilución 1:5000 del anticuerpo anti-digoxigenina en tampón 1 de revelado.
- Se realizan dos lavados de 15min con el tampón 1 de revelado a temperatura ambiente.
- Se realizan dos lavados de 15min con el tampón 3 de revelado a temperatura ambiente.
- Se incuban las preparaciones durante un mínimo de 15min en la solución de color (tampón 3 de revelado más NBT y X-fosfato).
- Una vez ha aparecido la señal se lavan con H₂O varias veces.

Disoluciones a destacar:

✓**PBTx.**

PBS 1x, 0,3% Tritón X-100 (Roche Cat. N° 789704)

✓**Tampón de hibridación para *in situ* en cromosomas politénicos.**

Formamida desionizada 50%

SSC 20x 4x

Denhardt's 50x 1x

ADN esperma de salmón (Sigma Cat. N° D7290) 400µg/ml

Dextran sulfato (Sigma Cat. N° D6001) 10%

Se debe manejar el tampón con precaución dada la toxicidad ya indicada de la formamida.

✓**Tampón 1 de revelado.**

Tris-Cl 100mM pH 7,5, 150mM NaCl.

✓**Tampón 2 de revelado.**

Tampón 1 de revelado, 1% de agente bloqueador (Roche Cat. N° 1096176).

✓**Tampón 3 de revelado.**

Genius 3, tween 20 0,1% y levamisol 1mM (Sigma Cat. N° L-9756).

✓**SSC 20X-4X.**

NaCl 3M (JTBaker, Cat N° 0277) y sodio citrato dihidrato 0,3M (JTBaker Cat. N° 0280).

4.4 Detección inmunohistoquímica en embriones de *D. melanogaster*.

Pretratamientos

- Se rehidratan los embriones previamente fijados con una serie de diluciones de metanol (80%,50%,30%).
- Se hacen dos lavados de 10min cada uno con PBTx a temperatura ambiente en agitación.
- Se hacen dos lavados de 15min cada uno con PBTx-2% BSA a temperatura ambiente en agitación.
- Se trasladan los embriones a tubos de 0,5ml.

Incubación con el anticuerpo primario y secundario

- Se incuban los embriones con el anticuerpo primario diluido en PBTx-2% BSA durante toda la noche a 4°C o bien 2h a temperatura ambiente.
- Se hace un lavado rápido y dos lavados de 30min con PBTx-2% BSA a temperatura ambiente en agitación.
- Se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado a una dilución entre 1:200 y 1:400 en PBTx-2% BSA con suero al 2%, durante toda la noche a 4°C o bien 2h a temperatura ambiente. Para 1,5ml de PBTx-2% BSA se añaden 30µl de suero y 7,5µl de anticuerpo secundario.

Lavados y Detección

- Se hace un lavado rápido y otros dos de 30min con PBTx-2% BSA a temperatura ambiente en agitación.
- Se prepara el reactivo ABC (ImmunoPure® Ultra-sensitive ABC Peroxidase Kit, PIERCE Cat. N° 32052), a 500µl de PBTx-BSA se le añaden 9µl de reactivo A y 9µl de reactivo B y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30min.
- Se incuban los embriones con el reactivo ABC al menos durante 30min.
- Se realizan tres lavados de 20min cada uno con PBTx.

Para la detección de la señal se emplea la reacción con DAB, que consiste en la acción de la peroxidasa conjugada a la biotina sobre el H₂O₂, lo cual provoca la ruptura de esta molécula y se generan radicales libres OH⁻ muy reactivos que producen un cambio redox en el sustrato DAB, que cambia de color y se oscurece.

- Se prepara el sustrato de detección añadiendo 10µl del *stock* de DAB por cada 200µl de PBTx.
- Se incuban los embriones en dicha mezcla durante 5min.
- Se añade H₂O₂ (2,4µl de H₂O₂ al 0,3% por cada 200µl de la mezcla de detección, hasta una concentración final de 0,03%).
- Se incuban a temperatura ambiente durante 10min y se observa el transcurso del revelado bajo una lupa binocular.
- Se detiene la reacción con varios lavados con PBS.

Disoluciones a destacar:

✓DAB.

DAB (3,3' diaminobencidina, Sigma Cat. N° D8001) 10mg/ml en Tris 50mM pH 8. Este reactivo es muy tóxico, se ha de pesar con mascarilla y siempre se ha de trabajar con guantes. Todos los residuos y el material utilizado han de tratarse con lejía durante dos días para destruir el DAB y eliminar la contaminación.

✓Anticuerpos primarios.

Los distintos anticuerpos primarios que han sido utilizados a lo largo de este trabajo se detallan a continuación en la Tabla M9.

La mayoría de los anticuerpos primarios empleados proceden del *Developmental Studies Hybridoma Bank* (<http://www.HIOWA.edu/~dshbwww>) en Estados Unidos. En los casos en que han sido cedidos por investigadores particulares o adquiridos de una casa comercial, se ha añadido el nombre correspondiente en la columna "anticuerpo".

Tabla M9. Anticuerpos primarios empleados en la detección inmunohistoquímica en embriones de *D. melanogaster*.

Anticuerpo	Inmunohistoquímica	Animal donante	Dilución empleada
mAb Miosina (Dr. Dan Kiehart)	Sistema muscular de <i>Drosophila</i>	Ratón	1:8
Krüpple (Dr. Carlos Alonso)	Células fundadoras de algunos músculos	Cobaya	1:300
Even-skipped (Dr Manfred Frasch)	Proteína even-skipped	Conejo	1:2000
mAb BP 102 anti-CNS	Axones de las neuronas del Sistema Nervioso Central	Ratón	1:200
mAb 22C10	Citoplasma y membrana interna de todas las neuronas del Sistema Nervioso Periférico, y algunos axones sensoriales.	Ratón	1.50
mAb 1D4 anti-fasciclinaII	Axones del Sistema Nervioso Central y axones motores	Ratón	1:20
Elav-9F8A9	Núcleo de todas las neuronas	Ratón	1:200
mAb EC11 anti-pericardina	La matriz extracelular rodeando a las células pericardiacas y cardiacas del tubo cardiaco.	Ratón	1:2
Zfh (Dr. Zhi-Chun Lai)	Células cardiacas y percardiacas	Ratón	1:200
Anti- β galactosidasa (Cappel ICN Cat. N° 55976).	Proteína β -galactosidasa	Conejo	1:1000
Anti-GFP (Roche Cat. N° 1814460)	Proteína GFP	Conejo	1:1000

mAb: anticuerpo monoclonal

✓ Anticuerpos secundarios.

En la Tabla M10 se indican los anticuerpos secundarios utilizados.

Tabla M10. Anticuerpos secundarios empleados en la detección inmunohistoquímica en embriones de *D. melanogaster*

Anticuerpo Secundario Biotinilado	Dilución empleada
IgG ₁ (H+L) Anti-conejo biotinilado hecho en cabra, (PIERCE Cat. N° 31806)	1:200 en suero de cabra (Inmuno Pure Normal Goat Serum, PIERCE Cat. N° 31873) al 2%.
IgG ₁ (H+L) Anti-ratón biotinilado hecho en caballo, (PIERCE Cat. N° 31820)	1:200 en suero de caballo (Inmuno Pure Normal Horse Serum, PIERCE Cat. N° 31874) al 2%.
IgG ₁ (H+L) Anti-cobaya biotinilado hecho en caballo, (Vector Cat. N° BA-7000)	1:200 en suero de cabra (Inmuno Pure Normal Goat Serum, PIERCE Cat. N° 31873) al 2%.

4.5 Análisis microscópico de retinas de adultos de *D. melanogaster*.

El protocolo se realiza a lo largo de tres días.

Día1

- Se duermen las moscas y se colocan de lado, con el ojo que nos interese hacia arriba.
- Se corta la cabeza y el ojo que ha quedado en la parte inferior, para facilitar la entrada del fijador.
- Se colocan los ojos en fijador glutaraldehído recién preparado y en hielo.
- Se añade el mismo volumen de fijador de osmio recién preparado y se dejan 30min en hielo.
- Se elimina todo el fijador, se añade fijador de osmio nuevo y se deja 1-2h. En este momento, se saca la resina epoxi durcapan del congelador para que se vaya descongelando.
- Se elimina el fijador y se deshidratan los ojos con etanol a diferentes concentraciones, con lavados de 5min según la siguiente serie: 30%-50%-70% (estos tres en hielo)-90%-100%-100% (estos tres a temperatura ambiente).
- Se acaba la deshidratación con dos lavados de 10min con óxido de propileno (Fluka, Cat N° 82320).
- Se añade una mezcla de óxido de propileno y resina (1:1) y se deja toda la noche a temperatura ambiente.

Día2

- Se elimina la mezcla de óxido de propileno y resina.
- Se añade resina pura y se dejan los ojos al menos 4h a temperatura ambiente.
- Se coloca un poco de resina nueva en los moldes.
- Se sitúan los ojos en los moldes de manera que queden cerca del extremo estrecho del molde.
- Se rellenan los moldes con resina nueva.
- Se dejan toda la noche a 70°C en un horno Pasteur.

Día3

- Los ojos se desmoldan, se cortan y se montan:
 - Se colocan los ojos embebidos en un pedestal adecuado y con una cuchilla recubierta de teflón se va eliminando resina para conseguir una forma trapezoidal alrededor del ojo.
 - Se cortan secciones finas de 1,5-2 μ m con el ultramicrotomo.
 - Se colocan las secciones en un portaobjetos gelatinizado sobre el que previamente hemos colocado un poco de H₂Od.
 - Se calientan las preparaciones a 80°C para eliminar el agua.
 - Se montan las secciones colocando sobre ellas una o dos gotas de DPX (Fluka Cat N° 44581) y un cubreobjetos.
 - Se guardan toda la noche para que se seque el medio de montaje.
- Se observan las preparaciones al microscopio de contraste de fases en la fase ph3, con el objetivo de 63 aumentos, con aceite de inmersión y sin filtros azules.

Disoluciones a destacar:

✓ **Fijador de glutaraldehído.**

Glutaraldehído al 8% (Fluka Cat. N° 49623), H₂O_d y tampón fosfato 0,2M pH 7,2 en relación (1:1:2). Este tampón fosfato se prepara mezclando en una proporción 72:28 Na₂HPO₄ 0,2M y NaH₂PO₄ 0,2M respectivamente.

✓ **Fijador de Osmio.**

Fijador glutaraldehído y Osmio al 4% (Polyscience Inc Cat. N° 0972A) (1:1). El osmio debe manipularse con cuidado en campana y empleando guantes dada su elevada volatilidad y toxicidad.

✓ **Resina Epoxi Durcapan Soft (Fluka mezcla de 4 compuestos Cat. N° 44611-44614).**

Resina (A) 54gr, Endurecedor (B) 44,5gr, Acelerador (C) 2,5gr, Plastificante (D) 10gr. Este reactivo es muy tóxico y siempre se ha de trabajar con guantes. Todos los residuos y el material utilizado han de tratarse toda la noche a 70°C, así polimeriza la resina y dejan de ser tóxicos los materiales empleados.

4.6 Preparación de cutículas de *D. melanogaster*.

- Se colocan las moscas en recipientes adecuados para la recogida de embriones en placas de agar.
- Se permite la puesta de huevos durante unas horas.
- Se deja la placa de agar durante un tiempo total de 18-20h, incluido el tiempo de puesta.
- Transcurrido este tiempo se recogen los embriones con un pincel y una cestilla.
- Se decorionizan con lejía al 50% durante 3min.
- Se lavan con agua.
- Se transfieren los embriones a un tubo de microcentrífuga de 1,5ml que contiene heptano y metanol (1:1).
- Se agita durante 30s. Los embriones desvitelinizados se irán al fondo del tubo.
- Se realizan tres lavados con metanol.
- Se colocan los embriones en un portaobjetos y se deja que el metanol se evapore al aire durante unos 10min.
- Se añaden 2-3 gotas de solución Hoyers al portaobjetos, se coloca un cubreobjetos y se deja toda la noche en una estufa a 70°C.
- Se observan las preparaciones al microscopio óptico.

Disoluciones a destacar

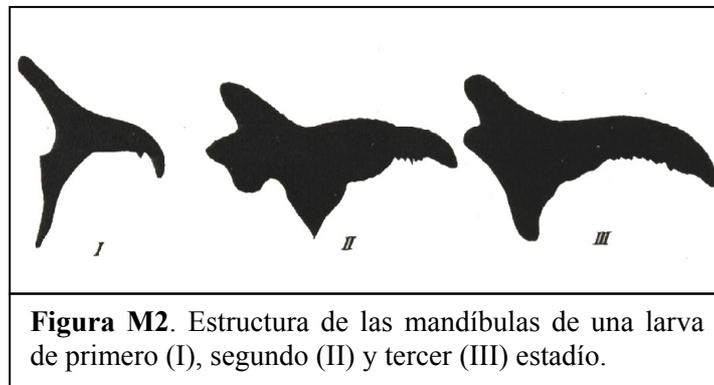
✓ **Solución Hoyers.**

Para 50ml se emplean 30gr de goma arábica (Sigma Cat. N° G9752), 20 g de glicerol, 200g de hidrato cloral (Sigma Cat. N° G8383) y 50ml de H₂O_d. Se añade poco a poco la goma para que se vaya disolviendo. Se añade el hidrato cloral en pequeñas dosis y finalmente se añade el glicerol y se filtra la mezcla.

4.7 Análisis de las mandíbulas de larvas de *D. melanogaster*.

El protocolo es muy sencillo, tal y como se describe en Ashburner (1989), y consiste en colocar las larvas en un portaobjetos y situar encima de ellas otro portaobjetos. A continuación, ambos se mantienen unidos mediante cinta aislante, de este modo las larvas son sometidas a una presión suficiente para poder observar sus mandíbulas al microscopio.

La edad de la larva depende del número de dientes presentes en las mandíbulas y de la curvatura de las mismas. En la figura M2 se presenta la morfología de las mandíbulas según el estadio larvario.



2. Diseño experimental de la mutagénesis insercional.

5.1 Los elementos PArB y EP.

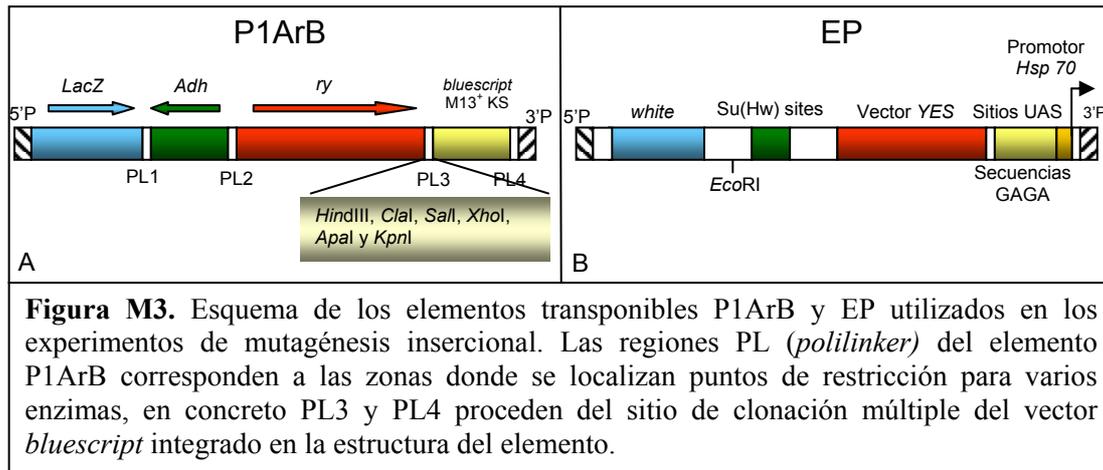
Se partió de dos elementos P insertados en la región 8C-D del cromosoma X. La proximidad aumenta la probabilidad de que se produzcan nuevas inserciones que afecten al gen de interés. Se trata de elementos del tipo P1Arb y EP presentes en las líneas de *Drosophila* P1468 y EP1598, respectivamente.

El denominado PArB (figura M3-A) según se describe en Bellen *et al.* (1988), contiene:

- Las repeticiones invertidas del elemento P original que le permiten transponerse en presencia de transposasa exógena.
- La fusión P-lacZ. La secuencia codificante de la β -galactosidasa de *E. coli* está fusionada en pauta con el segundo exón de la transposasa del elemento P natural.
- El gen alcohol deshidrogenasa que permite la selección a favor de la síntesis de la enzima usando etanol, o contra su expresión si se utiliza pentine-3-ol.
- Un marcador fenotípico de color de ojos: una copia salvaje del gen *rosy* procedente del vector Carnegie 20 (Rubin y Spradling, 1983). El fenotipo de los mutantes para *rosy* consiste en un ligero color rosado de ojos en los individuos adultos
- El vector plasmídico *pBluescript*, localizado en la región 3' del transposón, que porta un gen que confiere resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano.

El elemento EP (figura M3-B) según se describe en Rorth (1996), contiene:

- Las repeticiones invertidas del elemento P original que le permiten transponerse en presencia de transposasa exógena.
- Un marcador fenotípico de color de ojos: un alelo salvaje del gen *white* llamado mini-*white* procedente del vector *pCasper4*. El fenotipo de los mutantes para el gen *white* consiste en color de ojos blanco en los individuos adultos.
- Las secuencias de unión de Su(Hw) del elemento transponible *gypsy*.
- El vector plasmídico *YES*, localizado hacia la región 3' del transposón que porta un gen que confiere resistencia a kanamicina y un origen de replicación bacteriano.
- Un potenciador de la transcripción constituido por un conjunto de sitios GAGA y por 14 repeticiones de las secuencias de unión de la proteína GAL4 (secuencias UAS). Está localizado muy cerca del extremo 3'.
- El promotor del gen de choque térmico *hsp70*.



5.2 Movilización de los elementos P1468 y EP1598.

En el caso de la cepa P1468, antes de comenzar la movilización, fue imprescindible la construcción de una serie de cepas de *Drosophila* necesarias para el desarrollo del experimento. Estas cepas deben presentar marcadores que nos permitan seguir de forma inequívoca la segregación del cromosoma que transporta al elemento P. Como este elemento lleva, entre otros, el alelo salvaje del gen *rosy* (*ry*), un marcador fenotípico que afecta al color de los ojos, para poder seguir la trayectoria del elemento P a través de este marcador todas las cepas empleadas deben ser mutantes para ese gen (*ry*⁻). Un segundo marcador que hemos introducido en las distintas cepas es un alelo mutado del gen *lozenge* (*lz*), que afecta al tamaño y a la rugosidad del ojo. Debido a que es un gen bien descrito, y está relativamente cerca del gen *fh*, nos servirá, mediante la selección de cromosomas recombinantes, para distinguir nuevas inserciones en el cromosoma X de otras en el resto de cromosomas. Por último, tuvimos que construir otra cepa que además de ser *ry*⁻ llevara un cromosoma X equilibrador, para poder establecer las posibles nuevas inserciones que afecten a la viabilidad de las moscas.

Las cepas que se construyeron para la movilización fueron:

- $ry^{-} / ry^{-} ; lz^k / lz^k$: Nos facilitará seguir la segregación del elemento P.
- $ry^{-} / ry^{-} ; FM6 / Y$: Nos permitirá establecer aquellas líneas en las que la movilización del elemento P haya generado una mutación letal en homocigosis o hemicigosis, pues lleva un cromosoma X equilibrador.
- TM6 *Hn* (*P*) *Ubx(15)...*/TMS ry^2 *Sb* $\Delta 2-3$ 99B; lz^k/lz^k : Lleva la fuente de transposasa en un fondo genético lz^k .

Los cruces desarrollados para la obtención de todas estas líneas se esquematizan a continuación en la Tabla M11.

Tabla M11. Esquema de la construcción de las líneas necesarias para la movilización.

A - Cepa $ry^- / ry^- ; lz^k / lz^k$			
P	$ry^- / ry^- ; X / Y$ (en masa)	X	$+/+ ; lz^k / lz^k$ (en masa)
F₁	Selección de machos ry^- y lz^k		
	$ry^- / + ; lz^k / Y$	X	$ry^- / + ; X / lz^k$
F₂	Selección de individuos ry^- y lz^k		
	$ry^- / ry^- ; lz^k / Y$		$ry^- / ry^- ; lz^k / lz^k$
	Se cruzan entre ellos y queda la cepa establecida		
B - Cepa $ry^- / ry^- ; FM6 / Y$			
P	$ry^- / ry^- ; X / Y$	X	$+/+ ; FM6 / FM7c$
F₁	Selección machos ry^- FM6 y hembras ry^- FM6/FM7c		
	$ry^- / ry^- ; FM6 / Y$		$ry^- / ry^- ; FM6 / FM7c$
	Se cruzan entre ellos y queda la cepa establecida		
C - Cepa $TM6... / TMS ry^2 Sb \Delta 2-3 99B ; lz^k / lz^k$			
P_{1A}	$TM6... / w^- \Delta 2-3 Sb e ; X / Y$	X	$+/+ ; lz^k / lz^k$
F_{1A}	Selección de machos Sb^+ $TM6... / + ; lz^k / Y$		
P_{1B}	$Dr / TMS Sb ry^2 \Delta 2-3 99B ; X / Y$	X	$+/+ ; lz^k / lz^k$
F_{1B}	Selección de hembras Sb $TMS Sb ry^2 \Delta 2-3 99B / + ; X / lz^k$		
F_{1A} X			
F_{1B}	$TM6... / + ; lz^k / Y$	X	$TMS Sb ry^2 \Delta 2-3 99B / + ; X / lz^k$
F₂	Selección de machos y hembras Sb		
	$TM6... / TMS Sb ry^2 \Delta 2-3 99B ; lz^k / Y$		
	$TM6... / TMS Sb ry^2 \Delta 2-3 99B ; lz^k / lz^k$		
	Se cruzan entre ellos y queda la cepa establecida		

3. Obtención de moscas transgénicas mediante microinyección.

6.1 Obtención de líneas transformadas.

Todo el proceso se esquematiza en la figura M4.

Preparación de la mezcla de inyección.

- Se mezclan en un tubo de 500µl, 20µgr de la construcción a inyectar y 5µgr de plásmido ayudante y se añade H₂Odd hasta un volumen de 100µl.
- Se precipita la mezcla con 2,5 volúmenes de etanol absoluto 100% y NaAc 3M pH 5,2 (24:1) toda la noche a -20°C.
- Al día siguiente se centrifuga la mezcla a 14000rpm durante 15min a 4°C.
- Se lava el precipitado dos veces con EtOH 70% - 0.2M NaCl frío a -20°C centrifugando 5min a 14000rpm y a 4°C en ambos lavados.
- Se realiza un último lavado con EtOH 70% frío (-20°C), centrifugando 5min a 14000rpm y a 4°C.
- Se seca el precipitado al aire o en bloque seco a 37°C y se redisuelve en 50µl de tampón de inyección. Se comprueba en gel de agarosa obteniéndose 2-3 bandas de alto peso molecular.
- Se guarda a -20°C hasta su uso.

Disoluciones a destacar

✓Tampón de microinyección

5mM KCl y 0.1mM tampón fosfato pH 7.8. Se preparan unas soluciones *stock* 0.1M de ambos reactivos.

- A. En el caso del KCl, disolver 0.37gr en 50ml de H₂Odd.
- B. En el caso del tampón fosfato pH 7.8 se mezclan 89.6ml de Na₂HPO₄ 1M y 10.4ml de NaH₂PO₄ 1M, que a su vez se preparan disolviendo en H₂Odd 1.278gr en 90ml y 0.172gr en 10ml respectivamente. Luego los 100ml mezclados se diluyen hasta un litro.

De aquí, para 10ml de tampón de inyección, se toman 500µl de 0.1M KCl y 10µl de tampón fosfato 0.1M pH 7.8. Al final el tampón se filtra y ya está listo para su uso.

Obtención de los embriones.

Se utilizaron embriones *yw* de 0-1h. El uso de este fondo genético es útil para distinguir no sólo los individuos transformados, sino también las contaminaciones por otras cepas de *Drosophila*. Es importante tener siempre una población elevada de moscas en cultivo, como recambio de las que están siendo utilizadas para la obtención de embriones.

- Antes de empezar los experimentos se sometió a las moscas a un periodo de adaptación de dos o tres días en el sistema de puesta de embriones (*Tubular fly cage*, Labscientific inc. Cat. N° BGSU-4).
- Se cultivan las moscas en un incubador a 18°C bajo un ciclo día-noche (día desde 2AM-2PM y noche desde 2PM-2AM) puesto que así se incrementa la eficacia en la puesta de huevos. Las moscas ponen más huevos durante el ciclo de noche.
- Durante el transcurso de los experimentos, se sincronizan los embriones diariamente. Para ello se cambia la placa varias veces a lo largo de las primeras 2-3h y luego se coloca la primera placa de recogida que se deja 1h, al final de esa hora se cambia de nuevo la placa y así sucesivamente.

Preparación de la aguja y del aceite de microinyección.

- El aceite de inyección se oxigena durante 3h antes de la microinyección, porque así se favorece la supervivencia de los embriones.

Se prepara la aguja de microinyección (femtotips, Eppendorf Cat. N° 5242 952.008) unos minutos antes de iniciar el proceso:

1. Se centrifuga la mezcla de inyección 10min a 4°C a máxima velocidad para enviar al fondo las moléculas más grandes.
 2. Se toman unos 20µl de la parte de arriba de la mezcla con puntas especiales de carga (microloader, Eppendorf Cat. N° 5242 956.003) y se llena la aguja con unos 2µl de mezcla con cuidado de no generar burbujas.
 3. Se quita la protección de la aguja y se coloca en el micromanipulador.
- En un portaobjetos se colocan 3-4 embriones, se decorionizan y se cubren de aceite, se pone el portaobjetos en la platina y se enfocan los embriones. A continuación se enfoca el borde del portaobjetos, se retira este y se acerca la aguja hasta que quede enfocada, sin tocar el microscopio, de modo que veamos sólo el extremo de la aguja. Se acerca el portaobjetos hasta que quede muy próximo a la aguja y con un movimiento seco rompemos el extremo de la aguja intentando hacerla lo mas fina posible.

Montaje de los embriones (18°C).

- Para una sesión de inyección de 4h se preparan unos 8-10 portaobjetos (2 por cada hora). En cada uno de los portaobjetos se coloca en su centro un trozo de celo de doble cara y el pegamento de montaje en uno de los bordes.
- Se recogen los embriones de la placa de puesta con un pincel y se extienden sobre el celo de doble cara.
- Con el gancho manipulador (que lleva en su extremo un trozo de alambre fino doblado a modo de garfio) se ruedan los embriones para decorionizarlos, con cuidado de no dañarlos.
- Se escogen aquellos que sean jóvenes (cuanto más opacos mejor) y se colocan sobre el pegamento de montaje, con el extremo posterior (donde están las células polares) hacia fuera.
- Se montan en grupos de cinco durante 10-12min. Es importante que no estén muy juntos para que puedan respirar bien.

Disoluciones a destacar

✓Pegamento de montaje.

Se coloca una buena cantidad de celo de doble cara en heptano y se incuba en agitación. Es importante controlar la viscosidad de la mezcla, añadiendo o evaporando el heptano. El heptano debe manipularse con mascarilla para protegerse de su toxicidad por inhalación.

Desecado de los embriones (18°C).

La cámara de desecación es un recipiente en el que hemos colocado como desecador sulfato cálcico anhidro en polvo (JT Baker Cat. N° 1048) con una toallita de papel encima para que el contacto no sea directo. El desecador hay que cambiarlo cuando se hidrata.

- Se coloca el portaobjetos (al que le hemos quitado el celo de doble cara) con los embriones decorionizados en la cámara de desecación, durante 10-12min. Este tiempo es crítico y se ha de ir regulando. Transcurrido el mismo se saca el portaobjetos y los embriones se cubren con aceite halocarbonado oxigenado de la serie 700 (Sigma Cat. N° H-8898), con cuidado de no ensuciar la parte inferior del portaobjetos.

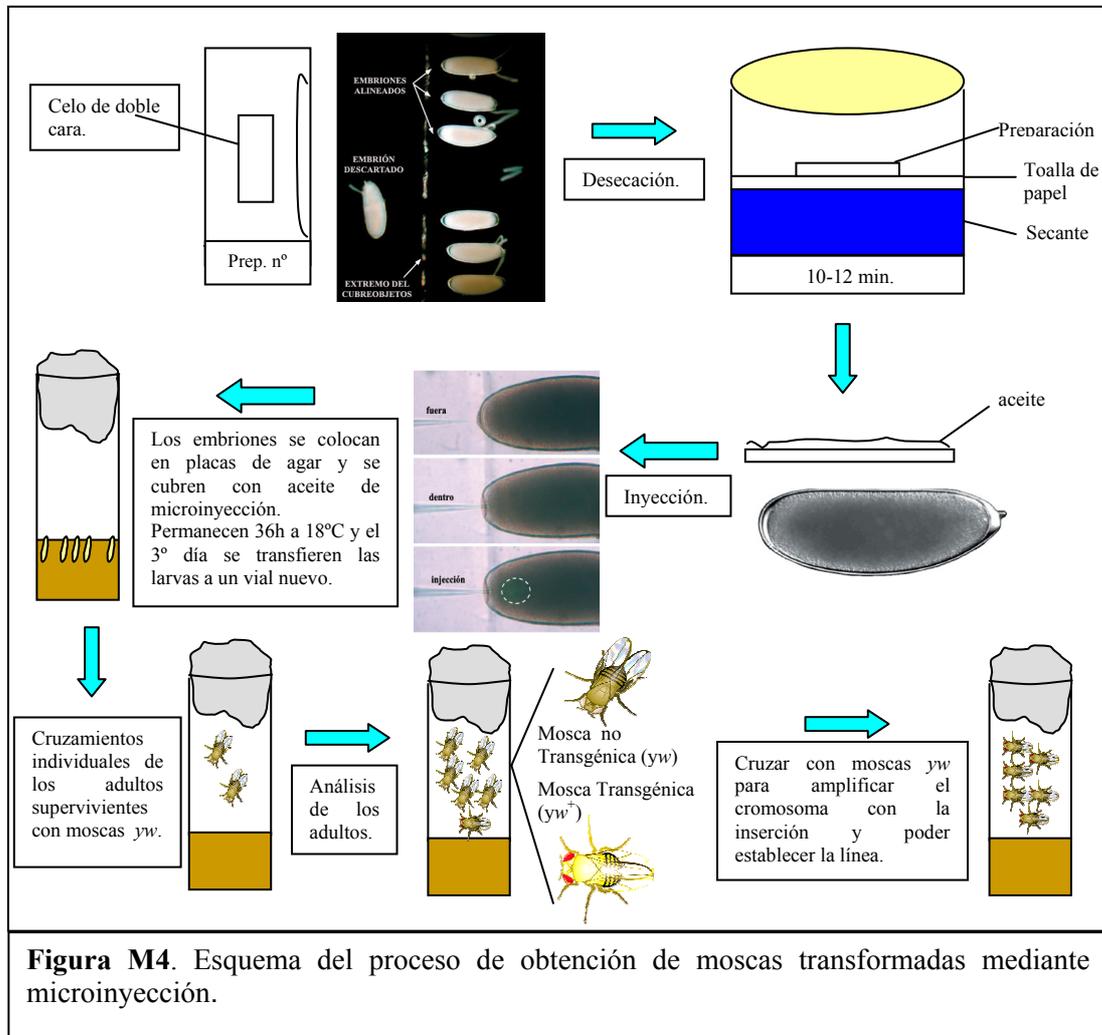
Microinyección de los embriones (18°C).

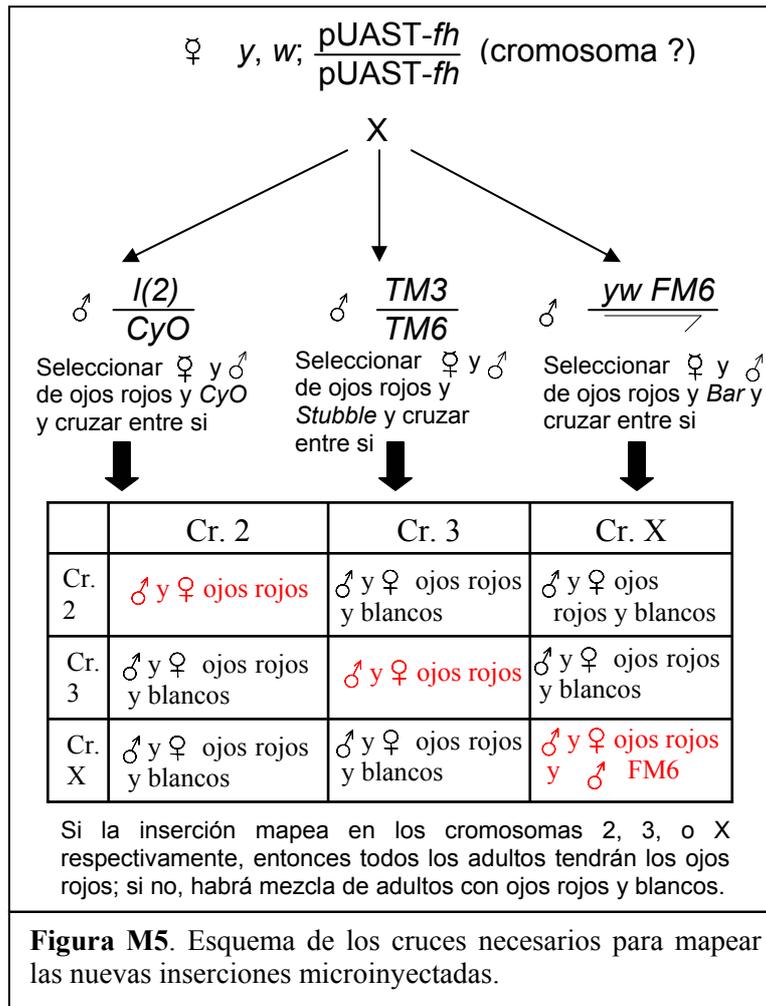
- Se sitúa un portaobjetos con embriones ya desecados en el microscopio con el objetivo de 40 aumentos y se empieza desde la parte inferior del mismo, se coloca la aguja en el centro del embrión haciendo presión hasta atravesar la membrana.
- Se saca la aguja hasta quedar dentro solo el extremo de la misma y entonces se inyecta la burbuja de ADN ejerciendo presión sobre la jeringuilla y observando como se desplaza ligeramente el frente de las células polares.
- Se limpia la aguja de cualquier resto del embrión y se sigue el proceso repitiendo los pasos anteriores, moviendo la platina del microscopio.
- Se revisan en el microscopio invertido los embriones inyectados y se hace una lista de ellos, eliminando a la lupa los embriones inservibles (los embriones que se han montado al revés, torcidos, viejos, secos, húmedos, rotos, etc.).
- Se colocan los portaobjetos en placas cuadradas con medio de puesta de huevos y se recubren de nuevo los embriones con aceite, se nivelan las placas y se dejan a 18°C durante unas 36h.

Obtención de líneas transformadas.

- Transcurridas las 36h, los portaobjetos se pasan a temperatura ambiente y se empiezan a buscar larvas supervivientes, durante un par de días.
- Todas las larvas supervivientes que hayan sido inyectadas con la misma construcción se colocan en el mismo vial con comida y se espera a que se desarrollen hasta adultos. Conviene cuartear la comida para evitar que se seque si colocamos pocas larvas.
- La descendencia de los adultos supervivientes son los posibles individuos transformados, porque la inyección ha tenido lugar en sus células polares. Por ello se cruzan estos adultos con moscas de la cepa *yw*.
- Se observa la descendencia para detectar moscas que tengan los ojos rojos, ya que ellas habrán incorporado el plásmido inyectado. Para cada línea transformada se seleccionan 3-4 individuos y se cruzan con nuevas moscas *yw* para amplificar el cromosoma con la inserción.
- A continuación se establece la línea transformada, con la inserción en homocigosis siempre que sea posible.
- Finalmente, mediante cruces sencillos, se mapean las inserciones obtenidas. Es interesante conocer su localización para comprobar, en los experimentos posteriores, si los fenotipos obtenidos son debidos a su efecto intrínseco y no únicamente a la posición de la inserción.

En las figuras M4 y M5 se presentan respectivamente un esquema del proceso de obtención de moscas transgénicas y de los cruces necesarios para conocer la localización de las construcciones inyectadas.





4. El sistema UAS-GAL4.

Este sistema se ha empleado tanto para la sobreexpresión como para la interferencia del gen *fh*. Se realizaron cruces entre hembras vírgenes GAL4 y machos de las líneas transformadas. La importancia de seleccionar vírgenes reside en el hecho de que las hembras de *Drosophila* suelen retener en su interior esperma de la primera cópula y esto impediría un análisis adecuado de la progenie real del cruce.

Las líneas GAL4 empleadas ya fueron descritas en la sección 2.1 de este apartado.

Los cruces entre individuos tuvieron lugar a tres temperaturas diferentes (29°C-25°C-21°C) que serán especificadas en cada caso, aunque principalmente hemos empleado la temperatura más alta (29°C) porque proporciona un excelente equilibrio entre máxima actividad de la proteína GAL4 y mínimo efecto sobre la fertilidad y la viabilidad debido al crecimiento a altas temperaturas (Duffy, 2002). Cada experimento fue realizado simultáneamente para el cruce control (*yw* x *driver* GAL4), para el de sobreexpresión (UAS-*fh* x *driver* GAL4) y para el de interferencia (UAS-*fhIR* x *driver* GAL4).

5. Tests de supervivencia y de capacidad locomotora.

En los cruces de las líneas transgénicas UAS-*fh* y/o UAS-*fhIR* con la línea GAL4 correspondiente, en los que se obtuvo una descendencia adulta fenotípicamente salvaje y viable *a priori*, se aplicaron dos tests para probar los posibles efectos sobre la viabilidad de los individuos adultos y los posibles daños neuronales y/o musculares.

En ambos casos se emplearon individuos descendientes del cruce *yw* x *driver* GAL4 como control.

8.1 Test de supervivencia.

Para la realización de los tests de supervivencia se tomaron 100 descendientes de cada cruce y se situaron en viales con 25 individuos en cada uno. Cada dos días se transferían las moscas a viales nuevos, contabilizando las moscas supervivientes. Los experimentos se llevaron a cabo durante 40 días, a 29°C, ya que de acuerdo con Helfand y Rogina (2003), éste es el tiempo aproximado de vida de *D. melanogaster* a dicha temperatura. Se realizaron dos réplicas de cada experimento.

8.2 Test de capacidad locomotora.

Para medir posibles daños neuronales y musculares se realizó un test de escalada. Para ello, se tomaron 30 descendientes de cada cruce y se colocaron en la cámara de escalada (2 viales unidos, tal y como se describe en la figura M5). En cada prueba, se golpea con suavidad el sistema para enviar las moscas al fondo y se contabilizan las moscas que tras 18s quedan por debajo de una altura de 10cm. El experimento se llevó a cabo cada dos días durante 30-40 días, a 29°C. Para cada cruce y cada punto temporal se realizó el recuento 10 veces y de cada experimento se hicieron de dos a tres réplicas.

Las varianzas y las medias de cada conjunto de datos fueron analizadas mediante ANOVA y test *a posteriori* de Student-Newman-Keuls con un P valor < 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el paquete de programas SPSS v12.0.1

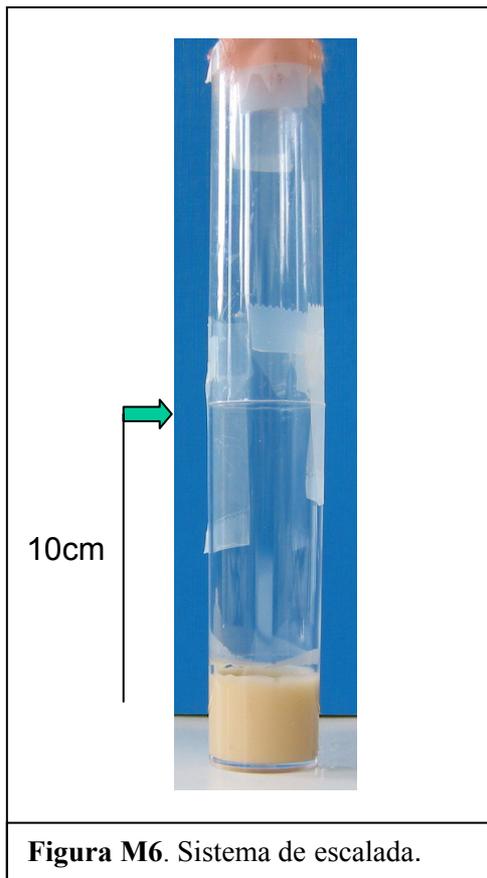


Figura M6. Sistema de escalada.

RESULTADOS



1. Movilización de elementos transponibles P localizados en la región 8C/D del cromosoma X.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido la obtención de mutantes estructurales del gen *fh*, cuyo estudio nos permitiera acercarnos al conocimiento de su función. El gen *fh* se había clonado en nuestro laboratorio, a partir del cósmido 125a12 (Cañizares *et al.*, 2000), que mapea en la banda 8C/D del cromosoma X según la información obtenida de la *flybase*. En esta región se identificaron varias inserciones de elementos P creadas por el Proyecto de Disrupción del Genoma de *Drosophila*, disponiéndose en las colecciones públicas de las cepas portadoras de tales inserciones. Por esta razón, entre las numerosas estrategias de mutagénesis aplicables en *Drosophila* para el estudio de la función génica, nos decidimos por la mutagénesis insercional mediante elementos transponibles. Se eligió inicialmente la línea P1468 por ser la primera identificada en esta región. Cuando la secuencia completa del genoma de *D. melanogaster* estuvo disponible, se pudo establecer con total exactitud la localización de otros elementos P. Se eligió una segunda línea, la línea EP1598, con un elemento P artificial situado más cerca de *fh*. A partir de este momento y para facilitar la lectura de los resultados, se nombrará de la misma manera a la línea que contiene al elemento P y al propio elemento.

1.1 Determinación de la distancia física entre el elemento P1468 y el gen *fh*.

1.1.1 Antecedentes.

Previamente a la realización de los experimentos de mutagénesis insercional, nos planteamos elaborar un mapa físico de la región *fh* con el doble objetivo de: (i) identificar la presencia de otros genes en la región, susceptibles por tanto de ser afectados por los sucesos de transposición y (ii) conocer la distancia física entre el elemento P presente en la línea P1468 y el gen *fh*.

En nuestro laboratorio ya se habían estudiado, en el cósmido 125a12, las regiones contiguas al gen *fh*, descubriendo dos posibles pautas abiertas de lectura en aquel momento desconocidas, una a cada lado del gen y a pocos cientos de pares de bases del mismo. La caracterización de tales secuencias llevó a la conclusión de que se trataba de dos genes nuevos designándose como *tejas* y *dalao*. Estos genes fueron posteriormente confirmados y anotados como *CG7065* y *CG7055*, respectivamente, por el Proyecto Genoma de *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000). También se identificaron, en la misma región, otros dos genes previamente descritos en la bibliografía, *His3.3B* y *Ost48* (Akhmanova *et al.*, 1995).

Con respecto a la línea P1468, se conocía que la inserción del elemento P correspondiente se situaba en el inicio de un gen todavía no descrito, que fue denominado *ld14*. Dado que este gen y la secuencia obtenida por rescate plasmídico de la inserción P, no fueron identificados en el cósmido 125a12, no pudo determinarse la distancia física entre la inserción P1468 y el gen *fh* (la inserción debía encontrarse fuera de la región cubierta por el cósmido, cerca del gen *tejas* o más allá del gen *Ost48*). Antes de abordar este punto se consideró conveniente confirmar la localización cromosómica del gen *fh*.

1.1.2 Confirmación de la localización cromosómica del gen fh.

La localización citogenética del gen *fh* se realizó mediante hibridación *in situ* en cromosomas politénicos de la cepa *Oregon R* de *D. melanogaster*, empleando como sonda el ADNc del gen. Se observó una única señal de hibridación, localizada en el cromosoma X (figuras R1-A y B). La identificación del cromosoma X es bastante sencilla por la estructura característica de su extremo telomérico (figura R1-D). El estudio del patrón de bandas nos permitió confirmar la localización de *fh* en la banda 8C/D de este cromosoma (figura R1-C).

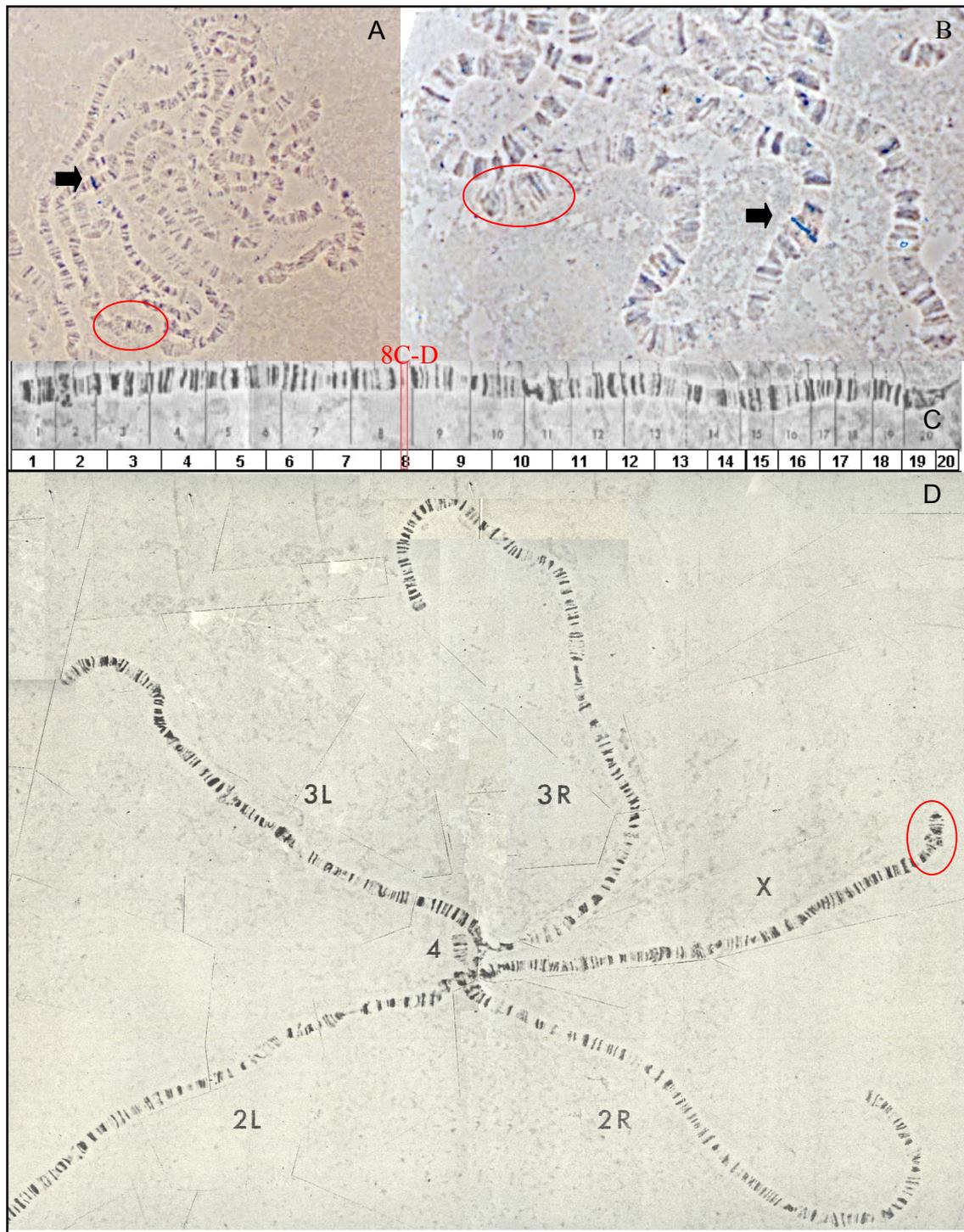


Figura R1. Localización del gen *fh* en cromosomas politénicos de *D. melanogaster*. (A-B) Fotografías con los objetivos de 20 y 40 aumentos, respectivamente, de cromosomas politénicos de la cepa *Oregon R* hibridados con la sonda del gen *fh*. Se observa una única señal en la banda 8C-D del cromosoma X indicada por la flecha. (C) Patrón de bandas del cromosoma X. El rectángulo rojo señala la localización citogenética del gen *fh*. (D) Imagen que muestra los 4 cromosomas de *D. melanogaster* totalmente extendidos desde el cromocentro. Con un círculo rojo se ha marcado el extremo telomérico del cromosoma X para facilitar la comparación con las imágenes A-B.

1.1.3 Cálculo de la distancia física.

Se partió de dos clones, tipo YAC, de ADN genómico de *D. melanogaster* y de una serie de cepas portadoras de deleciones que incluyen la región de estudio, además de la línea P1468 (Tabla M1 y sección 2.2 de materiales y métodos). En la figura R2-A se observa la localización del material empleado.

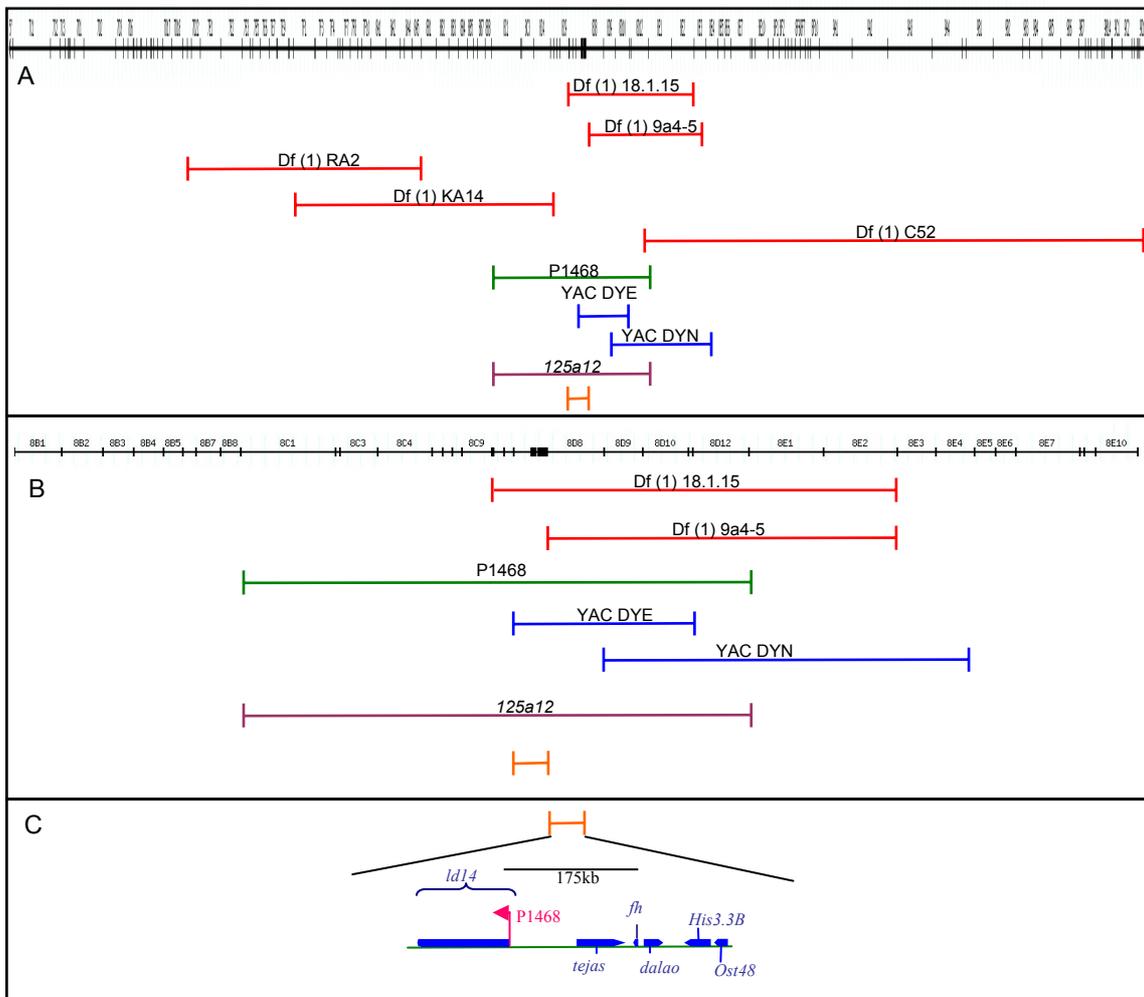


Figura R2. (A) Localización citogenética del material empleado para calcular la distancia entre el elemento P1468 y el gen *fh*. (B) Ampliación de A. En ambos esquemas, se representan en rojo las deleciones, en azul los YACs y en verde la inserción P1468. En morado se señala la región 8C-D donde se localiza el cósmido 125a12. En la parte inferior y en color naranja, la zona en la que se delimitó la localización del locus *fh* gracias a los diferentes *Southern blots*. (C) Posible mapa de la región. La figura presenta una de las dos posibilidades ya que la inserción P1468 y el gen *ld14* podrían estar tanto aguas arriba como aguas abajo del gen *fh*. Se indica la distancia máxima posible entre la inserción P1468 y el gen *fh* en el mapa de genes previamente conocido.

La distancia física entre *fh* y el P1468 se determinó a partir de los resultados obtenidos de los siguientes *Southern blots*:

A) *Southern blots* de las cepas portadoras de deleciones, de la línea P1468 y de la cepa salvaje *Oregon R*.

Se extrajo ADN genómico de cada una de las cepas. Es importante destacar que en el caso de las cepas portadoras de las deleciones, se partió únicamente de las hembras heterocigotas estructurales, ya que el cromosoma equilibrador empleado no es portador de letales y, por tanto, se obtienen machos y hembras que lo presentan en hemi y homocigosis, respectivamente. Estos individuos, no sólo no aportarían ninguna información al respecto sino que además, enmascararían el resultado de las hibridaciones al incrementar la cantidad de ADN del cromosoma equilibrador respecto a la cantidad de ADN del cromosoma delecionado.

Se digirieron 2,5µg de cada ADN genómico con 3 enzimas de restricción (*Bam*HI, *Xho*I y *Hind*III) de forma independiente y se realizó la transferencia de los diferentes fragmentos a filtros de nylon. Como sondas para las diferentes hibridaciones se utilizaron fragmentos, obtenidos mediante PCR, de los cuatro *loci* presentes en la región: *fh* (clon de ADNc), *tejas* (clon CB, que corresponde a la banda *Bam*HI de 4154pb procedente del cósmido 125a12), *dalao* (clon ADN genómico) y *ld14* (rescate plasmídico del elemento P1468).

Estos experimentos nos proporcionaron información a través de dos tipos de resultados:

(1) la detección de bandas de diferente tamaño cuando la deleción afectara parcialmente a la secuencia empleada como sonda; (2) la intensidad de las señales, ya que si el gen empleado como sonda estuviera incluido completamente en una de las deleciones, la banda en el *Southern blot* debería ser la mitad de intensa que la señal obtenida en la cepa salvaje (siempre detectaremos la copia presente en el cromosoma equilibrador).

La información que se obtuvo de las diferentes hibridaciones se resume en:

- **Sondas de los genes *fh*, *tejas* y *dalao*.** En todos los casos se obtuvo el mismo resultado, una banda de menor intensidad únicamente en la carrera correspondiente a la deleción 18.1.15. Dado que ésta solapa en casi toda su extensión con la deleción 9a4-5 (figura R2-A), la terna de genes debe estar en la región de no solapamiento, comprendida entre las bandas cromosómicas 8C10 y 8D7-8 (figura R2-B).

- **Sonda del gen *ld14*.** En el *Southern blot* correspondiente a la digestión *Bam*HI, se obtuvo, una banda de menor tamaño para la línea P1468 y una de mayor tamaño en el caso de la deleción 18.1.15. Estas diferencias eran de esperar ya que el elemento P1468 está insertado en el gen *ld14*, y la deleción 18.1.15 se originó por la movilización de dicho elemento. Por tanto, el gen *ld14* y la inserción P1468 se localizan en la región de solapamiento entre ambas líneas no presente en la deleción 9a4-5. Es decir, de nuevo, en la zona 8C10 y 8D7-8 (figura R2-B).

B) Southern blots de los clones YAC DYN y YAC DYE.

En este caso, se empleó la técnica de electroforesis en campo pulsante, que nos permite trabajar con fragmentos de ADN de gran tamaño y por lo tanto disponer en un sólo fragmento del ADN genómico clonado en los vectores YAC.

Los *Southern blots* fueron hibridados con las sondas de los genes *fh* y *ld14*. En ambos casos, sólo se detectó señal en las calles correspondientes al YAC DYE, lo cual sitúa a los dos genes entre las divisiones cromosómicas 8C13 y 8D8-9 (figura R2-B).

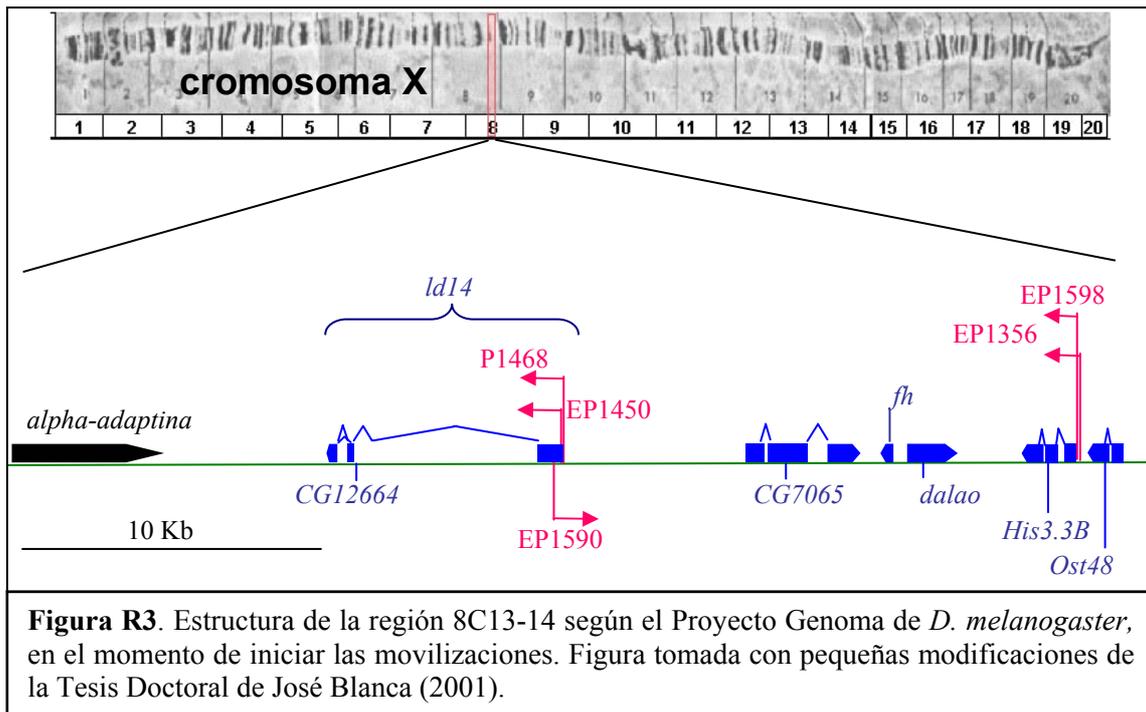
Al analizar conjuntamente los resultados de los dos tipos de *Southern blots* podemos concluir que:

- Las señales obtenidas, con las diferentes sondas en los *Southern blots*, nos permiten delimitar la localización del gen *fh* y la inserción P1468. De una localización inicial en 8C-D, se pasa a una mucho más concreta comprendida entre las bandas cromosómicas 8C13 y 8D7-8. En pares de bases, supone una reducción de la zona problema desde unos 500.000pb a aproximadamente 175.000pb. Esta será la distancia máxima entre el gen *fh* y la inserción P1468 (figura R2-C, banda inferior de color naranja).
- Debido al gran tamaño y a la disposición de las deleciones y clones de ADN genómico disponibles, no fue posible obtener una mayor resolución ni tampoco establecer si el elemento P estaba aguas arriba o aguas abajo del gen *fh*.

La finalización del Proyecto de Secuenciación de *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), nos permitió verificar, según la diferencia en pares de bases entre el punto de inserción del elemento P1468 y el extremo 3' del gen *fh* en el *Scaffold* AE003446, que la distancia real entre ambos era de unas 16kb, cifra en un orden de magnitud inferior a las distancias establecidas en nuestros experimentos. El punto de inserción del elemento P1468 se determinó a partir de la secuencia del ADN genómico, obtenida en nuestro laboratorio mediante rescate plasmídico. Dicha secuencia permitió descubrir, además, la existencia de otras dos líneas portadoras de elementos transponibles (EP1450 y EP1590) cuyos puntos de inserción estaban a unas decenas de pares de bases de distancia de la inserción P1468.

En la figura R3, se representa la organización del *locus* cromosómico *fh* según los datos proporcionados por la secuencia del genoma de *D. melanogaster*. El gen *fh* ha sido mapeado finalmente en la sección 8C14 del cromosoma X, dentro de la zona que conseguimos acotar.

El Proyecto de Disrupción de genes mediante elementos P, iniciado y desarrollado simultáneamente al de secuenciación, fue generando nuevas líneas que contenían un único elemento P insertado en su genoma; entre ellas es de especial interés la línea EP1598 que contiene un elemento EP a unas 8kb del gen *fh*, según la diferencia en pares de bases entre su punto de inserción y el extremo 5' del gen *fh* en el *Scaffold* AE003446.



1.2 Movilización de los elementos transponibles P1468 y EP1598.

Una metodología frecuentemente utilizada para conseguir mutantes estructurales por pérdida de función, consiste en movilizar con la ayuda de una fuente de transposasa, un elemento P defectivo artificial localizado en las inmediaciones de la región de interés. De este modo, se espera que alguna de las líneas afectadas por el salto del elemento P sea mutante para el gen de interés, *fh* en nuestro caso.

Escogimos las líneas P1468 y EP1598, homocigóticas para las inserciones tipo P1ArB y EP (sección 5.1 de materiales y métodos), insertadas a 16kb y 8kb respectivamente del gen *fh*, para aumentar las probabilidades de inserciones locales que pudieran afectar a dicho gen. Ninguna de las dos cepas portadoras de las inserciones presentaba anomalías morfológicas ni alteraciones evidentes en su viabilidad y/o fertilidad.

En ambos casos, el cruce parental se llevó a cabo entre hembras vírgenes de la cepa portadora de la inserción P y machos de la cepa que contiene la fuente de transposasa. Las cepas portadoras de las inserciones carecen de la capacidad para codificar la transposasa y son mutantes para el color de ojos (rosado, P1468 y blanco, EP1598), pero muestran el fenotipo salvaje debido a la presencia, en el elemento P, de una copia salvaje del gen *ry* o del gen *white*, respectivamente. Por su parte, la cepa w^+ P $\{\Delta 2-3\}$ tiene capacidad para codificar la transposasa en las líneas somática y germinal y presenta el marcador dominante *Stubble* (*Sb*, quetas cortas y puntiagudas).

La movilización se produce en los cigotos F₁. Para obtener la generación F₂ se seleccionaron hembras F₁ *Stubble*, portadoras por ello de la fuente de transposasa y por lo tanto susceptibles de haber sufrido sucesos de transposición, como lo demuestra el frecuente mosaicismo observado en el color de los ojos. Sin embargo, con el marcador *rosy*, a diferencia del marcador *white*, es más difícil la observación de ese mosaicismo. Dado que se quiso seleccionar eventos individuales de movilización, se depositó en cada vial una única hembra virgen F₁ con tres machos de la cepa correspondiente. De las hembras F₂ se escogieron las no *Stubble*, y por tanto sin fuente de transposasa, ya que una vez producida la movilización no interesa que el elemento P continúe saltando sin

resultados

control. Dichas hembras F₂ debían ser salvajes también para el color de ojos, lo que aseguraba que continuaban poseyendo el elemento P insertado en su genoma. Por último, se estableció cada línea mediante el cruce de hembras F₃ ry⁺ (P1468) y hembras F₂ w⁺ (EP1598) con machos de la cepa equilibradora, para evitar la pérdida de posibles inserciones letales.

A lo largo de ambas movilizaciones, se eligieron siempre hembras portadoras de la inserción P para disponer de dos cromosomas X y así aumentar la probabilidad de nuevas inserciones locales en dicho cromosoma ya sean inter o intracromosómicas

1.2.1 Movilización del elemento P1468 y análisis de las líneas obtenidas.

Los cruces diseñados para llevar a cabo la movilización se resumen en la Tabla R1.

Tabla R1. Esquema de los cruces con la línea P1468.			
P	Pry ⁺ / Pry ⁺ ; ry ⁻ / ry ⁻ (en masa)	X	lz ^k / Y ; TM6... / TMS Sb ry ² Δ2-3 99B
F₁	Selección hembras Sb (tiene lugar la movilización)		
	Pry ⁺ / lz ^k ; ry ⁻ / TMS Sb ry ² Δ2-3 99B	X	lz ^k / Y ; ry ⁻ / ry ⁻
F₂	Selección hembras Sb⁺ (se elimina la fuente de transposasa), lz y ry⁺		
	lz ^k / lz ^k Pry ⁺ ; ry ⁻ / ry ⁻	X	FM6 / Y ; ry ⁻ / ry ⁻
F₃	Selección de hembras ry⁺ (posibles nuevas inserciones). Ver letalidad o fenotipo		
	lz ^k Pry ⁺ / FM6 ; ry ⁻ / ry ⁻	X	FM6 / Y ; ry ⁻ / ry ⁻
F₄	Establecimiento de las líneas		
	lz ^k Pry ⁺ / FM6 ; ry ⁻ / ry ⁻	FM6 / Y ; ry ⁻ / ry ⁻	lz ^k Pry ⁺ / Y ; ry ⁻ / ry ⁻
			FM6/FM6; ry ⁻ / ry ⁻

Se realizaron un total de 171 cruces entre hembras de la línea P1468 y machos de la cepa con la fuente de transposasa en fondo genético lz^k. En esta movilización, se incorporó un segundo marcador, un alelo mutante del gen *lozenge* (lz), que afecta al tamaño y a la rugosidad del ojo. Debido a que es un gen bien descrito, y está relativamente cerca del gen *fh*, nos servirá, mediante la selección de cromosomas recombinantes lz^k Pry⁺, para distinguir nuevas inserciones en el cromosoma X de las producidas en otro cromosoma. Este segundo marcador implicó añadir al esquema de movilización una generación adicional (en comparación con la movilización del elemento EP1598) antes del cruce con la cepa que contiene el cromosoma equilibrador FM6.

Se observaron alrededor de 1000 hembras F_2 de quetas normales (no *Sb*), de las cuales sólo 43 eran $ry^+ lz^k$ (lz^k / lz^k Pry^+ ; ry^- / ry^-). Se cruzaron de modo individual, cada una de ellas, con 3 machos de la cepa equilibradora (FM6 / Y; ry^- / ry^-). Sólo se obtuvo descendencia en 17 cruces y en ninguno de ellos, la nueva inserción resultó ser letal o generó alteración fenotípica aparente. Por ello, se eliminó el cromosoma equilibrador, ya que no era necesario.

Al final se establecieron las 17 líneas homocigotas para la inserción correspondiente (1, 4 a 9, 13, 14, 17, 19, 21, 27 a 31). Su análisis se llevó a cabo mediante PCR, *Southern blot*, rescate plasmídico y secuenciación, en este orden:

PCR: Tal y como puede observarse en la figura R4-A, mediante dos reacciones de PCR, PCR1 y PCR2, se puede determinar en qué líneas se ha movilizado el elemento P1ArB. La PCR1 emplea un cebador genómico (ResT3) y uno del extremo del elemento P (T7) por lo que, si el elemento P hubiese saltado, no se produciría amplificación. La PCR2 emplea dos cebadores de la zona genómica original adyacente (ResT7-ResT3) para detectar si la movilización ha sido precisa o ha arrastrado parte de este ADN. Es decir, si no existiese movilización, se obtendría una banda de 1500pb (PCR1) y otra de 1200pb (PCR2). Si existiese movilización, y fuera precisa, no se obtendría ninguna banda en la PCR1 mientras que la PCR2 seguiría generando la banda de 1200pb. Sólo en 7 (5, 6, 8, 13, 19, 21 y 31) de las 17 líneas establecidas, se obtuvo un patrón de bandas compatible con sucesos de movilización precisa (figura R4-B).

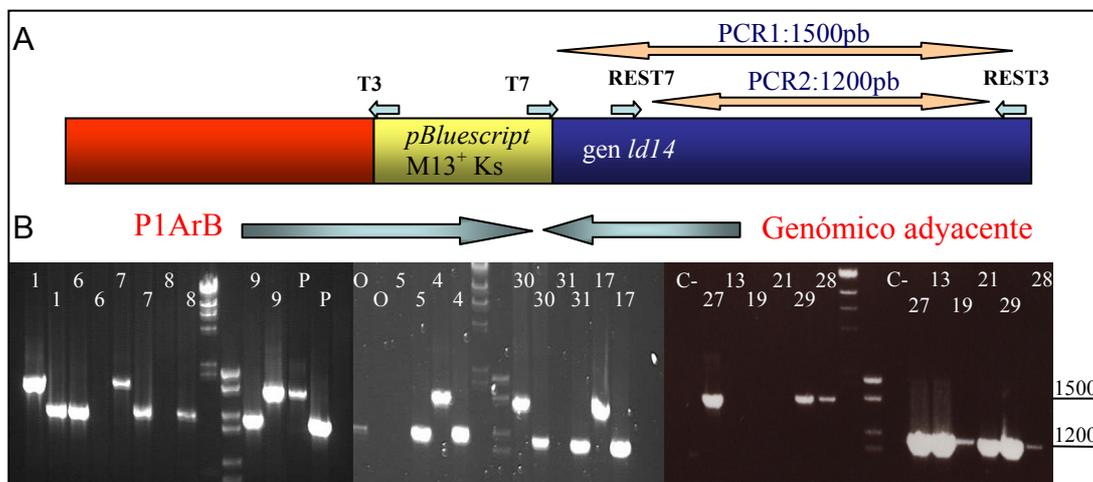


Figura R4. Análisis mediante PCR de 16 de las 17 líneas establecidas tras la movilización del elemento P1468. (A) Esquema de las 2 reacciones de PCR realizadas, PCR1 (cebadores T7 y ResT3) y PCR 2 (cebadores ResT7 y ResT3). (B) Resultado de las PCRs. Se observa ausencia de la banda de 1500pb (PCR1) en el caso de las líneas 5, 6, 8, 13, 19, 21 y 31 para la PCR1, indicando posibles sucesos de movilización. Se tomaron como controles la cepa P1468 (P) portadora del elemento P1ArB y la cepa Oregon R (O), vacía de dicho elemento.

Southern blot: Se realizaron digestiones sencillas a partir de 2.5µgr de ADN genómico de cada una de las 17 líneas, con los enzimas de restricción *HindIII*, *XhoI* y *SalI*, los tres con diana en el sitio PL3 del elemento P1ArB (figura R5-A). Para detectar la presencia del elemento P, la hibridación se realizó empleando como sonda el plásmido *pBluescript*. Si no existiera movilización se obtendrían bandas del mismo tamaño que para la línea P1468: 6000pb para la digestión con *HindIII*, 4500pb en el caso del enzima *XhoI* y finalmente 4000pb para la digestión con *SalI*. La cepa *Oregon R* se empleó como control negativo de la hibridación.

En conjunto, en los *Southern blots* se vieron diferencias en 8 líneas (1, 6, 8, 13, 19, 21, 28 y 30), pero sólo en 5 de ellas (6, 8, 13, 19, 21) se había obtenido un resultado positivo con el análisis anterior.

En la figura R5-B se presentan fragmentos de diferentes *Southern blots*, mostrando el resultado de las 17 líneas con al menos uno de los enzimas. Se han señalado en color rojo las calles donde se detectan bandas de tamaño diferente al de las observadas para la línea P1468. La línea 1 merece una mención especial porque el resultado de la PCR indicaba ausencia de movilización. Sin embargo, la identificación de dos bandas en los *Southern blots* sugiere que ha ocurrido una duplicación y la movilización de una de las copias. La copia que mantiene la posición original es la que se amplificó en el análisis de PCR.

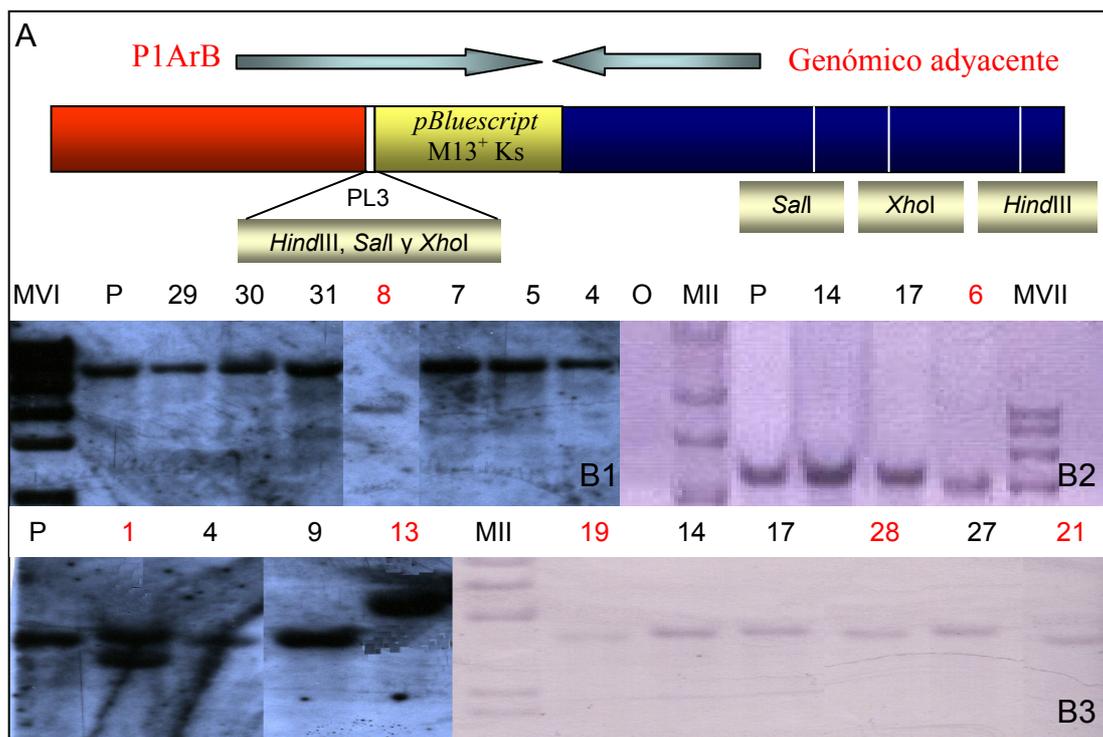


Figura R5. Análisis mediante *Southern blot* de las 17 líneas establecidas tras la movilización del elemento P1468. (A) Esquema de la inserción, indicando las dianas de los enzimas empleados. (B) Resultado de los *Southern blots*. Se detectó la presencia del elemento P empleando como sonda un fragmento del vector *pBluescript*. Se han marcado en color rojo las calles donde hay diferencias respecto a la línea P1468, en concreto las líneas 8 (B1, *HindIII*), 6 (B2, *XhoI*), 1, 13, 19, 21 y 28 (B3, *SalI*). También se encontró diferencia en la línea 30 con el enzima *XhoI*. En el caso de la línea 1 se detectaron dos bandas diferentes, lo cual implica un suceso de duplicación. Se usaron como controles las líneas P1468 (P) y *Oregon R* (O).

Rescate Plasmídico: Esta tercera técnica sólo se aplicó a las 5 líneas que fueron seleccionadas tanto por PCR como por *Southern blot* (6, 8, 13, 19, 21) y a la línea 1. Se realizaron digestiones sencillas, de 500ng de ADN genómico de cada una de las 6 líneas, con los enzimas de restricción *HindIII*, *XhoI* y *SalI*, los tres con diana en el sitio PL3 del elemento P1ArB. Se ligaron los fragmentos en condiciones que favorecieran la recircularización (figura R6-A). Las ligaciones se utilizaron para transformar células bacterianas competentes. Al incubar las bacterias en presencia de penicilina, sólo consiguieron crecer aquellas que habían incorporado un fragmento de ADN con el vector *pBluescript*. Se extrajo el ADN plasmídico de cada colonia y se digirió con el enzima correspondiente. Si no se hubiera producido movilización veríamos bandas del mismo tamaño que para la línea control P1468: 6000pb para la digestión con *HindIII*, 4500pb en el caso del enzima *XhoI* y 4000pb para la digestión con *SalI*. Como era de esperar según los resultados del *Southern blot*, se obtuvieron bandas diferentes en todos los casos con respecto a la línea original P1468, de mayor tamaño para la línea 13 y de menor para el resto. En la figura R6-B se muestra el gel de agarosa con los rescates plasmídicos correspondientes a la digestión con *SalI* de las 6 líneas seleccionadas. Las calles 1a y 1b corresponden a las dos copias del elemento P1ArB presentes en la línea 1. La colonia 1a equivale a la inserción original mientras que la 1b equivale a la copia movilizada.

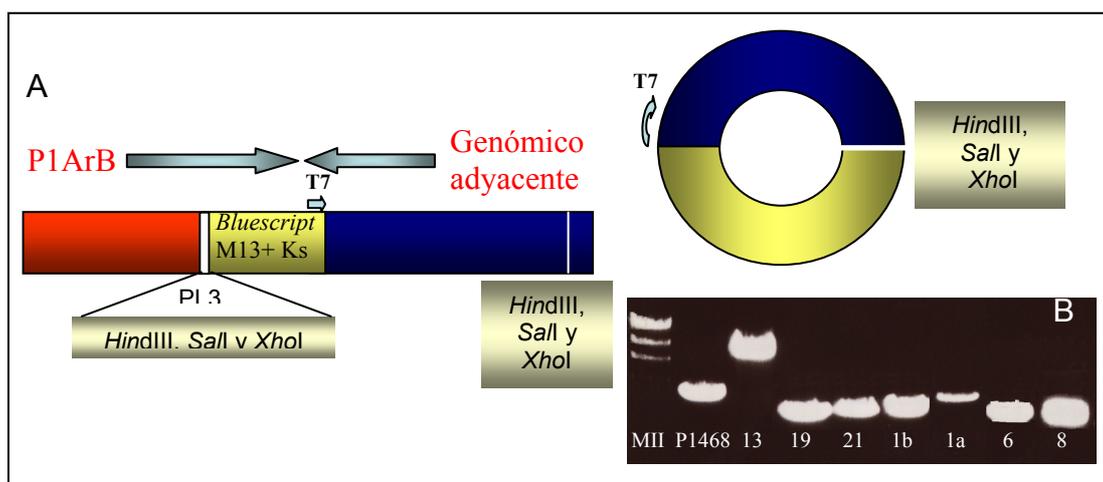


Figura R6. Análisis mediante rescate plasmídico de las 6 líneas seleccionadas con los análisis de PCR y de *Southern blot*. (A) Esquema del rescate plasmídico. Se emplearon los mismos enzimas que en los análisis de *Southern blot*. Se representa también la situación del cebador empleado (cebador T7 del vector *pBluescript*) para determinar la orientación y el punto de inserción del elemento P1ArB en cada una de las 6 líneas. (B) Gel con los rescates plasmídicos obtenidos tras la digestión con *SalI*. En todos los casos se obtiene una banda de tamaño ligeramente inferior a los de la línea P1468, excepto para la línea 13, en la que la banda es bastante mayor.

Secuenciación: Como nivel último de análisis, se obtuvo la secuencia de los primeros 600pb de los rescates plasmídicos de las líneas 1, 6, 8, 13, 19 y 21. En la Tabla R2 se describe, para cada una de estas líneas, el punto de inserción del elemento transponible, la distancia entre la inserción original y la resultante tras la movilización tomando como punto 0 la inserción original, la orientación del mismo en el genoma y el gen al que afecta. Cada secuencia se comparó con los *Scaffolds* en los que se divide el genoma de *D. melanogaster*, mediante el programa BLASTN accesible desde la página web www.flybase.org. Las secuencias analizadas se obtuvieron empleando el cebador T7 (figura R6-A), correspondiente al extremo 3' del elemento P1ArB. Este cebador está dirigido hacia el exterior del elemento, por lo que fue útil para establecer la orientación de la inserción ya que permite tomar como punto real de inserción, la primera base de la secuencia del *Scaffold* correspondiente que alineó con nuestra secuencia del rescate.

En total, se identificaron 4 saltos en los que solamente se había producido cambio de orientación (líneas 6, 8, 19 y 21) y 2 saltos locales de unos 3000pb, uno de ellos cambiando la orientación (línea 1b) y el otro manteniendo la orientación original (línea 13).

El cambio de orientación del elemento P1ArB en las líneas 6, 8, 19 y 21 explicaría tanto la ausencia del producto PCR1 en dichas líneas, como la obtención de bandas de tamaño ligeramente menor a la de la línea P1468, a pesar de que en todos los casos dicho elemento mantiene la misma posición.

Tabla R2. Resultado de la movilización del elemento P1468.

Nombre Inserción	Punto de Inserción <i>Scaffold</i> AE003446.3 y distancia respecto al original		Orientación Inserción	Gen afectado
P1468 Original	85993	0	←	5'UTR del gen <i>ld14</i>
P1468-1a	85993	0	←	5'UTR del gen <i>ld14</i>
P1468-1b	83083	-2910	→	Intrón 1 del gen <i>ld14</i>
P1468-6	85993	0	→	5'UTR del gen <i>ld14</i>
P1468-8	85993	0	→	5'UTR del gen <i>ld14</i>
P1468-13	83083	-2910	←	Intrón 1 del gen <i>ld14</i>
P1468-19	85993	0	→	5'UTR del gen <i>ld14</i>
P1468-21	85993	0	→	5'UTR del gen <i>ld14</i>

1.2.2 Movilización del elemento EP1598 y análisis de las líneas obtenidas.

Las líneas EP1356 y EP1598 se adquirieron de la colección pública del *Bloomington Stock Center*, cada una con una inserción diferente de un elemento EP, muy próximas entre sí. Sin embargo, la información que se puede obtener de la base de datos, respecto a la localización citogenética de cada inserción, es contradictoria.

Con la intención de conocer la localización correcta de cada una de ellas obtuvimos, mediante PCR inversa y rescate plasmídico, las secuencias adyacentes a ambas inserciones. Los resultados (figura R7) coincidieron con los datos de PCR inversa de la *flybase*, aunque con pequeñas diferencias, localizando ambas inserciones en el inicio de la secuencia del mensajero del gen *His3.3B*.

PCR INVERSA EXTREMO 3' CEBADORES ry1-ry2.
 (ry2)CTTGCCGACGGGACCCCTTATGTTATTCTCATCATGACGAAACATTGTGAAAATTCTCTCGTCCGAATTTGTTCTCGTCTCGTGTGAA
 AGTGACAAATTGTGAAGAATAACTTTATTCCGTGTTTAAACGGTGAGTTTTTTTTTATTGCTAAATACTTATAATACTAAGTGTGGTTCT
 TAAACGCACGCTGTGTGGCCGCTGAATATGTCGGTGTGTGCACTGTTTTCCAAATTTTTTTTTTCGTTGTGAATCGCCTGAGTTTATG
 TTTTGCCGTTTTGGGGCTCCGCCGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTTCTACGGAGCGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGT
 CGAGATCTCTGACCAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATAAAAATAAAACTTTAAAAATAATTCGTCTAATTAATATTAGATTAAATCA
AACCCACGGACATGCTAAGG (ry1)

RESCATE PLASMÍDICO S4C I SECUENCIADO CON ry2.
 (ry2)CTTGCCGACGGGACCCCTTATGTTATTCTCATCATGACGAAATCATTGTGAAAATTCTCTCGTCCGAATTTGTTCTCGTCTCGTGTG
 AAAGTGACAAATTGTGAAGAATAACTTTATTCCGTGTTTAAACGGTGAGTTTTTTTTTATTGCTAAATACTTATAATACTAAGTGTGGTT
 CTTAAAACGCACGCTGTGTGGCCGCTGAATATGTCGGTGTGTGCACTGTTTTCCAAATTTTTTTTTTCGTTGTGAATCGCCTGAGTTTA
 TGTTTTGCCGTTTTGGGGCTCCGCCGCGTCCAGCGGAGCCCTATTTTCACCGCACACACAGGCGCATTCTCGTGGTGGATACATA
 CACAAATACACGAAGATGTGAGAGGTCTCGTATTCCGCACGACTGTGGTTGCATTGTTGTTTAAAGTTGTAATGGTGGAGGTGCGCTGCTTTTT
 TTTTTCCAAAATGGCCGCAAGCAGGAGAATAGCAAGAAAATAAAAAAGTTGCAGTCGTTGATGAAATTGGCAAAAAGAAAATAAAAAAT
 AAATAAAAAAGCAATTGCCAATGTGCGAAAACCTGGCGCAAAAAATATGAAGTAAACNTATTTAAGCCGGGTGGGCAAAAACAATATAAAAA
 GNTAANTTAATTAATTTCCCTAAANTTGGCAACCCCCNTTGAAGGTTTGTGTTTAAACCAAAAACAACCCCAAAATGGGGTTNAAC
 AAAAAATGCCAAAAGGTTNCNATNGGGNTGGCCCCCTGTCCAATGCCNCAAAATGGTTGTTGGCCAAAACCCCCNCCCTTTCCCGNCCAA
 ACCTTTTNCCCGGTAAGGGTTAAATGGCCAAAAAANGGCCNTTTTTAAAAATTTCCCTTTTTNCCCTTTGGGGAAAAANCCCCCCTT
 TTGGGGG.

	Punto inserción <i>Scaffold AE003446.3</i>	Punto de inserción en el gen <i>His3.3B</i>
EP1356 sec. base de datos	107656	+1
EP1356 secuencias propias	107656	+1
EP1598 sec. base de datos	107646 / 107631	+10 / +25
EP1598 secuencias propias	107646	+10

Figura R7. Secuencias obtenidas por PCR inversa y rescate plasmídico para el elemento EP1598 (no se muestra la del elemento EP1356 por ser idéntica a la de la base de datos). Aparece subrayada la parte de la secuencia que corresponde al pie del extremo 3' del elemento EP, en negrita la parte de la secuencia que coincide en ambos experimentos y en rojo las secuencias de los cebadores ry1 y ry2. La tabla muestra el punto de inserción de ambos elementos según se deduce de las secuencias disponibles en la *flybase* y de nuestras secuencias.

Dado que ambos elementos se diferencian poco en su lugar de inserción escogimos sólo uno de ellos, en concreto la línea EP1598, para la realización de los experimentos de movilización.

Los cruces diseñados a tal efecto se indican en la Tabla R3.

Tabla R3. Esquema de los cruces con la línea EP1598.			
P	$w^- Pw^+ / w^- Pw^+$ (en masa)	X	w^- / Y ; <i>Dr(1) / TMS Sb Δ2-3 99B</i>
F₁	Selección hembras <i>Sb</i> (tiene lugar la movilización)		
	Pw^+ / w^- ; + / <i>TMS Sb Δ2-3 99B</i>	X	<i>FM7c / Y</i>
F₂	Selección hembras <i>Sb</i>⁺ (se elimina la fuente de transposasa) y w^+ (nuevas inserciones). Ver letalidad o fenotipo		
	$Pw^+ / FM7c$	X	<i>FM7c / Y</i>
F₃	Establecimiento de las líneas		
	Pw^+ / Y	$Pw^+ / FM7c$	$FM7c / FM7c$ <i>FM7c / Y</i>

Para poder analizar un número de líneas cercano a 1000 se realizaron cuatro series de movilización estableciendo, a partir de la generación F3 de cada serie, grupos de 200-300 líneas con posibles nuevas inserciones. De este modo, mientras se realizaba el análisis de las líneas resultantes de una serie, se preparaban y se realizaban los cruces de la serie siguiente. Cada línea fue nombrada en función de la serie de procedencia (S1.0 a S1.155; S2.0 a S2.275; S3.0 a S3.300; S4.0 a S4.320)

Las líneas se separaron en 2 grupos, según la movilización hubiera provocado o no letalidad cuando la inserción se encontraba en homo o hemicigosis. En el primer grupo se incluyeron las líneas que presentaban los dos tipos de machos posibles Pw^+ / Y y $FM7c / Y$, y en el segundo las líneas que presentaban machos sólo con el genotipo $FM7c / Y$.

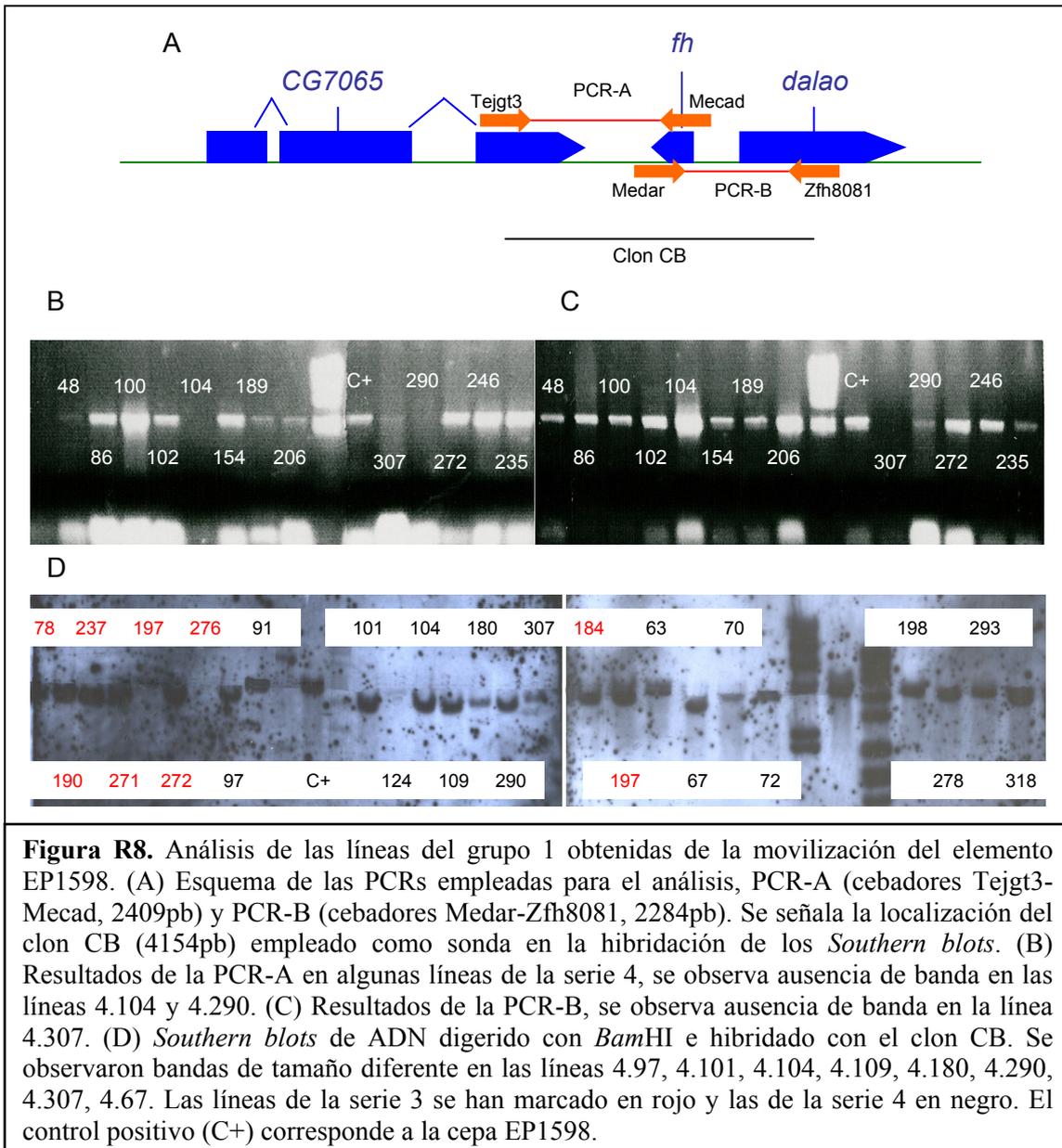
El primer grupo englobaba un total de unas 1000 líneas. En ellas se eliminaron los individuos portadores del cromosoma equilibrador, ya que la inserción no era letal en homo o hemicigosis. En ninguna de ellas se observaron anomalías morfológicas, que nos llevaran a pensar en la existencia de una alteración fenotípica debida a la movilización del elemento EP.

De cada línea se realizó una extracción de ADN genómico de pocos individuos y se realizaron dos PCRs, PCR-A y PCR-B, que abarcaban en conjunto una región genómica de unas 5kb, con *fh* en el centro. Cada PCR comprende parcialmente al gen *CG7065* (PCR-A) o al gen *dalao* (PCR-B) y al gen *fh* entero (figura R8-1A).

Si el elemento EP hubiera saltado, insertándose en la región definida por alguna de las dos PCRs, se generaría un fragmento de mayor tamaño. Se detectaron 68 casos en los que una de las dos PCRs resultó negativa (figura R8-B y C). En este sentido podría ocurrir que el fragmento fuera demasiado grande para que la polimerasa, bajo las mismas condiciones de reacción, pudiera amplificarlo. Alternativamente, este resultado también pudo deberse a fallos en la reacción de PCR. Si el elemento P no se hubiese movilizado o hubiera saltado a otras regiones diferentes obtendríamos bandas de 2409pb y 2284pb para las PCRA y la PCRB, respectivamente.

Las líneas que mostraron productos de PCRA y PCRB de 2409pb y 2284pb fueron descartadas, mientras que el resto (68 líneas) fueron estudiadas mediante *Southern blot* de ADN genómico digerido con *Bam*HI. Los diferentes filtros fueron hibridados utilizando como sonda el clon CB, consistente en un fragmento *Bam*HI de 4154pb que porta al gen *fh* y parte de los genes *CG7065* y *dalao* (figura R8-A). Si se produce la inserción del elemento EP1598 en la región *fh* deberá aumentar el tamaño de dicho fragmento. En 52 líneas se mantuvo el tamaño de 4kb pero, al contrario de lo esperado, en 16 líneas se obtuvo un tamaño de banda ligeramente inferior (figura R8-D).

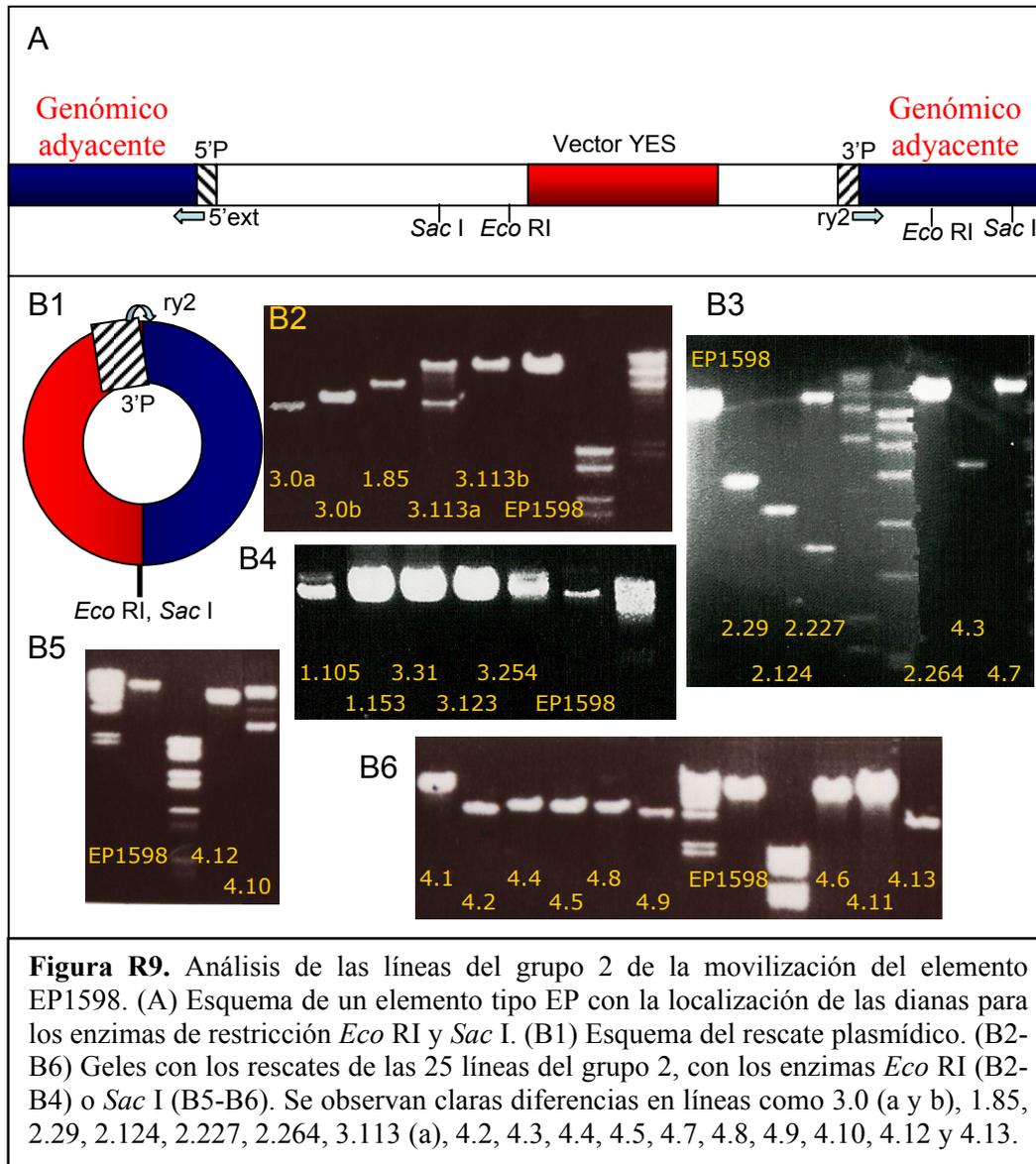
Estas líneas se analizaron mediante rescate plasmídico y secuenciación. No se pudo asignar ninguna de ellas a un nuevo suceso de movilización ya que, a pesar de haber observado bandas diferentes a la de la cepa EP1598, las secuencias indicaban que el elemento EP no había saltado.



El segundo grupo estaba formado por 25 líneas en las que no se habían detectado machos con el genotipo Pw^+/Y , lo que podría indicar letalidad debida a la movilización. El análisis se llevó a cabo mediante PCR inversa y rescate plasmídico, y se secuenciaron todos los fragmentos obtenidos. Se llevó a cabo la PCR inversa desde el extremo 3' del elemento empleando el enzima *Msp* I. En ausencia de movilización se esperaba un fragmento de unos 500pb. En los pocos casos en los que no se obtuvo una banda definida con esta PCR inversa, se llevó a cabo la PCR del extremo 5'. Por otra parte, para la realización del rescate plasmídico se emplearon indistintamente los dos enzimas adecuados (*Eco*RI y *Sac*I) para el extremo 3'. En este caso, en la línea original se obtienen unos tamaños de 9kb y 12kb, respectivamente. En la figura R9-A, se presenta un esquema del elemento EP con los puntos de corte para los dos enzimas. Se muestra también el esquema de un rescate plasmídico (figura R9-B1). El análisis mediante rescate plasmídico reveló, en 13 líneas, bandas de diferente tamaño respecto a la línea

resultados

EP1598 original. En el resto de los casos los tamaños eran muy semejantes al control, indicando una movilización de pocos pares de bases (figuras R9, B2 a B6). Estos resultados coincidieron con los obtenidos mediante PCR inversa. En el caso de las líneas 3.0 y 3.113, con el rescate plasmídico se obtuvieron 2 fragmentos de diferente tamaño, sugiriendo la presencia de 2 inserciones EP (a y b) en su genoma, fruto de una duplicación en algún momento del proceso de transposición.



Las secuencias analizadas se obtuvieron empleando los cebadores ry2 y 5'ext de los extremos 3' y 5' del elemento EP respectivamente (figura R9-A). Al igual que en la movilización de la línea P1468, estos dos cebadores (ry2 y 5'ext) están dirigidos hacia el exterior del elemento y por tanto son útiles para determinar el punto real de inserción del elemento EP y su orientación en el genoma. Cada secuencia se comparó con los *Scaffolds* en los que se divide el genoma de *D. melanogaster* mediante el programa BLASTN.

En la Tabla R4 se recogen, para cada una de estas 25 líneas, el punto de inserción del elemento transponible, la distancia entre las nuevas inserciones y la inserción original tomando ésta como punto 0, la orientación del mismo en el genoma y el gen al que afecta.

Tabla R4. Inserciones generadas por la movilización del elemento EP1598.

Nombre Inserción	Punto de Inserción Scaffold AE003446.3 y distancia respecto al original	Orientación Inserción	Gen afectado
EP1598 Original	107646 0	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
1.85	107644 -2	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
1.105	107636 -10	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
1.153	107632 -14	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
2.29	3B6 2.648.362 (Cr. X)	→	<i>CG2759(w)</i> . Exón 3.
2.227	3B6 2.646.635 (Cr. X)	→	<i>CG2759(w)</i> . 5'UTR
2.264	107635 -11	→	<i>His3.3B</i> . Exón 1
2.124	107625 -21	→	<i>His3.3B</i> . Exón 1
3.0a	108398 +773	→	<i>Ost48</i> Exón 2
3.0b	235333 +127687	→	5' <i>Lozenge</i>
3.113-a	235354 +127708	→	5' <i>Lozenge</i>
3.113-b	107646 0	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
3.31	107637 -9	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
3.123	107639 -7	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
3.254	107638 -8	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.1	107638 -8	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.2	107681 +35	→	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.3	4B3 4.049.405 (Cr.X)	→	<i>Fas2</i> . Intrón 1
4.4	107670 +24	←	5' <i>His3.3B</i>
4.5	107640 -6	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.6	107640 -6	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.7	12E4 14.047.850 (Cr.X)	→	<i>l(1)G0007</i> . Intrón 1
4.8	107641 -5	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.9	107640 -6	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.10	107646 0	→	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.11	107646 0	→	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.12	107640 -6	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1
4.13	107640 -6	←	<i>His3.3B</i> . Exón 1

Del análisis de las secuencias concluimos que, de los 26 sucesos independientes de movilización obtenidos, 6 (2.29, 2.227, 3.113a, 3.0b, 4.3 y 4.7) correspondían a saltos a zonas distantes en el genoma y en todos ellos el elemento EP cambió de orientación. Mientras que los otros 20 fueron saltos locales entre 2pb (1.85) y 700pb (3.0a) con cambio de orientación en el 30% de los casos. Es de destacar que en dos líneas (3.0 y 3.113) se produjo una duplicación y la movilización de ambas copias (3.0) o de sólo una (3.113).

Aunque por rescate plasmídico se obtienen en algunos casos (por ejemplo en las líneas 1.85, 4.1, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.13) bandas de tamaños diferentes, las secuencias demuestran que no existen diferencias notables respecto al punto de inserción.

La mayoría de las líneas presentaron una movilización mínima, siendo difícil explicar la aparición de letalidad, especialmente para 4.10 y 4.11 donde sólo se ha dado un cambio de orientación del P original. Es probable que hayan ocurrido otros fenómenos, como escisiones imprecisas, que no se han analizado dado que no se secuenció todo el rescate plasmídico.

1.2.3 Análisis conjunto de los resultados de ambas movilizaciones.

En la figura R10 se presenta la localización de las nuevas inserciones generadas por los experimentos de movilización de los elementos P1468 y EP1598.

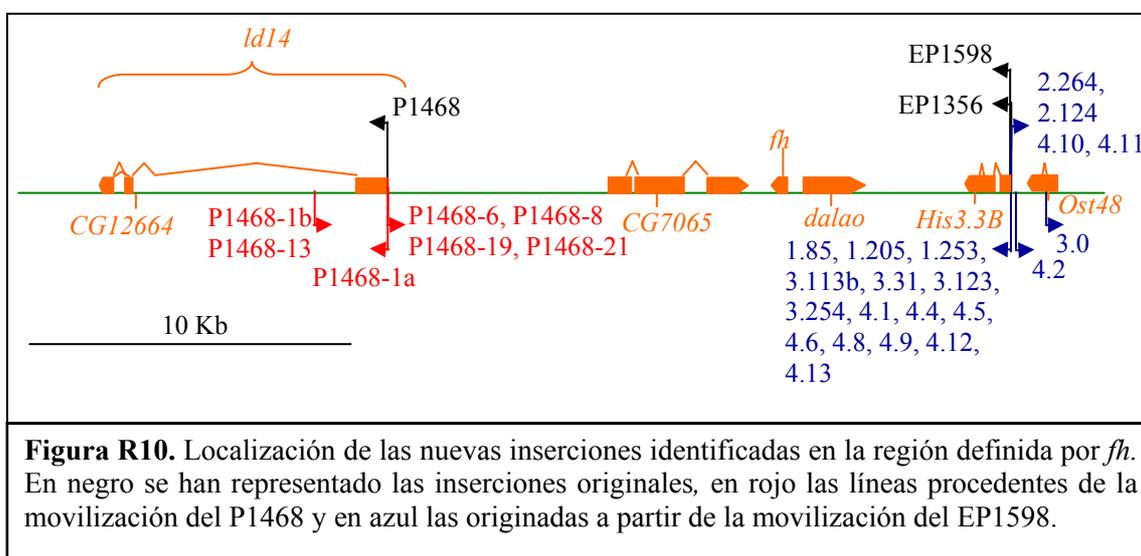


Figura R10. Localización de las nuevas inserciones identificadas en la región definida por *fh*. En negro se han representado las inserciones originales, en rojo las líneas procedentes de la movilización del P1468 y en azul las originadas a partir de la movilización del EP1598.

En total, de 43 líneas analizadas para P1468 y 1025 para la línea EP1598, hemos detectado respectivamente 6 (13,95%) y 26 (2,54%) nuevas inserciones, lo que, en conjunto, supone una tasa de movilización de aproximadamente el 3%.

El suceso que ha ocurrido un mayor número de veces ha sido el salto local (28 de 32). Tower *et al.* (1993) definen como salto local toda movilización que tenga lugar en un radio de 10kb desde el punto de origen.

También se observan bastantes cambios de orientación, un 83% para P1468 y un 46% para EP1598. Además, en 3 casos, se detectaron duplicaciones del elemento transponible y en uno de ellos ambas copias se habían movilizadas.

Con el objetivo de estudiar las regiones donde se dieron las nuevas inserciones, se tomaron como secuencias de inserción, secuencias genómicas de 501pb con 250pb a cada lado del punto de inserción (Liao *et al.*, 2000). El octámero GGCCAGAC descrito por O'Hare y Rubin (1983), como la secuencia consenso de mayor frecuencia de inserción de un elemento P, no se encontró en ninguna de las secuencias de inserción identificadas en este trabajo ni en la zona genómica de 40kb que define el *locus* cromosómico *fh*.

El análisis del contenido en GC de las secuencias de inserción reveló unos porcentajes que oscilan entre 35% y 60%, con un valor medio de 39,6%, valor bastante cercano a los 42,5% y 43,3% obtenidos por Liao *et al.* (2000) para 2 grupos de 467 inserciones EP cada uno, tomadas al azar de la colección del BDGP. En el mismo trabajo se indican una serie de tripletes (CAG, CTG, GAC, GCC, GGC y GTC) dinucleótidos (GC, GG, CC y GT) que suelen presentarse con mayor frecuencia alrededor de los puntos de inserción. En la Tabla R5 se muestra, como ejemplo, la presencia de estas secuencias (en color verde) en un radio de 25pb alrededor de los puntos de inserción (en rojo) de algunas de las nuevas transposiciones y de los elementos originales. También hemos encontrado estos grupos de nucleótidos en el resto de nuestras secuencias. Es decir, las zonas de inserción comparten algunas de las características observadas en los sitios de inserción de los elementos EP del Proyecto de Disrupción de Genes.

Tabla R5. Presencia de di y trinucleótidos característicos en las secuencias de inserción de 14 de las nuevas inserciones y de los elementos originales P1468 y EP1598.

Nombre inserción	Secuencia de inserción
P1468-1b, P1468-13	GT TTT GTGT ATTTATTT GC TCTTA GAA GCTTG CCAG CCTCGAAATT GCGG
P1468, P1468-1a, -6, -8, -19 y -21	CGAAAAACGA GCGTCGCCGTC GA GGC TTAAT GCTGCTCTG AACGAAA CCAA
EP1598, 3.113b, 4.10 y 4.11	GAGAGAAATTT CACAATGATTT CGT TTCGT TGAGATCTAGAGAT GGTAGC
2.227	GT TTT GTATATAAAAAATATAT CCCGGT GTTTTAT GTAGC GATAAACGAGTT
3.0b	T GTC ACAAT GC ACATACTA GGCC AT GC ATTTACAGAAGA GC AAGAGAGAGA
4.2	ATCTAGAGATG GTAGCC TAGTAGGC GAA GGCC TACTTCGATTGTATTTCGAT
4.3	TTT CGCC TTCTCTCTCTCTAT GTC TACTGAA GT TGC ACC TAT GCTGAGT

En resumen, hemos obtenido una movilización poco aleatoria, ya que la gran mayoría de las nuevas inserciones corresponden a saltos locales de pocos pares de bases, sugiriendo la existencia de dos sitios calientes en esta región del genoma, concretamente en el inicio de los genes *ld14* e *His3.3B*.

El hecho de que *fh* sea un gen pequeño inmerso en una región rica en genes (7 genes en 15kb cuando la media es 1 por cada 13kb), y que, según nuestros resultados, esté flanqueado por zonas calientes de inserción, nos llevó a descartar la mutagénesis insercional con elementos P como herramienta útil para alterar el gen *fh*.

2. Obtención en *D. melanogaster* de mutantes funcionales transitorios para el gen *fh* mediante el uso del sistema UAS-GAL4.

La segunda línea de trabajo que hemos desarrollado para la obtención de mutantes del gen *fh* se basa en el uso del sistema UAS-GAL4. Este sistema ha sido, y es, ampliamente empleado en *D. melanogaster* y se caracteriza por presentar una gran versatilidad (Brand *et al.*, 1994). Nuestro objetivo ha sido la obtención de fenotipos alterados por la sobreexpresión y la interferencia de ARN del gen *fh*.

El sistema UAS-GAL4 es un sistema inducible y binario en el que, por un lado, el gen GAL4 se sitúa cerca de un promotor o activador que dirigirá su expresión y, por otro lado, las secuencias UAS se fusionan al gen de interés. El método separa en dos líneas transgénicas distintas la construcción a estudiar (línea *responder*, con la construcción UAS-gen) de su activador transcripcional (línea *driver*, con la construcción GAL4), de modo que, sólo cuando cruzamos ambas líneas, el gen de interés se activa o se silencia en la progenie y en ella se pueden estudiar las consecuencias de su sobreexpresión o interferencia. Este sistema permite dirigir la expresión de la proteína GAL4, y por extensión, de la construcción UAS en un patrón espacio-temporal determinado.

2.1 Obtención de las construcciones UAS del gen *fh*.

2.1.1 UAS-*fh*.

Para la sobreexpresión del gen *fh* se aisló el ADNc a partir de ARNm poli(A)+ de embriones de *D. melanogaster*. Se realizó una transcripción inversa, empleando el cebador MEDAR específico del gen *fh* y, a continuación, una reacción normal de PCR con los cebadores MEDAR y MECAD, usando como molde unos pocos microlitros de la retrotranscripción anterior. Con estos cebadores, el fragmento de ADNc amplificado tiene un tamaño de 646pb y engloba desde los 60 nucleótidos previos al codón de inicio hasta el codón de parada (figura R11).

Los cebadores MECAD y MEDAR fueron diseñados incorporando en su secuencia sitios de restricción para los enzimas *NotI* y *XbaI* respectivamente. El ADNc de *fh* fue clonado en primer lugar en el sitio *EcoRV*, que permite la incorporación de fragmentos de ADN de extremos romos, del vector *pCR-Script SK(+)*, obteniéndose la construcción *pCR-fh*.

Se secuenciaron cinco de estos clones y sólo en uno de ellos se encontraron mutaciones incorporadas por la polimerasa. La secuencia de los cuatro clones restantes coincide con otras previamente obtenidas en nuestro laboratorio y con las secuencias de algunos clones de la base de datos: AY094649.1, BcDNA:AT09528, DMJ002208, AF208491, AF208492. No obstante, se detectó un cambio G/A en la base 351 de la secuencia codificante con respecto a otra serie de secuencias de las bases de datos: CG8971-RA, NM_078539, NC_004354, NM_078539.2. Este cambio afecta a la tercera base del codón 117 y no modifica el aminoácido codificado, glicina (Q) en ambos casos y muy probablemente constituye un polimorfismo.

A partir de un clon pCR-*fh*, sin mutaciones, se subclonó el fragmento *NotI-XbaI* (628pb) del ADNc de *fh* en el vector *pUAST*, generando la construcción pUAST-*fh* (UAS-*fh*). Se secuenciaron de nuevo cinco clones de esta construcción, para asegurarnos de que no se hubiera producido ninguna mutación que generase una proteína diferente a la nativa. No se encontró ningún cambio en los 5 clones secuenciados.

```
AAGTTGCGGCCGCGCAACTGGGATTTGTAAAATATAAACAAATCGTAAACAACTAAAA
AATGTTTGCCGGTCGTTTGATGGTCCGTTTCGATCGTTGGTTCGGGCATGCTTGGCCACCA
TGGGCAGGTGGTCAAAGCCCCAAGCACACGCCAGCCAAGTGATCCTGCCAGCACACCA
GCGATAGCCCGCAGTTGCTATTCAATGCGAGGAATTCAGTCCAACCGGCGATTGTTTAG
CAGTCAAATTGAGACGGAATCCACATTGGACGGCGCCACCTACGAGCGTGTGTGCTCCG
ACACCCTGGACGCACTGTGCGACTACTTCGAGGAGCTGACGGAGAACGCCTCCGAGCTG
CAGGGCACGGATGTGGCTTACAGCGATGGCGTGCTAACCGTGAACCTGGGAGGA CAGCA
CGGCACCTATGTGATCAACCGGCAGACGCCCAACAAGCAGATCTGGCTCAGTTCGCCCA
CCAGCGGTCCCAAGCGATACGATTTTCGTGGCAGTGTGGCGGCGGGCAGATGGATCTAC
AAGCACAGTGGTCAGTCGCTGCACGAACTGTTGCAGCAGGAGATACCCGGCATACTGAA
GTCACAGTCCGTGGACTTCTACGCCTGCCCTACTGTAGTTAATTCTAGAATTACT
```

Figura R11. Análisis de la secuencia del clon pCR-*fh*. Secuencia del ADNc del gen *fh*. Se ha subrayado la secuencia de los cebadores MECAD y MEDAR marcando en rojo las dianas *NotI* y *XbaI*. En negrita se señalan los codones de inicio y de parada, y en rojo el codón donde se identificó el cambio G/A.

2.1.2 UAS-*fhIR*.

Para el silenciamiento postranscripcional nos basamos en la construcción utilizada por Piccin *et al.* (2001) en la interferencia del gen *yellow*. Siguiendo dicho esquema, la construcción UAS-*fhIR* contiene dos copias del ADNc de *fh*, invertidas una respecto a la otra, y separadas por un fragmento del gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*), que servirá para favorecer la formación de la estructura de ARN de doble cadena (figura R12-A).

Para su obtención, se partió de la construcción pCR-*fh*, que fue sometida a una digestión doble con los enzimas *Xho I* y *Not I*, generándose un fragmento de 664pb correspondiente al ADNc completo. Este fragmento se subclonó en los mismos sitios de restricción del vector *pSL1180* (pSL1180-*fh*). Simultáneamente, se amplificó un fragmento de 508pb de la secuencia codificante del gen *GFP* que fue clonado en el sitio *Eco RV* del vector *pCR-Script SK(+)* (pCR-*GFP*). Posteriormente, se ligaron conjuntamente el fragmento *XhoI/KpnI* de 729pb obtenido del clon pSL1180-*fh*, el fragmento de 500pb procedente de la digestión *XhoI/HindIII* del clon pCR-*GFP* y la construcción pCR-*fh*, previamente digerida con los enzimas *KpnI* y *HindIII*, para así obtener la construcción pCR-*fhIR* de 1879pb. Finalmente, el fragmento de 1797pb, que contiene las copias *fh* invertidas y el espaciador *GFP*, fue clonado en el sitio *NotI* del vector *pUAST* generando la construcción pUAST-*fhIR* (UAS-*fhIR*). Para asegurarnos de que la estructura del clon se ajustaba al diseño previsto, se realizó un análisis de restricción de la construcción pCR-*fhIR*, obteniéndose los tamaños de banda esperados (figura R12-B).

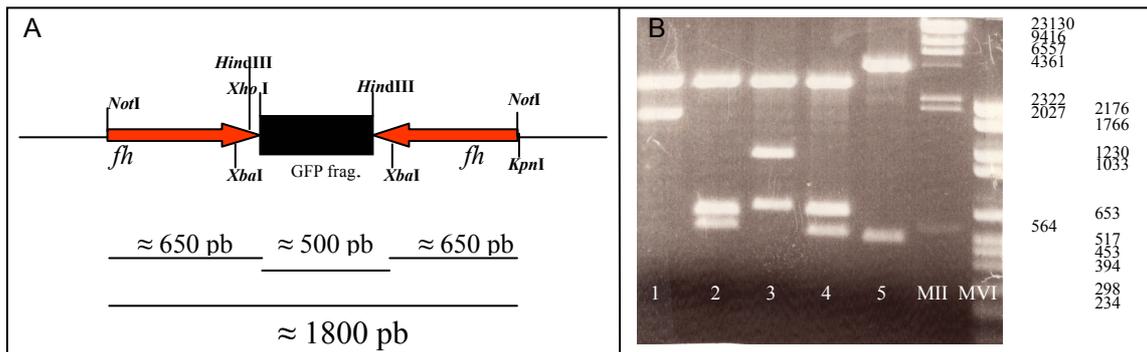


Figura R12. (A) Estructura de la construcción pCR-*fh*IR, incluye los sitios de restricción empleados en su clonación. (B) Análisis de restricción de la construcción pCR-*fh*IR: calle 1- *NotI*, calle 2- *NotI/XbaI*, calle 3- *NotI/XhoI*, calle 4- *NotI/HindIII*, calle 5- *XhoI/HindIII*. La banda más alta en las calles 1 a 4 corresponde al vector *pCR-Script*, mientras que en la calle 5 engloba al vector más las dos copias *fh* invertidas.

2.2 Obtención de las líneas transgénicas y localización de los transgenes.

Tal y como se detalla en la sección 6 de materiales y métodos, la microinyección de las construcciones se realizó en las células polares de embriones de menos de una hora, de la cepa *yw* (*yellow-white*).

Todas las líneas transgénicas fueron obtenidas en el laboratorio de la Dra. Mary K. Baylies en el Sloan- Kettering Institute de Nueva York.

El mapeo de todos los transgenes fue realizado siguiendo el esquema de cruces descrito en la figura M5 de materiales y métodos. En las figuras R13-A y B se muestra el cromosoma en el que se localiza el transgen en cada una de las líneas.

2.2.1 Líneas *UAS-fh*.

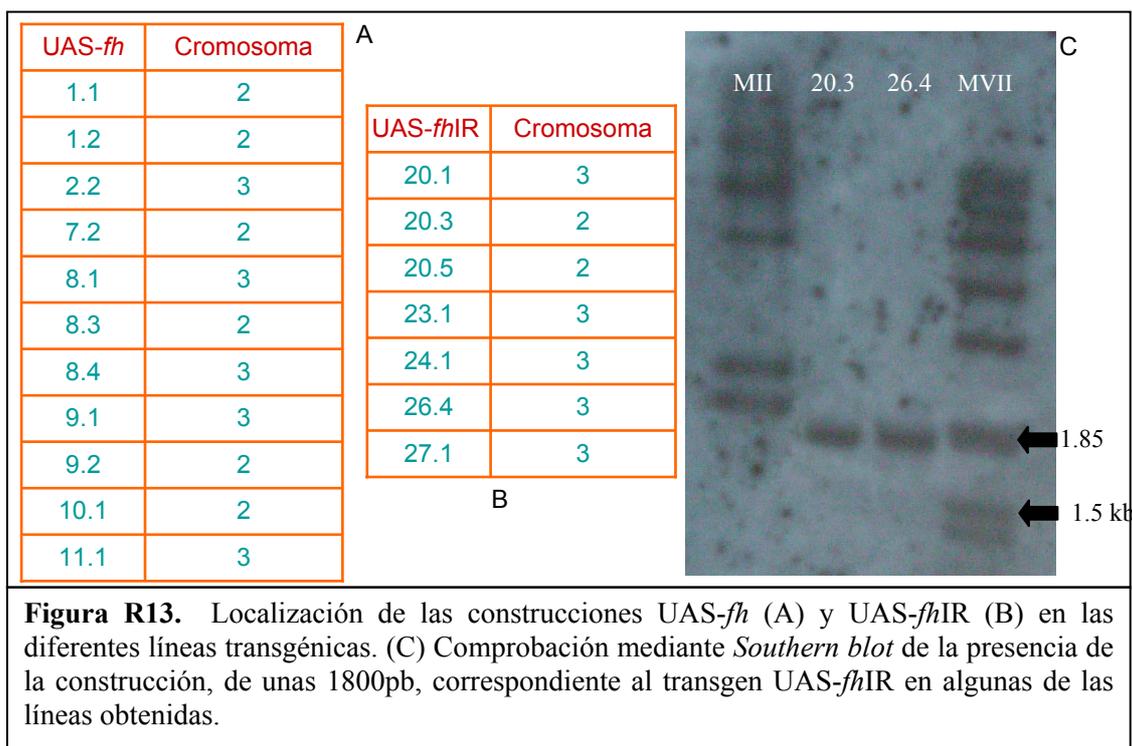
Se obtuvieron 11 líneas transformadas portadoras de la construcción de sobreexpresión. Como ninguna de las inserciones parecía afectar a la viabilidad o a la fertilidad de los individuos, todas fueron mantenidas en homocigosis.

La presencia de las construcciones se comprobó mediante reacciones de PCR a partir de ADN genómico extraído de cada línea transgénica y empleando los cebadores PUASTDIR Y PUASTREV, que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector *pUAST*. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados como última medida de control para asegurarnos de que no existía ninguna mutación en el ADNc insertado. De nuevo, no se detectó ningún cambio.

2.2.2 Líneas UAS-*fhIR*.

Se obtuvieron 7 líneas transformadas que, al igual que en el apartado anterior, también fueron mantenidas en homocigosis para la construcción.

La presencia de la construcción UAS-*fhIR* en el genoma de las líneas transgénicas, se comprobó mediante *Southern blot* de ADN genómico digerido con el enzima *Not I*. Se empleó como sonda el fragmento del gen *GFP* usado como espaciador. En el *Southern blot* se observa claramente una banda del tamaño esperado (aproximadamente 1800pb) correspondiente a la construcción insertada (figura R13-C). Se escogió en este caso esta metodología porque la estructura simétrica de la construcción impedía el desarrollo normal de la reacción de PCR.



2.3 Comprobación del funcionamiento de los sistemas de sobreexpresión e interferencia.

Se cruzó cada una de las líneas UAS-*fh* y UAS-*fhIR* con dos líneas GAL4 (*24B-GAL4* y *T80-GAL4*) de expresión en mesodermo y discos imaginales, respectivamente. En todos los casos los resultados fueron muy similares, independientemente de la línea UAS empleada, con lo que se descartaron posibles efectos posicionales en la expresión de los transgenes. Como se indicará posteriormente, con ambas líneas GAL4 no se obtuvo descendencia adulta.

2.3.1 Sobreexpresión e interferencia del gen *fh* en embriones de *D. melanogaster* de acuerdo con el patrón del gen *engrailed*.

Dado que con todas las líneas transformadas se obtuvieron los mismos resultados, se escogieron las líneas 1.1 y 20.3, con las construcciones UAS-*fh* y UAS-*fhIR* respectivamente, para estudiar los efectos de la sobreexpresión y de la interferencia del gen *fh*. Se cruzaron machos de cada línea con hembras vírgenes de la línea *engrailed-GAL4* (*en-GAL4*), en la que la proteína GAL4 se expresa según el patrón del gen *en* (compartimento posterior de cada segmento embrionario). Se recogieron los embriones obtenidos de los diferentes cruces y se realizaron diferentes hibridaciones *in situ*, empleando como sonda la secuencia complementaria al ARNm de *fh* (sonda anti-sentido). Se realizaron, al mismo tiempo, hibridaciones *in situ* en embriones *yw* con las sondas anti-sentido y con-sentido de *fh*, como controles positivo y negativo, respectivamente.

En la figura R14 se recogen los resultados de estas hibridaciones. Como era de esperar, en los controles positivo y negativo se obtienen los mismos resultados que en Cañizares *et al.*, (2000), es decir, una señal intensa y generalizada en todo el embrión (figura R14-A) y ausencia de señal (figura R14-D), respectivamente. El revelado de las hibridaciones de los embriones *en-GAL4/UAS-fh* nos muestra una marca fuerte en bandas, según el patrón determinado por el *driver en* (figura R14-B). En el caso de los embriones *en-GAL4/UAS-fhIR*, se obtuvo un resultado más difícil de interpretar: ausencia de marca del gen *fh* en una amplia región central de los embriones interferidos (figura R14-C).

2.3.2 Detección mediante *Northern blot* de los transcritos del gen *fh* en embriones sobreexpresados e interferidos según un patrón de expresión generalizado.

El incremento y la disminución del producto del gen *fh* en la sobreexpresión y en la interferencia respectivamente, se estudió analizando la presencia del transcrito mediante *Northern blot*. Para garantizar la visualización de los posibles efectos sobre la cantidad de mensajero de *fh*, se emplearon como *drivers* dos líneas de expresión general en el embrión, *daughterless-GAL4* (*da-GAL4*) y *armadillo-GAL4* (*arm-GAL4*). Para los cuatro cruces posibles (*da-GAL4/UAS-fh*, *da-GAL4/UAS-fhIR*, *arm-GAL4/UAS-fh* y *arm-GAL4/UAS-fhIR*) y para la línea UAS-*fh*, como control, se recogieron embriones de 0-21h y se extrajo el ARN total. En cada calle del *Northern blot* se cargaron 20µg de ARN y el filtro se hibridó con una sonda de ARN anti-sentido del gen *fh*, marcada con digoxigenina. Como control de la integridad de cada extracción, se hibridó posteriormente el mismo filtro empleando una sonda de ARN del gen ribosómico *rp49*.

En la figura R14-E se presentan los resultados obtenidos. En las calles del *Northern blot* correspondientes a la sobreexpresión con *da-GAL4* (calle 2) y *arm-GAL4* (calle 5) se observa una intensa banda de unas 1300pb. Este tamaño coincide con la suma de los tamaños del fragmento del ADNc clonado más el terminador de la transcripción presente en el vector *pUAST*. Por su parte, en las calles correspondientes a las muestras de interferencia con *da-GAL4* (calle 1) y *arm-GAL4* (calle 4), se aprecia una evidente degradación del transcrito de *fh*. Sin embargo, el transcrito endógeno (calle 3) no pudo ser detectado con esta cantidad de ARN total, aunque sí se detecta con cantidades mayores o a partir de ARNm (poliA). Con la sonda control *rp49* se observa una señal de unos 400pb en todas las calles.

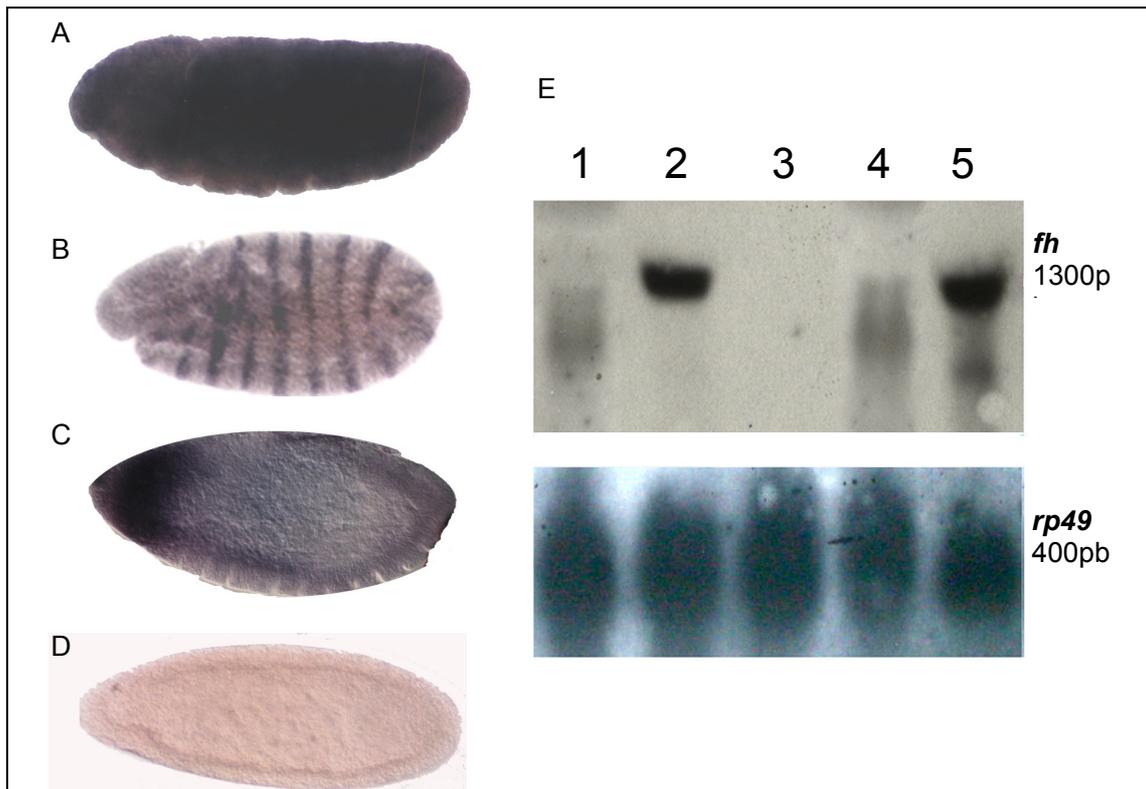


Figura R14. Expresión de las construcciones UAS-*fh* y UAS-*fhIR*. Hibridaciones *in situ* en embriones de *D. melanogaster* con la sonda anti-sentido del gen *fh* (A, B, C) y la sonda consensido (D). (A) control positivo (embrión *yw*) donde se observa una señal generalizada. (B) embrión *en-GAL4/UAS-fh*, se observa un patrón en bandas compatible con el patrón del gen *engrailed*. (C) embrión *en-GAL4/UAS-fhIR*, se observa ausencia de señal en una amplia región central del embrión. (D) control negativo (embrión *yw*). (E) Northern blot de ARN total de embriones UAS-*fhIR* x *da-GAL4* (calle 1), UAS-*fh* x *da-GAL4* (calle 2), UAS-*fh* (calle 3), UAS-*fhIR* x *arm-GAL4* (calle 4) y UAS-*fh* x *arm-GAL4* (calle 5). Se observa una señal muy intensa en las calles de los individuos sobreexpresados (2 y 5) y cierta degradación de los transcritos en las calles de los individuos interferidos (1 y 4). No se pudo detectar el transcrito endógeno en la línea UAS-*fh* (calle 3) en las condiciones utilizadas. Con la sonda *rp49*, se muestra una señal uniforme en todas las calles del Northern blot.

2.4 Análisis de los fenotipos obtenidos por sobreexpresión e interferencia.

En los experimentos realizados siempre se cruzaron hembras vírgenes de la línea GAL4 con machos de la cepa UAS correspondiente. Se han empleado tres tipos de líneas GAL4 que representan los estadios del desarrollo más críticos y los tejidos más afectados en la ataxia de Friedreich:

✓**de expresión generalizada en el embrión y discos imaginales.** La ausencia de frataxina es crítica en el desarrollo embrionario del ratón y muy probablemente en humanos. Un bajo nivel de esta proteína produce la ataxia de Friedreich y aunque el defecto genético está presente en todas las células, sólo unas pocas están seriamente afectadas. La primera aproximación fue interferir la expresión del gen *fh* según un patrón de expresión ubicuo en el inicio del desarrollo embrionario y en los discos imaginales que darán lugar a las estructuras del adulto.

✓**de expresión en distintas partes y momentos del desarrollo de los sistemas nerviosos central y periférico.** En la ataxia de Friedreich, las células afectadas principalmente son las neuronas sensitivas de los ganglios de las raíces de la espina dorsal. La degeneración de estas estructuras afecta a los sistemas sensoriales que informan al cerebro de la posición y velocidad del movimiento de los miembros del cuerpo, especialmente de las piernas. Aunque los sistemas sensitivos son los más afectados por la enfermedad, también están afectadas algunas neuronas motoras de los cordones motores corticospinales. Por ello, el uso de líneas GAL4 de sistema nervioso es importante para comprobar la adecuación de nuestro sistema como modelo de la enfermedad.

✓**de expresión según diferentes patrones espacio-temporales en el sistema muscular.** La ataxia de Friedreich, además de ser una enfermedad neurodegenerativa, también se caracteriza por presentar, en la mayoría de los pacientes, una cardiomiopatía hipertrófica, siendo la causa más frecuente de muerte en los enfermos. Por otra parte, aunque sólo se han descrito algunos casos con alteraciones microscópicas en la musculatura esquelética, se han identificado en el sistema muscular las mismas alteraciones bioquímicas descritas en los tejidos más afectados. Por tanto, disminuir la expresión de *fh* en el sistema muscular y el corazón de *Drosophila* puede proporcionar información sobre la capacidad de nuestro modelo de reproducir diferentes aspectos clave de la enfermedad.

Paralelamente a los experimentos de interferencia, se llevó a cabo en todos los casos la sobreexpresión del gen *fh*. El análisis del aumento de la dosis génica puede contribuir al estudio de la función del gen.

Los resultados se presentan en cinco apartados de acuerdo con el patrón de expresión de las líneas GAL4 (*drivers*) empleadas y los fenotipos obtenidos. En cada uno de los apartados, se incluye una tabla con la descripción del patrón de expresión de las líneas GAL4, indicando si la sobreexpresión (sbrex) o la interferencia (ARNi) provocan la aparición de letalidad total o parcial antes de la emersión de los adultos (letal) o bien si la progenie es viable. La descripción de cada patrón de expresión procede de la información existente en la *flybase* cuando la cepa procede del *Bloomington Stock Center* o a partir de la información aportada por el propio autor cuando el *driver* ha sido cedido por un investigador particular.

La mayoría de los resultados que se presentan corresponden a los cruces realizados a 29°C. Esta es la temperatura a la que se consigue un mejor equilibrio entre la expresión de la proteína GAL4 y un efecto mínimo sobre la viabilidad y/o fertilidad en *Drosophila* (Duffy, 2002).

Para descartar que los resultados obtenidos pudieran deberse a efectos secundarios de la temperatura, se cultivaron paralelamente a 29°C cada una de las líneas GAL4 y UAS así como los cruces de la línea *yw* con las diferentes líneas GAL4. En todos estos casos se encontró viabilidad y fertilidad prácticamente normales.

Como la expresión de la proteína GAL4 depende en cierta medida de la temperatura, en aquellos cruces en los que se obtuvo un fenotipo de letalidad a 29°C, se repitieron a temperaturas inferiores, de 25°C y 21°C, por si en algún caso se obtenía una progenie cuyo análisis pudiera ser de utilidad.

2.4.1 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión generalizada.

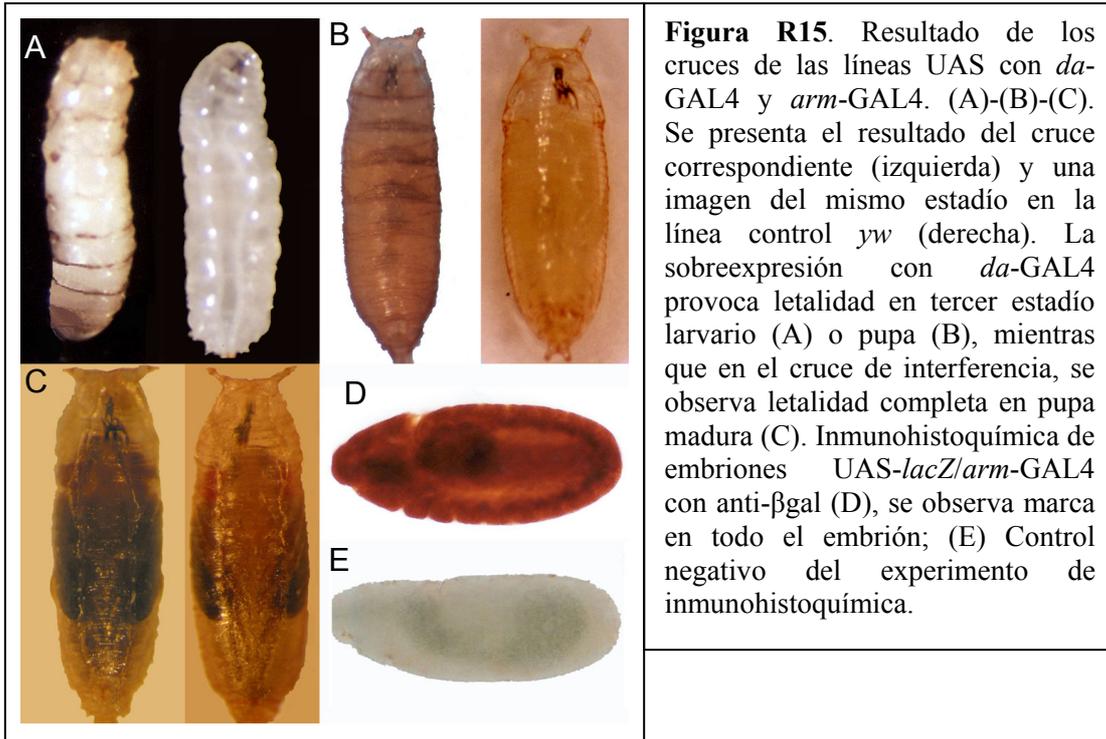
En la tabla R6 se presentan las líneas GAL4 utilizadas en este apartado, así como los resultados obtenidos con ellas.

Tabla R6. Líneas GAL4 de expresión generalizada.

Línea GAL4	Patrón de expresión	Sbrex	ARNi
<i>armadillo (arm)</i>	Ubicuo en embrión, muy potente. También en discos imaginales.	viable	viable
<i>daughterless (da)</i>	Ubicuo en embrión, con un patrón más o menos uniforme.	letal	letal
<i>T80</i>	Ubicuo en discos imaginales de 3 ^{er} estadio larvario, muy potente.	letal	letal

Los primeros experimentos fueron realizados con las líneas *arm*-GAL4 y *da*-GAL4, para estudiar el efecto sobre todas las células desde el inicio del desarrollo embrionario. El resultado obtenido fue totalmente diferente en una línea respecto a la otra. Por un lado, con la línea *arm*-GAL4 se obtuvo una progenie sin alteraciones fenotípicas evidentes, tanto para la sobreexpresión como para la interferencia. Por otro lado, con la línea *da*-GAL4 se observó un 100% de letalidad en tercer estadio larvario o en pupa temprana en la sobreexpresión (figura R15-A y B) y un 100% de letalidad en pupa madura en la interferencia (figura R15-C). También, en esta última línea, se detectó un movimiento significativamente más lento de las larvas sobreexpresadas respecto al movimiento de las larvas control.

Aunque los experimentos de *Northern blot* (figura R14-E) habían demostrado que, para ambas líneas, se conseguía el efecto deseado a nivel molecular (aumento o disminución de la expresión de *fh*), se comprobó el patrón de expresión de la línea *arm*-GAL4 utilizada por si existía algún problema que pudiera explicar las diferencias encontradas entre las dos líneas. Para ello, se cruzaron hembras de la línea *arm*-GAL4 con machos de la línea UAS-*lacZ* y mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti- β gal, se determinó el patrón embrionario de nuestra línea *arm*-GAL4. Como era de esperar, se obtuvo marca en todo el embrión, algo más intensa en la capa celular ectodérmica y en el intestino medio posterior (figura R15-D).



Una posible explicación para las diferencias obtenidas, se basaría en que la expresión de los genes *arm* y *da* tiene distinta importancia en diferentes células diana, a pesar de mostrar ambos genes una expresión ubicua en el embrión temprano. Según la información disponible sobre ambos genes en la *flybase* y en la página web “*the interactive fly*”, el gen *da* tiene un papel importante en la determinación de los sistemas muscular y nervioso, mientras que *arm* está implicado en procesos de adherencia para la formación y mantenimiento de capas celulares. Por tanto, podemos plantear la hipótesis de que la función del gen *fh* es crítica durante el desarrollo embrionario de la musculatura y del sistema nervioso en *Drosophila*. Los resultados que hemos obtenido con las líneas GAL4 específicas de los sistemas muscular y nervioso, apoyan esta hipótesis.

El siguiente paso fue estudiar las causas subyacentes a los fenotipos de letalidad obtenidos. Se buscaron, posibles defectos o alteraciones en los sistemas muscular y nervioso de los embriones, así como en el corazón embrionario, empleando un amplio abanico de anticuerpos específicos:

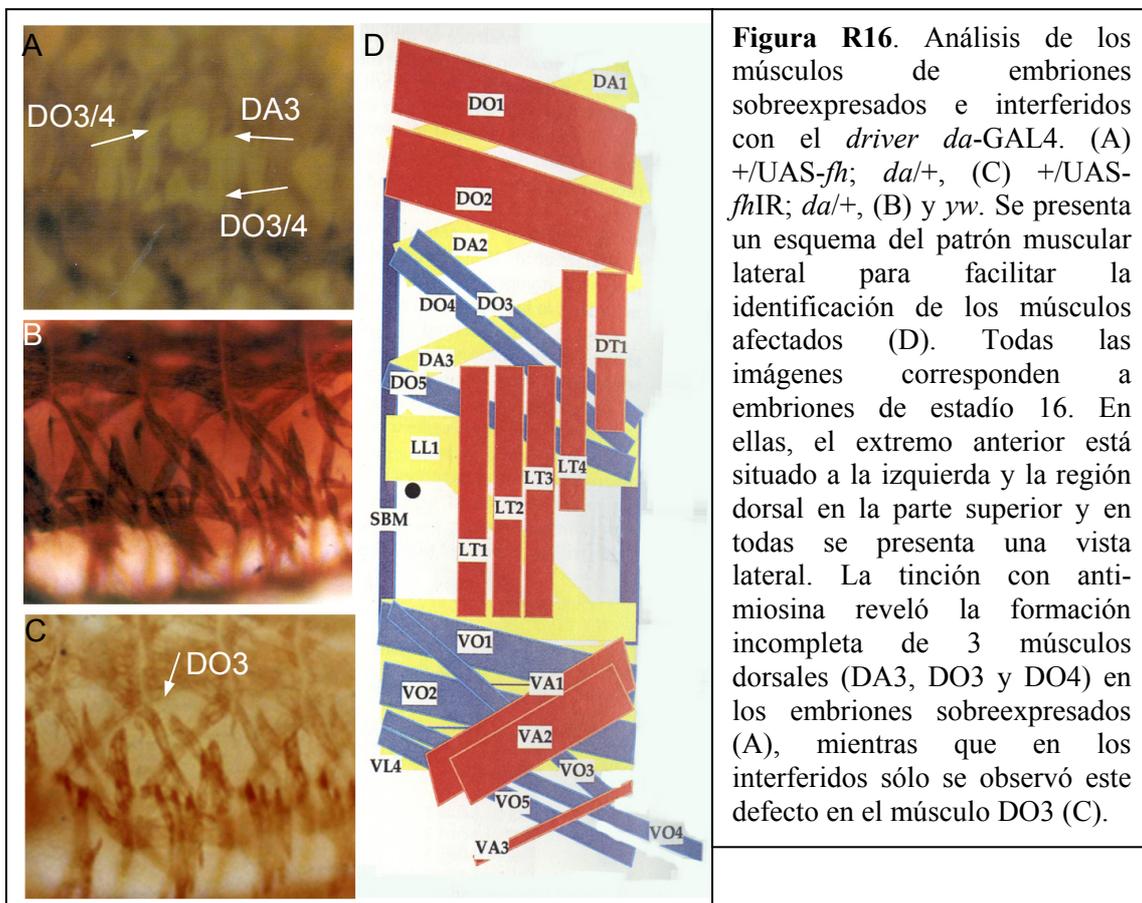
- Anti-miosina, que marca la estructura muscular embrionaria desde el estadio 13.
- Anti-even skipped (*eve*), que tiñe las células fundadoras de los músculos dorsal agudo 1 (DA1), un subconjunto de células pericardiacas y algunas Células Madre Ganglionares (GMC) y sus neuronas hijas.
- BP102, que marca la escalera típica del Sistema Nervioso Central (SNC).
- 22C10, que tiñe el citoplasma y la membrana interna de todas las neuronas del Sistema Nervioso Periférico (SNP) y algunos axones sensoriales.
- 1D4, que tiñe los axones longitudinales del SNC y los axones motores intersegmentales (ISN) y segmentales (SN).

Sistema muscular

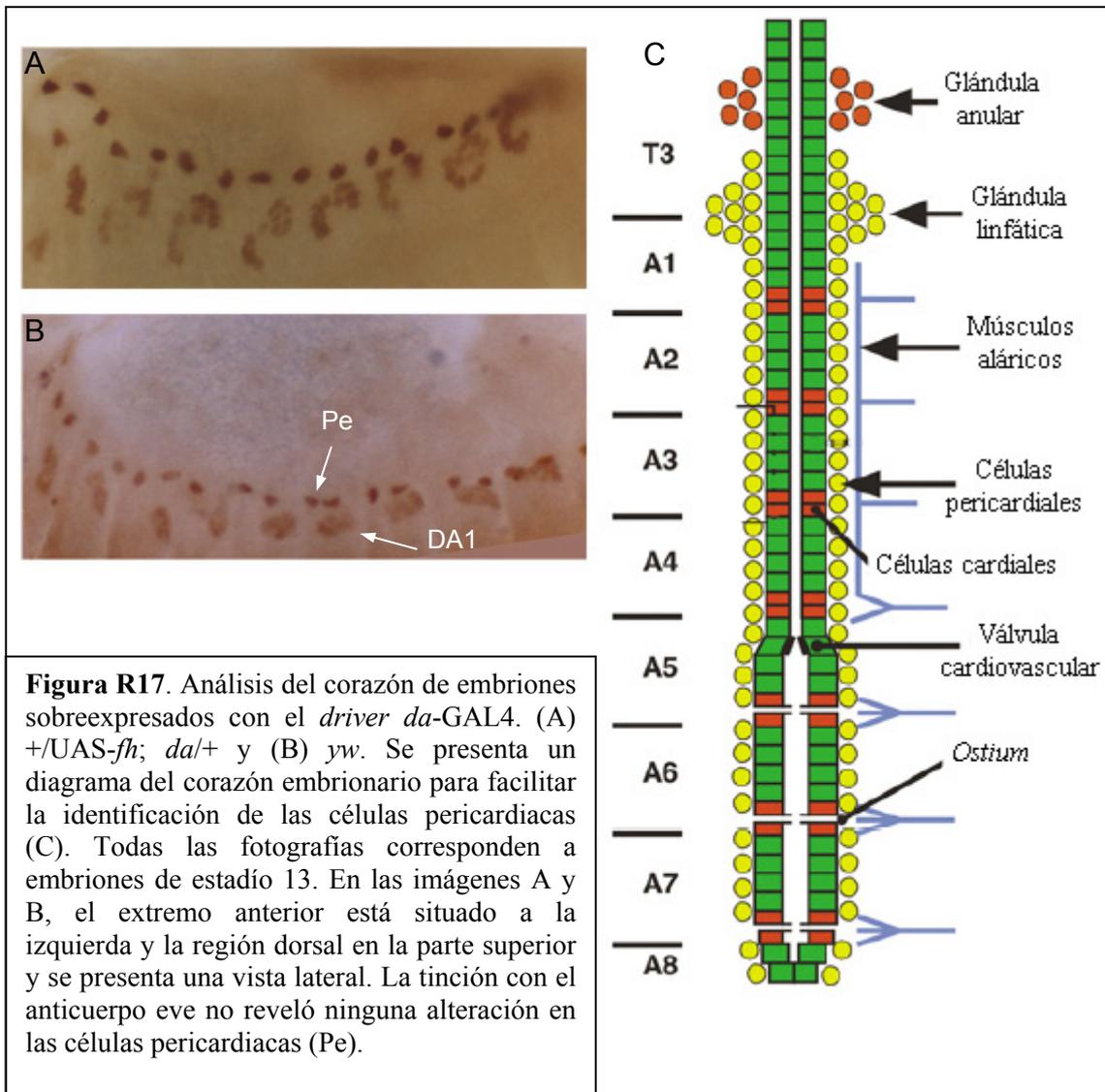
En *D. melanogaster*, la musculatura esquelética o somática se genera a partir del mesodermo embrionario. De esta capa celular se derivan dos tipos de mioblastos, las células fundadoras y las células competentes para la fusión. Las primeras determinan el tamaño, orientación, disposición etc. de un determinado músculo, mientras que las segundas se fusionan a las primeras dando lugar al músculo completo final. Al término del proceso se obtiene un patrón muscular constituido por 30 músculos por hemisegmento abdominal.

Por su parte, el sistema circulatorio en *Drosophila* se limita a una estructura tubular situada en la parte dorsal que se denomina corazón, y que bombea la hemolinfa hacia el cerebro. El corazón se genera también desde el mesodermo, pero son necesarias señales ectodérmicas para que, en cada hemisegmento, un subconjunto de células mesodérmicas adquiera ese destino cardíaco. Dichas células migran dorsalmente y convergen para formar el corazón junto con otros tipos celulares especificados durante dicha migración. La forma final del corazón embrionario consiste en dos filas centrales de células cardíacas rodeadas por las pericardiacas.

La tinción con anti-miosina, reveló en los embriones sobreexpresados con el *driver da*, la formación incompleta de algunos músculos: dorsal agudo 3 (DA3), dorsal oblicuo 3 (DO3) y dorsal oblicuo 4 (DO4) (figura R16-A) en comparación con el control (figura R16-B). Dicho defecto se vio reducido al músculo dorsal oblicuo 3 (DO3) en el caso de los embriones interferidos con el mismo *driver* (figura R16-C).



En la tinción con el anticuerpo eve, no se encontraron defectos en las células pericardiacas de embriones sobreexpresados (figura R17-A), presentando un orden y disposición normal a lo largo del eje antero-posterior del embrión. Respecto a las células fundadoras DA1, se pensó que no estaban afectadas porque no se observó ningún defecto en el músculo dorsal agudo 1 de ningún embrión. Tampoco se detectó ninguna anomalía en los embriones *da-GAL4/UAS-fhIR*.



Sistema nervioso

El SNC deriva del ectodermo neural. Por cada hemisegmento, se separan 30 neuroblastos desde el ectodermo y cada uno se divide asimétricamente varias veces generando una media de cinco GMC, cada una de las cuales va a producir un par de neuronas. A partir del estadio 13, todo el conjunto de neuronas que se ha ido generando empieza a diferenciarse y cada tipo neuronal empieza a migrar de forma específica para extender las fibras axonales características de cada tipo. El conjunto comienza a condensarse para formar la estructura nerviosa central con el aspecto típico de escalera a lo largo de todos los segmentos y el cerebro en la región anterior. En el estadio 17, se completa todo el proceso.

Por su parte, el SNP esta formado por: (a) los órganos sensoriales, formados por conjuntos de neuronas sensoriales que derivan de una serie de células precursoras (SOPs) segregadas desde el ectodermo; (b) los axones sensoriales, que crecen desde la epidermis hacia el SNC y (c) los axones motores, que crecen desde el SNC hasta alcanzar los músculos que se encargan de inervar. Cada neurómero del SNC posee, en cada lado, dos raíces nerviosas de las cuales los axones motores salen hacia la periferia y los axones sensoriales entran en el SNC.

Con el objetivo de detectar en los embriones sobreexpresados e interferidos posibles alteraciones en el SNC, utilizamos los anticuerpos eve (figura R18-A y B) y BP-102 (figura R19-C y D). En ningún caso se observaron defectos en las GMC, sus neuronas hijas ni en la escalera del SNC.

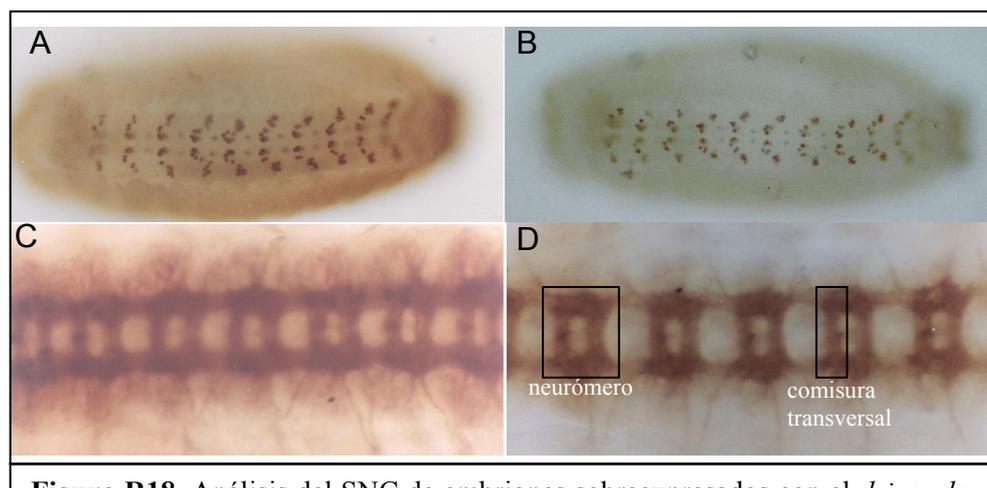


Figura R18. Análisis del SNC de embriones sobreexpresados con el *driver da-GAL4. +/UAS-fh; da/+* (A, C) y *yw* (B, D). Las imágenes (A, B) corresponden a embriones de estadio 16 y (C, D) a embriones de estadio 15. En todas se presentan vistas ventrales con el extremo anterior situado a la izquierda. El anticuerpo even-skipped no reveló ninguna alteración en las GMC de los embriones (A). La tinción con BP-102 tampoco mostró ninguna anomalía en la escalera central de los embriones sobreexpresados (C).

Sin embargo, las tinciones con el anticuerpo 22C10 de la parte sensorial del SNP de los embriones sobreexpresados, mostraron una gran variedad de defectos: desde la ausencia de parte de las terminaciones sensoriales (figura R19-A), hasta la fusión anómala de axones sensoriales de segmentos contiguos (figura R19-C y C*) e incluso un incremento de neuronas sensoriales en el grupo ventral' (figura R19-D y D*) o del número de raíces nerviosas situadas en el límite de ambos sistemas nerviosos (figura R19-A y A*). En los experimentos de interferencia no se observó ninguna de estas anomalías.

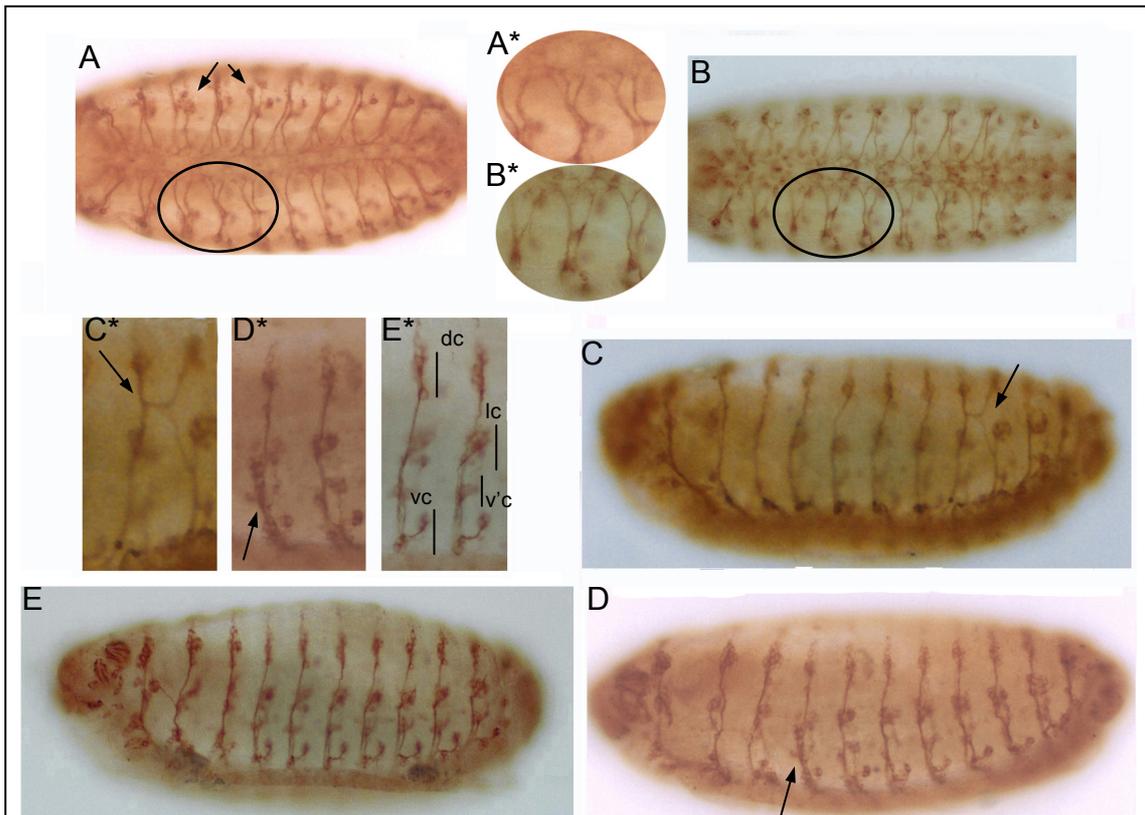


Figura R19. Defectos en el SNP sensorial de embriones sobreexpresados con la línea *da-GAL4. +/UAS-fh; da/+* (A, A*, C, C*, D, D*) y *yw* (B, B*, E, E*). Todas las imágenes corresponden a embriones de estadio 16. En todas, el extremo anterior está situado a la izquierda. En (A, A*, B, B*) se presenta una vista ventral y para el resto una vista lateral con la región dorsal en la parte superior. Las imágenes* son ampliaciones de la zona afectada. Con el anticuerpo 22C10, se detectaron diferentes tipos de defectos: ausencia de parte de algunos axones sensoriales (A), fusión de axones (C, C*) y un aumento del número de neuronas (D, D*) o de algunas raíces axonales (A, A*). En la imagen E*, se han señalado los grupos de células sensoriales que se distinguen en cada hemisegmento: dc, conjunto dorsal; lc, conjunto lateral; v'c, conjunto ventral' y vc, conjunto ventral.

Por otra parte, la tinción de los axones motores del SNP en los embriones $+/UAS-fh; da/+$ con el anticuerpo 1D4 mostró, de nuevo, la aparición de fusiones incorrectas, esta vez entre los axones motores ISN de segmentos adyacentes (figura R20-A, B y D). No se detectó ningún defecto en los axones segmentales (SN). En los experimentos de interferencia tampoco observamos ninguna alteración significativa.

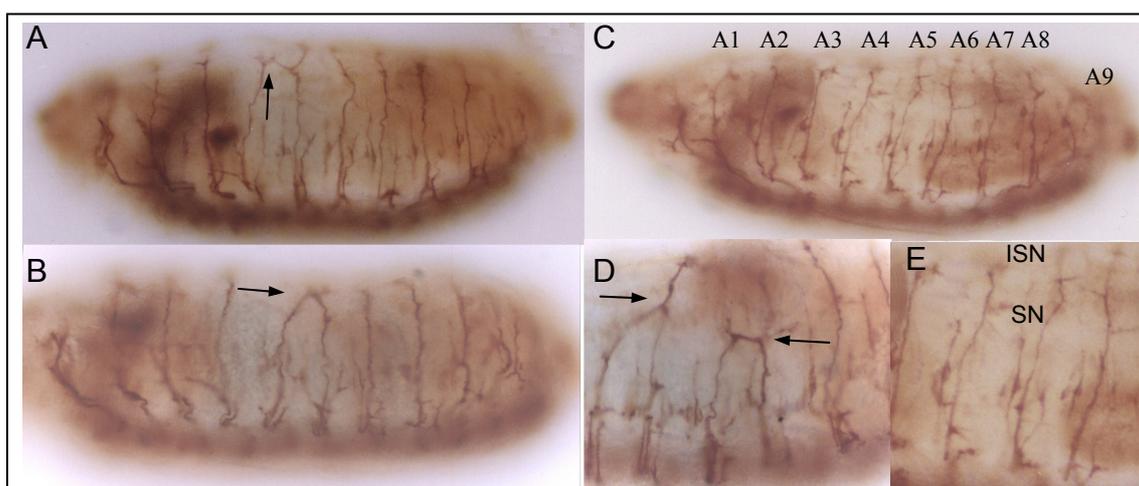


Figura R20. Defectos en el SNP motor de embriones sobreexpresados con la línea *da*-GAL4. $+/UAS-fh; da/+$ (A, B, D) y *yw* (C, E). Todas las imágenes corresponden a vistas laterales de embriones de estadio 16, en los que el extremo anterior está situado a la izquierda y la región dorsal en la parte superior. Las tinciones con el anticuerpo 1D4 revelaron, en parte de los embriones, fusiones entre axones motores ISN de segmentos contiguos (A, B, D, flechas).

Los experimentos con la línea *da*-GAL4 se llevaron a cabo también a 25°C y 21°C. En los cruces de sobreexpresión, se observó un 100% de letalidad en pupa madura a 25°C y casi un 100% a 21°C. En los cruces de interferencia a 25°C nacen un 4-5% de individuos, que mueren a los pocos días, y a 21°C se observa una gran cantidad de adultos fenotípicamente normales.

Tanto para la línea *da*-GAL4 como para el resto de líneas que se describirán en sucesivos apartados, se ha observado un retraso del momento de aparición de la letalidad directamente proporcional a la disminución de la temperatura del experimento.

resultados

La línea *T80*, cuyo patrón de expresión es ubicuo en discos imaginales de tercer estadio larvario, se utilizó para intentar afectar al mayor número posible de células en el adulto. Los discos imaginales son unas estructuras bidimensionales, a partir de las cuales se van a desarrollar tridimensionalmente gran parte de los órganos y tejidos del individuo adulto. En los experimentos de sobreexpresión e interferencia con este *driver*, se obtuvo también letalidad completa en estadio de prepupa y pupa madura, respectivamente, con lo que no pudo alterarse ninguna estructura en fase adulta.

Como puede observarse en la figura R21, en los individuos sobreexpresados aparecen, desde el inicio de la pupación, muchas regiones necróticas a lo largo de su estructura; en el caso de los individuos interferidos los tejidos muertos se observan en momentos más avanzados de la pupación.

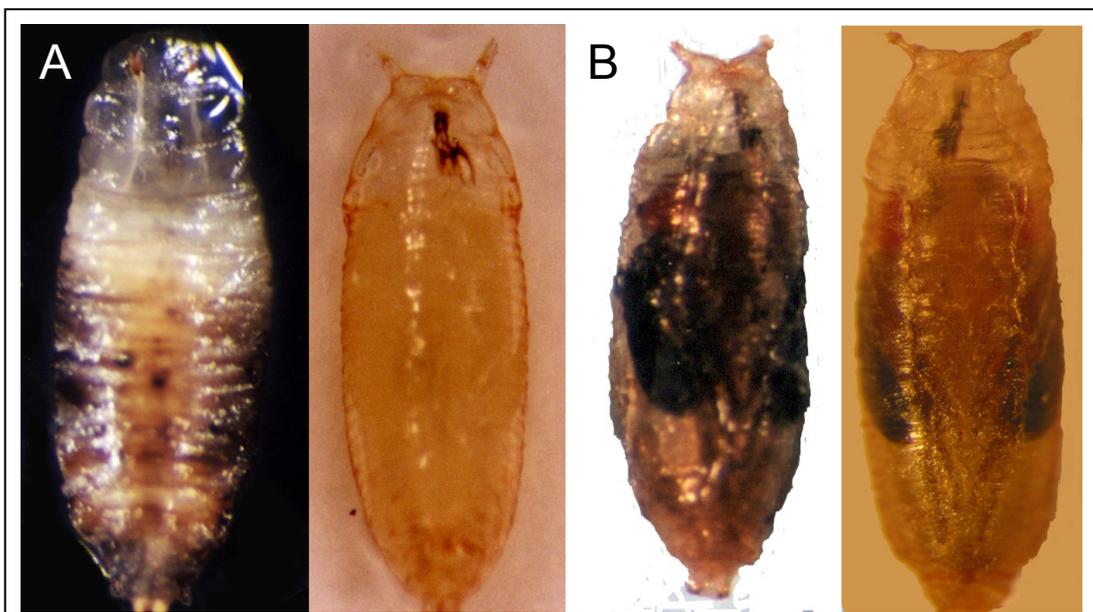


Figura R21. Aspecto de las pupas sobreexpresadas (A) e interferidas (B) al utilizar la línea *T80-GAL4*. Se presentan las imágenes de las pupas *T80/UAS-fh* y *T80/UAS-fhIR* en la izquierda y del control *yw* del mismo estadio en la derecha.

Dado que los individuos no llegaron a terminar la fase de pupación, nos planteamos analizar los discos imaginales. Se diseccionaron 40 larvas de 3^{er} estadio larvario y se observaron sus discos imaginales al microscopio óptico. Sorprendentemente, en todos los casos, el tamaño, la forma y el aspecto fue completamente normal. La letalidad observada en esta fase del desarrollo, al utilizar la línea *T80-GAL4*, podría explicarse por el hecho de que en esta línea se produce además expresión de la proteína GAL4 en los músculos y el SNC embrionario (Hrdlica *et al.*, 2002).

Con *T80-GAL4*, se realizaron también los cruces a 25°C y 21°C. En la sobreexpresión a 25°C se observa un 100% de letalidad en estadio de pupa madura, mientras que a 21°C llegan a emerger unos pocos adultos. Por su parte, en los cruces de interferencia, a 25°C, la letalidad es prácticamente total en pupa madura mientras que a 21°C nacen un número importante de moscas.

La línea *T80-GAL4* se ha empleado también en el estudio de los efectos de la sobreexpresión de distintos genes sobre el desarrollo de las alas (Ahmed *et al.*, 2003). Como a 21°C se obtuvieron adultos en los cruces de sobreexpresión e interferencia, se analizaron sus alas en busca de posibles alteraciones. Aproximadamente, en el 50% de los adultos sobreexpresados, se observaron algunas deformaciones en el margen ventral de las alas (figura R22-A) sin que se apreciara ningún efecto sobre la capacidad de vuelo de estos individuos. La interferencia no tuvo ninguna influencia sobre este carácter.



Figura R22. Alas de individuos sobreexpresados a 21°C. (A) Ala de un individuo *T80-GAL4/UAS-fh*, se observan algunas deformaciones en el margen ventral del ala (flechas azules). (B) Ala de un individuo control *T80-GAL4/yw*.

resultados

2.4.2 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 con expresión específica en el sistema muscular y el corazón.

Se han empleado 7 líneas GAL4 con diferentes patrones espacio-temporales de expresión de la proteína GAL4 en músculo y dos líneas GAL4 con expresión en los cardioblastos y células pericardiacas. Estas líneas y los resultados obtenidos con ellas se presentan en la Tabla R7.

Tabla R7. Líneas GAL4 de expresión en músculo y corazón.			
Línea GAL4	Patrón de expresión	Sbrex	ARNi
<i>24B</i>	Mesodermo embrionario y células miogénicas (incluyendo cardioblastos). A partir del estadio 9.	letal	letal
<i>MHC</i>	Expresión tardía en músculos, a partir del primer estadio larvario.	viable	viable
<i>C23</i>	Expresión embrionaria en músculos transversales.	letal	letal
<i>5053A</i>	Expresión embrionaria en músculos longitudinales.	viable	viable
<i>SG29.1</i>	Moderadamente en los músculos indirectos del vuelo (IFM) durante su desarrollo en la metamorfosis y durante la vida del adulto. También alta expresión en las alas.	letal	letal
<i>1151</i>	Expresión en todos los mioblastos que formarán la musculatura adulta.	viable	viable
<i>act88F</i>	Específico en los músculos indirectos de vuelo.	viable	viable
<i>Dorothy (Dot)</i>	Células cardiacas, pericardiacas y proventriculares a lo largo de todo el desarrollo de <i>Drosophila</i> .	letal	letal

De acuerdo con los resultados obtenidos, el aumento o la disminución significativa de la expresión del gen *fh* son muy críticos en los estadios tempranos del desarrollo embrionario (*24B*), dado que ningún individuo sobrepasa el estadio de pupa temprana. Por el contrario, la viabilidad no se ve afectada si se altera la expresión de *fh* en células musculares más diferenciadas (*MHC*, *1151*, *act88F*).

También se obtienen diferentes resultados en función de un patrón espacial de la expresión de este gen. Se obtiene una elevada letalidad cuando se emplea la línea *C23* y del 100% con la línea *Dot*, que dirigen la modificación de la expresión de *fh* en los músculos transversales y en las células que darán lugar al corazón de *Drosophila* respectivamente. En cambio, la dosis génica en los músculos longitudinales (*5053A*) no es crítica para la viabilidad de los individuos.

La descendencia obtenida, tanto en la sobreexpresión como en la interferencia, al utilizar los *drivers* *MHC*, *1151*, *act88F* y *5053A* fue siempre de aspecto normal. Con estos individuos se han realizado tests de supervivencia y de capacidad locomotora para precisar si estos parámetros están afectados y en qué medida. Los resultados de ambos tipos de tests se describen en el apartado 2.4.5.

Con la línea *SG29.1* hemos observado una moderada letalidad en estadio de pupa (en la sobreexpresión) o en pupa madura (en la interferencia). Estos resultados contrastan con los de la línea *act88F*, con la que se ha obtenido una descendencia que ha llegado a la fase adulta, a pesar de que ambos *drivers* dirigen la expresión de *fh* en los músculos indirectos del vuelo. Recientemente en el trabajo de Ayyub *et al.*, (2005) se indica que en la línea *SG29.1* hay también expresión en algunos dominios del SNP. Este dato diferenciaría a ambas líneas y apoyaría los resultados que hemos obtenido al utilizar líneas específicas de este sistema.

En los experimentos de sobreexpresión con la línea *SG29.1*, hemos observado que todos los individuos que llegan a la fase adulta son hembras, y en los experimentos de interferencia se cuenta, además, un 10% de machos en comparación con el 40% de machos obtenidos en el cruce control. Esta distorsión de la ratio sexual podría explicarse por el comportamiento observado en algunos genes del cromosoma X, que cuando se insertan en autosomas por transgénesis, mantienen en su nueva localización la compensación de dosis que les es propia (Hazelrigg *et al.*, 1984). De esta manera, machos y hembras con el mismo número de transgenes presentarán una expresión del transgen cuantitativamente diferente, siendo mayor en los machos que en las hembras. Recordemos que la línea *responder* que utilizamos presenta la construcción *UAS-fh* en el cromosoma 2.

En la figura R23 se presentan algunas imágenes del aspecto de las pupas y de los pocos adultos obtenidos en los experimentos de sobreexpresión e interferencia utilizando los *drivers* de la Tabla R7. En el caso de *24B*, las pupas tienen una morfología sensiblemente deformada (figura R23-A y C). Con la línea *SG29.1*, las pupas que no continuaron su desarrollo muestran también un aspecto deformado y un color oscuro indicativo de una necrosis generalizada (figura R23-G). En los cruces con *Dot*, ningún individuo llega a la fase adulta, deteniéndose el desarrollo desde los estadios pupales (figura R23-E) hasta el final de la pupación, incluso en el momento de la emersión del imago (figura R23-F). La interferencia del gen *fh* provocó, en todos los casos, un fenotipo menos acusado que el de la sobreexpresión, con la aparición de letalidad al final de la pupación (figura R23-I, J y K). Además, en los individuos interferidos con la línea *SG29.1* que llegan a nacer se observa a las tres semanas cómo en todos ellos las alas se colocan perpendiculares al cuerpo, indicando un posible daño en los IFM (figura R23-L).

Las larvas sobreexpresadas con *24B-GAL4* presentan un movimiento mucho más lento que las larvas control. Para comparar el recorrido de ambos tipos de larvas, colocamos una placa de 55 mm de diámetro en una cámara húmeda para que se condensase una capa de agua en su superficie lo suficientemente fina para que no dificultara el movimiento de las larvas. A continuación situamos en la placa una larva de cada genotipo, y medimos qué distancia había recorrido cada una de ellas tras 10 segundos, tiempo suficiente para observar posibles diferencias antes de que se evaporase el vapor de agua condensado. Transcurrido dicho tiempo, observamos que las larvas sobreexpresadas permanecen prácticamente en la posición original en comparación con los controles, que recorrieron unos 15mm (figura R24).

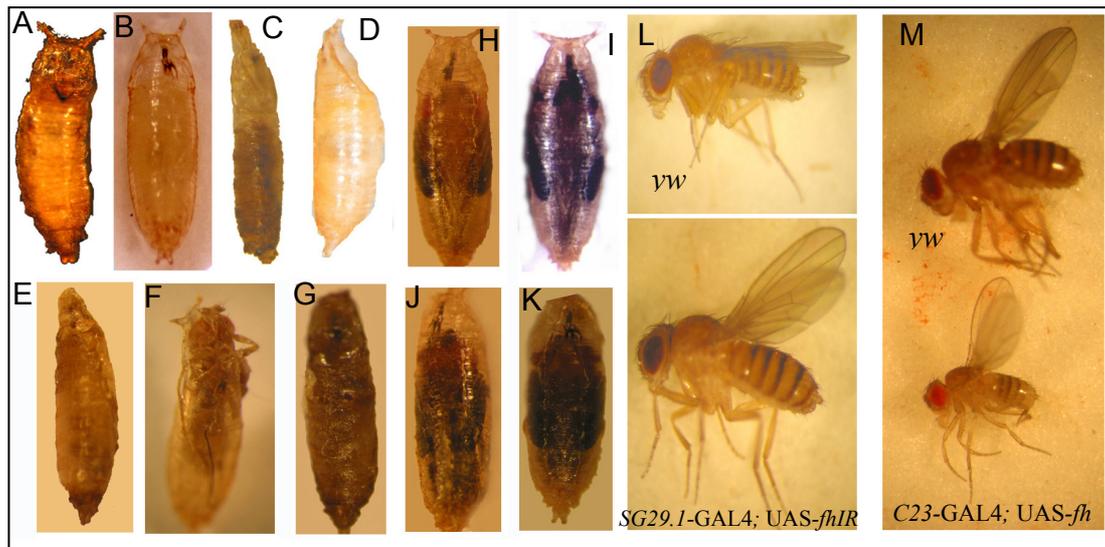


Figura R23. Resultado de los cruces de sobreexpresión e interferencia del gen *fh* con líneas GAL4 de expresión en el sistema muscular y el corazón. La sobreexpresión con la línea *24B* provoca la aparición de letalidad en pupa temprana con morfología deformada (A, C). Con la línea *SG29.1* se obtiene un resultado similar (G). Mientras que con *Dot* la letalidad se observa desde el estadio de pupa (E) hasta el adulto emergente (F). En todos los cruces de interferencia se obtuvo letalidad como pupa madura del 100% en *24B* (I), *Dot* (J) y menor del 100% en *SG29.1* (K). Además en este último caso, al cabo de 3 semanas, las alas de las moscas se colocan perpendiculares al cuerpo (L). Para la línea *C23*, los pocos adultos sobreexpresados que emergen tienen un tamaño significativamente menor que los individuos *yw* (M). Las imágenes B, D e H pertenecen a la cepa *yw*.

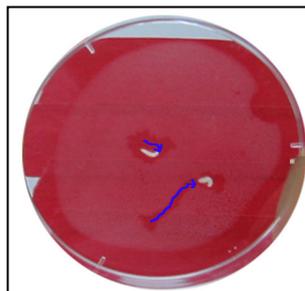
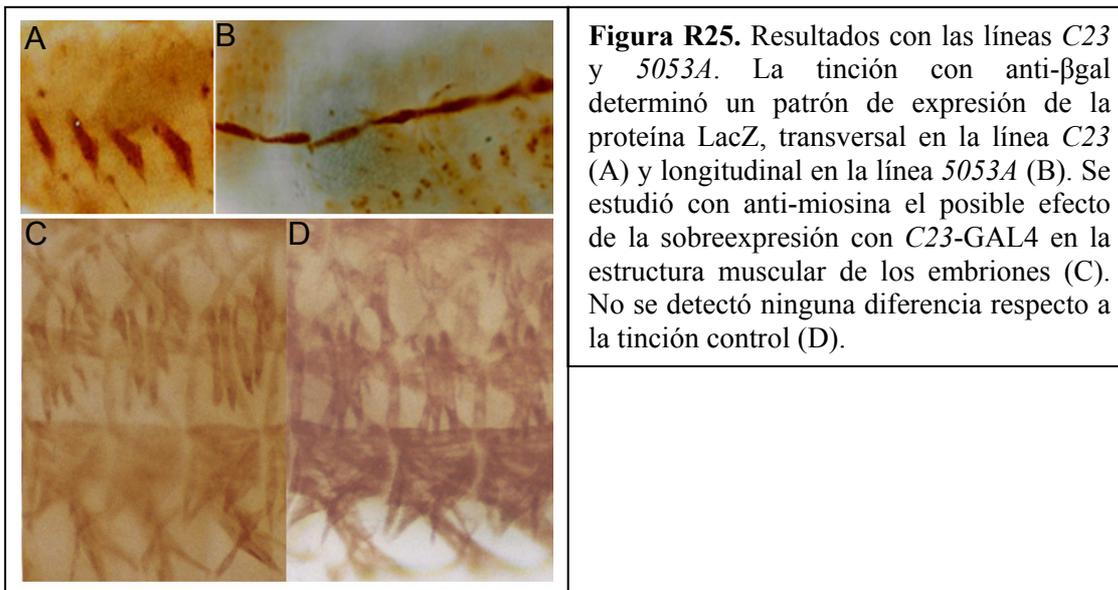


Figura R24. Diferencias en el recorrido de larvas *+/UAS-fh; 24B/+* y larvas *yw*. Tras 10s, la larva sobreexpresada ha permanecido prácticamente inmóvil en la posición inicial, mientras que la larva control se ha desplazado unos 15mm.

Como ya hemos comentado, un fenotipo interesante fue el obtenido con la línea *C23* en comparación con *5053A*. En el primer caso se produce letalidad en fase de pupa madura, mientras que con *5053A* se obtiene una progenie viable. Es importante destacar que en los cruces de sobreexpresión con *C23*, en algunos viales aparecieron uno o dos adultos, siempre con un tamaño significativamente menor ($\approx 1,5$ veces inferior) al de los individuos control (figura R23-M) en condiciones de cultivo sin competencia en ambos casos. La diferencia entre ambos *drivers* estriba en el tipo de músculo donde dirigen la sobreexpresión o el silenciamiento del gen *fh*: músculos transversales en *C23* y longitudinales en *5053A*. Para cerciorarnos de los patrones de expresión, se cruzó cada una de estas líneas con la línea *UAS-lacZ* y se tiñeron los embriones F_1 con el anticuerpo

anti- β gal. Los patrones obtenidos coincidieron con los previamente descritos en la *flybase*: músculos transversales para *C23* (figura R25-A) y longitudinales para *5053A* (figura R25-B). Finalmente, se llevaron a cabo nuevas tinciones con el anticuerpo anti-miosina, para determinar si la sobreexpresión o la interferencia con *C23* afectaban a la estructura de los músculos transversales. Las imágenes obtenidas no revelaron ninguna anomalía en este sentido en ambos tipos de experimentos (figura R25-C). Dado que con la línea *C23-GAL4*, la letalidad aparece en estadios en los que los músculos transversales embrionarios ya no están presentes, es de suponer que estamos afectando a estructuras diferentes que todavía no han sido identificadas como parte del patrón de expresión de dicha línea.



Dado que a partir del mesodermo se derivan todos los tipos de células miogénicas del embrión, incluidos los cardioblastos, se estudió mediante inmunohistoquímica, la estructura de las fibras musculares y del corazón en embriones en los que se había aumentado o disminuido la expresión de *fh* de acuerdo con el patrón de la línea *24B*.

La tinción con anti-miosina permitió observar una elevada desorganización del sistema muscular de los embriones sobreexpresados (figura R26-A y C), menor en el caso de los embriones interferidos (figura R26-E). En los embriones sobreexpresados detectamos fenotipos siempre más acusados con ausencia completa de la estructura muscular en algunos hemisegmentos, fusión de fibras musculares formando estructuras compactas y prolongaciones deformadas. El corazón también aparece deformado, y sólo pueden distinguirse algunos de los músculos alárnicos (figura R26-C, asterisco).

El siguiente paso consistió en resolver si las anomalías encontradas eran debidas a problemas durante la diferenciación muscular por los efectos de la sobreexpresión sobre las células fundadoras. Para ello, se realizaron tinciones con los anticuerpos anti-Krüppel (Kr) y even-skipped (eve) que tiñen, entre otras, las células fundadoras de los músculos LL1 (lateral longitudinal 1), LT4 (lateral transversal 4), LT2 (lateral transversal 2) y VA2 (ventral agudo 2), DO1 (dorsal oblicuo 1) y DA1 (dorsal agudo 1), respectivamente. En embriones sobreexpresados, se encontró un patrón anómalo con la tinción con Kr. En ese patrón se distinguía un cierto desorden de algunos de los grupos de células fundadoras de los músculos laterales (figura R26-G), aunque resultó difícil determinar si afectaba a su número. En estos embriones, se observó también que las células fundadoras DA1 no presentaban una organización clara por segmentos como en el embrión control (figura R26-H).

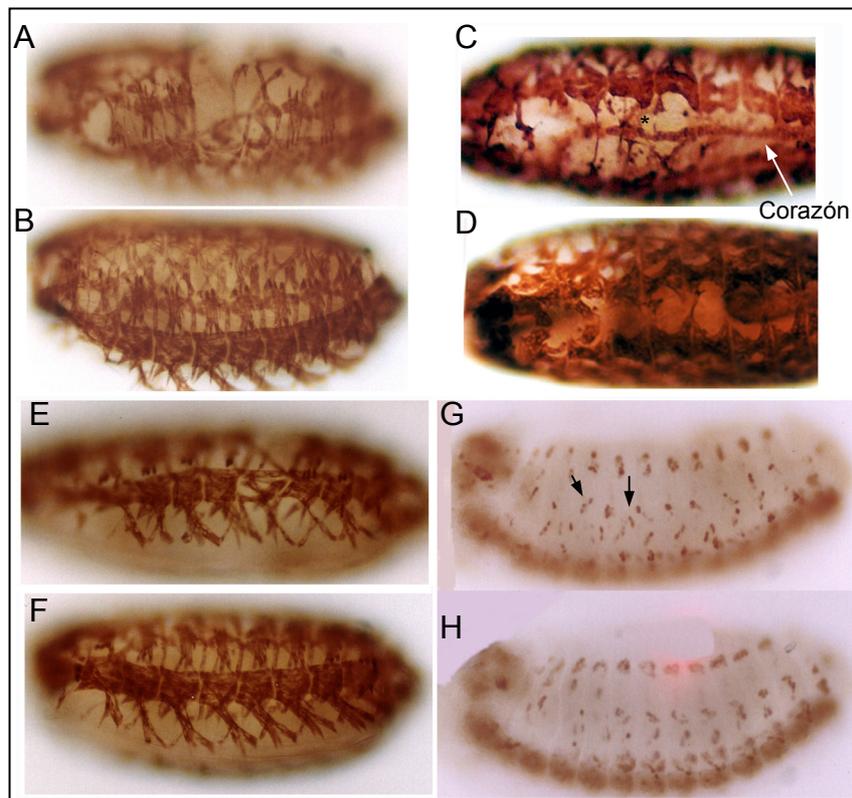


Figura R26. Análisis del sistema muscular de embriones con expresión alterada del gen *fh* con la línea *24B-GAL4*. En todas las imágenes el extremo anterior está situado a la izquierda. (C, D) vista dorsal y el resto vista lateral con la parte dorsal hacia arriba. *UAS-fh/+; 24B/+* (A, C, G), *UAS-fhIR/+; 24B/+* (E) y *yw* (B, D, F, H). Las imágenes A a F corresponden a embriones de estadio 16 y las fotografías G y H a embriones de estadio 13. La tinción con anti-miosina reveló una evidente deformación de la musculatura de los embriones sobreexpresados (A, C), algo menos intensa en los interferidos (E). La tinción con el anticuerpo Kr mostró una disposición irregular de algunas células fundadoras de músculos (G, flechas).

A raíz de los defectos observados en el corazón de los embriones *UAS-fh/+; 24B/+* teñidos con anti-miosina, se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos específicos de las células cardíacas y pericárdicas: anti-*zfh* y anti-*eve*. El anticuerpo anti-*zfh* tiñe ambos tipos de células del corazón, y nos permitió observar huecos en su estructura debido a la ausencia tanto de algunas células cardíacas como de algunas pericárdicas (figura R27-A). El anticuerpo *eve* nos mostró cierta desorganización en la localización de algunas células pericárdicas a partir del estadio 13 (figura R27-C), que es cuando comienza, desde el mesodermo, el proceso de dorsalización de las células que formarán el corazón. Sin embargo, hasta los estadios 11-12 se obtuvo el mismo patrón *eve* que en la tinción control (figura R27-E y G).

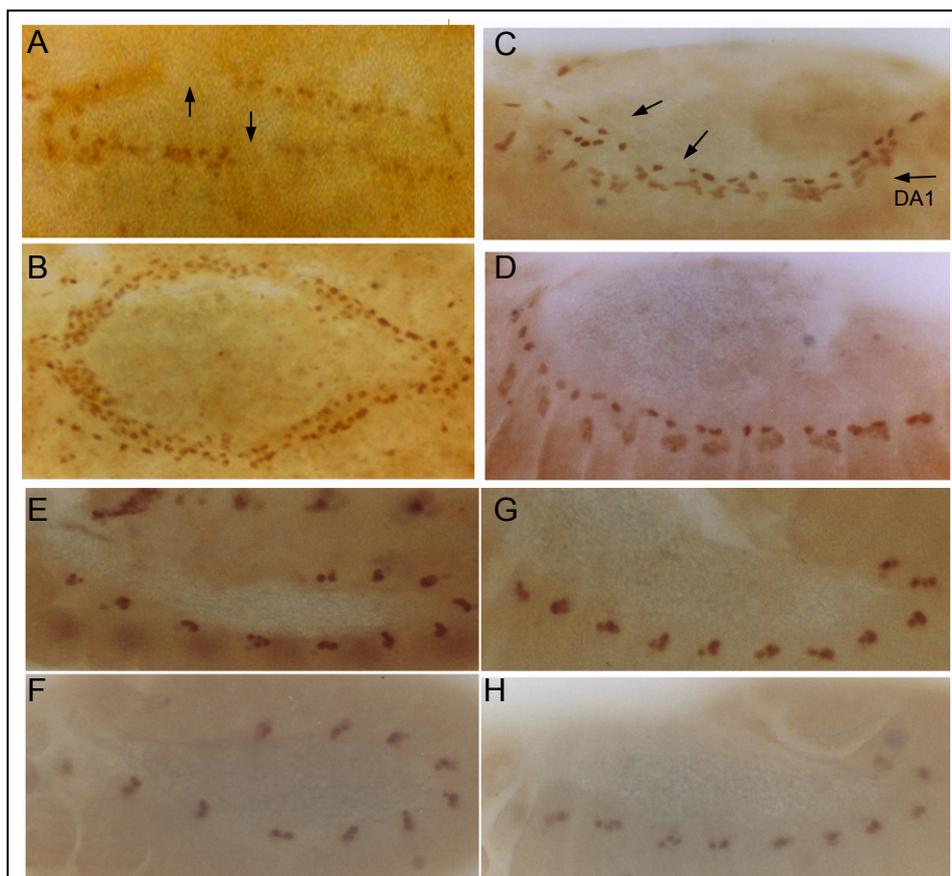
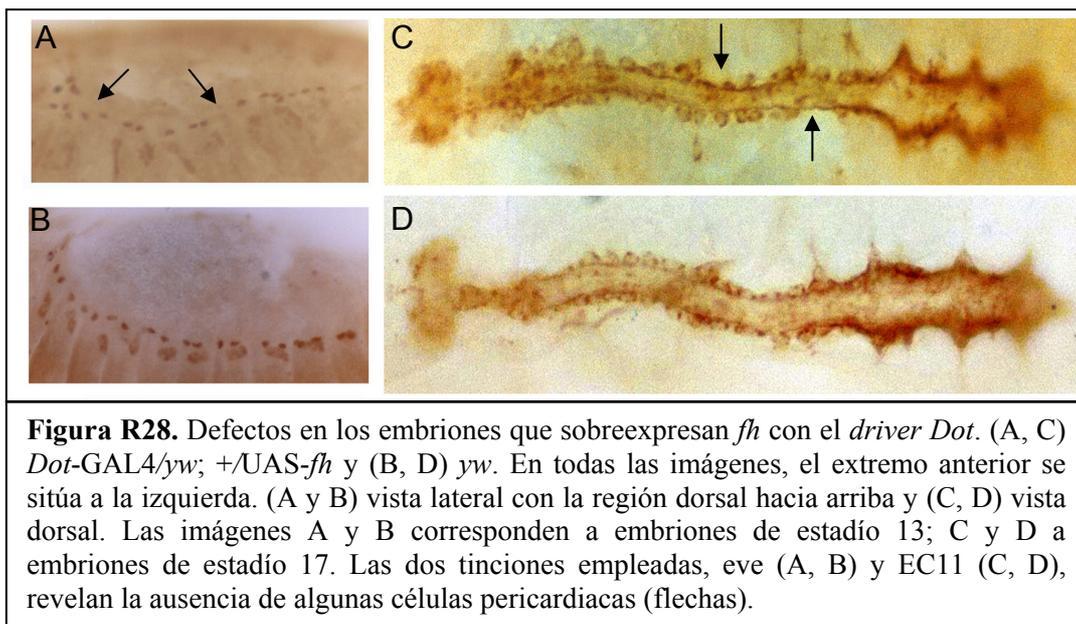


Figura R27. Defectos encontrados en la estructura cardíaca en embriones sobreexpresados con *24B. +/UAS-fh; 24B/+* (A, C, E, G) y *yw* (B, D, F, H). En todas las imágenes, el extremo anterior se sitúa a la izquierda. (A, B) vista dorsal y el resto vista lateral con el extremo dorsal arriba. En embriones de estadio 13, la tinción con *zfh* (A) reveló la ausencia de células cardíacas y pericárdicas, mientras que la tinción con *eve* (C) mostró una disposición irregular de las pericárdicas especialmente en la mitad anterior del embrión. Sin embargo, en estadios anteriores, 11-12, (E, G) no se observó ninguna diferencia respecto al control (F, H).

Ante tales defectos, consideramos interesante emplear una línea GAL4 específica del corazón: la línea *Dot-GAL4*. Se estudiaron los efectos de la sobreexpresión y la interferencia del gen *fh* sobre dicha estructura mediante los anticuerpos: EC11, que marca la matriz extracelular que rodea a las células cardíacas y pericárdicas del tubo cardíaco; y el anticuerpo anti-*eve*, que tiñe un subconjunto de células pericárdicas. Con ambos anticuerpos observamos, de nuevo en los embriones sobreexpresados, algunos huecos a lo largo de la estructura tubular cardíaca debidos a la ausencia de algunas células pericárdicas (*eve*, figura R28-A y EC11, figura R28-C). Estos embriones llegan hasta la fase de pupa en la que se detectó 100% de mortalidad. El embrión de *Drosophila* es capaz de desarrollarse con un corazón afectado, pero la presencia de un órgano funcional es necesaria después de la embriogénesis (Cripps y Olson, 2002). Respecto a los embriones interferidos, no se detectó ninguna anomalía en el corazón, lo cual no implica que el defecto no pueda aparecer en estadios posteriores del desarrollo, dado que también se obtiene 100% letalidad al final de la pupación.



La formación del sistema muscular y el sistema nervioso están íntimamente relacionados, de manera que uno se emplea como soporte del desarrollo del otro. Por ello estudiamos, en los embriones sobreexpresados e interferidos con *24B*, la integridad del SNC, de los axones sensoriales y de los axones motores.

El anticuerpo eve también marca algunas Células Madre Ganglionares y sus neuronas hijas. Con este anticuerpo detectamos, en la sobreexpresión, la ausencia de un grupo de neuronas bien definido, en concreto, del grupo de neuronas EL del lado izquierdo del segmento abdominal A2 (figura R29-A). Dicha asimetría parece tener cierta repercusión ya que, con los anticuerpos 1D4 y 22C10, se identificaron defectos axonales localizados en el mismo hemisegmento abdominal. Estos anticuerpos revelaron la fusión de axones motores ISN contiguos (figura R29-C) y axones sensoriales (figura R29-I). También se apreció la existencia de huecos entre la proyección motora del hemisegmento A2 y la raíz axonal del SNC (figura R29-G). Todos estos defectos axonales conllevan a la ausencia de inervación de algunos músculos de cada hemisegmento, diferentes según a que altura se produzca el defecto. Así por ejemplo, se verán afectados los músculos más dorsales (figura R29-C) o probablemente todos (figura R29-G). Sin embargo, no se encontró ningún defecto en los axones longitudinales del SNC (figura R29-E). En cuanto a los experimentos de interferencia, no encontramos ninguna anomalía significativa al realizar las mismas tinciones.

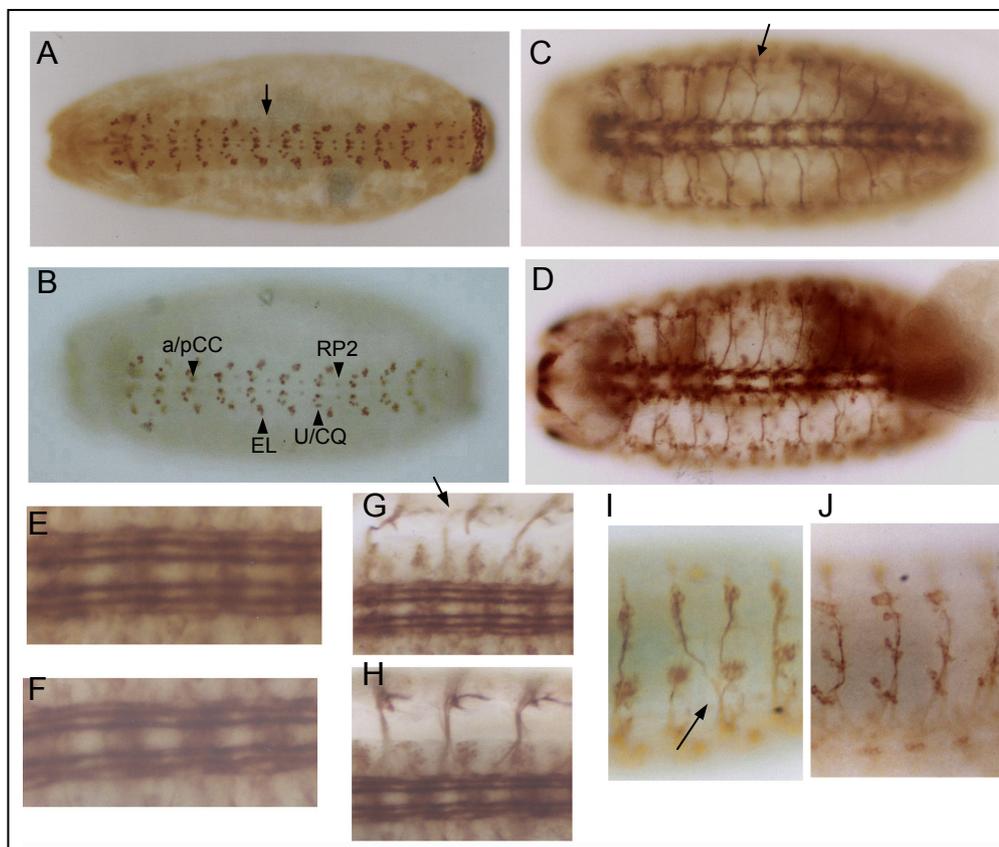


Figura R29. Defectos neuronales y axonales resultantes de la sobreexpresión de *fh* según el patrón mesodérmico de *24B*. Todas las imágenes corresponden a embriones de estadio 16 y en todas, el extremo anterior está situado a la izquierda. (I, J) vista lateral; vista ventral para el resto. *+/UAS-fh; 24B/+* (A, C, E, G, I) y *yw* (B, D, F, H, J). La tinción con eve muestra la ausencia de las células EL del lado izquierdo del segmento A2 (A). Con 1D4 se detectan fusión de axones (C) y pequeñas roturas (G), mientras que no se observó ningún defecto en los axones longitudinales del SNC (E). Defectos parecidos se detectaron con 22C10 en los axones sensoriales (I). En la figura B se han señalado los 6 tipos de Células Madre Ganglionares del SNC: U/CQ, aCC, pCC, EL y RP2.

Con las líneas *24B* y *Dot* se realizaron además los cruces de sobreexpresión e interferencia a temperaturas inferiores. En los cruces de sobreexpresión a 25°C con la línea *24B-GAL4*, se observó sólo un 2-3% de supervivientes en los que se apreció una menor capacidad de caminar, muriendo a los 4-5 días. Respecto a la interferencia a 25°C se mantiene la letalidad en pupa madura observada a 29°C, pero con la presencia de un 10% de supervivientes también con problemas de movilidad, que mueren mayoritariamente a los 8-10 días. Por su parte, a 21°C aumenta bastante el número de supervivientes en ambos casos, 10% en el cruce de sobreexpresión y más del 75% en el caso de la interferencia.

Con *Dot* sólo se repitieron los experimentos a 25°C, obteniéndose una elevada letalidad en estadio de pupa madura, tanto en los cruces de sobreexpresión como en los de interferencia. En la sobreexpresión se observó un número muy reducido de adultos que fue algo mayor en la interferencia.

2.4.3 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas GAL4 de expresión específica en el sistema nervioso.

Se han empleado 14 líneas que expresan la proteína GAL4 en momentos muy diferentes del desarrollo del sistema nervioso (embrión, larva y adulto), en distintos conjuntos de neuronas (sensoriales, cordotonaes, motoras, dopaminérgicas) y en el cerebro.

La tabla R8 reúne todas las líneas, indicándose cuáles han sido los resultados obtenidos en la sobreexpresión y en la interferencia. Tales resultados se expresan, como se ha seguido en todos los puntos, en función de si se ha obtenido o no un porcentaje significativo de adultos en el cruce correspondiente.

Tabla R8. Líneas GAL4 de expresión en sistema nervioso.			
Línea GAL4	Patrón de expresión	Sbrex	ARNi
<i>Ve.Nee</i>	Ectodermo neural	viable	viable
<i>389</i>	SNC embrionario	viable	viable
<i>V55</i>	SNP embrionario y larvario	letal	letal
<i>V85</i>	Todas las neuronas	viable	viable
<i>1407</i>	Neuroblastos en estadios 10 y 11, todas las neuronas del SNP y muchas del SNC.	viable	viable
<i>I(3)31-1[31-1]</i>	Neuronas y neuroblastos en estadios embrionarios 11-12 y SNC y SNP a partir del estadio 13.	viable	viable
<i>elav</i>	Todas las neuronas diferenciadas a partir del estadio 13.	viable	viable
<i>C81</i>	Cerebro y resto del SNC a partir del 3 ^{er} estadio larvario.	viable	viable
<i>c689a</i>	Potente en cerebro y resto del SNC a partir del 3 ^{er} estadio larvario.	viable	viable
<i>neuralized (neur)</i>	Células progenitoras de los precursores de los órganos sensoriales	viable	viable
<i>atonal (ato)</i>	Precursores de los órganos cordotonaes. Ciertos conjuntos de células en los lóbulos del cerebro.	viable	viable
<i>D42</i>	Neuronas motoras a lo largo de todo el desarrollo	viable	viable
<i>4G</i>	Sistema nervioso en embriones tardíos. Algunas neuronas motoras en 3 ^{er} estadio larvario. En los <i>corpora pedunculata</i> de los adultos.	viable	viable
<i>Ddc</i>	Neuronas dopaminérgicas.	viable	viable

Estas líneas se han dividido en 3 grupos, según los resultados fenotípicos obtenidos:

- El primer grupo incluye únicamente la línea con la que hemos obtenido letalidad, *V55-GAL4*.
- El segundo grupo engloba a las líneas *GAL4 I(3)31-1[31-1]* y *C81*, con las que se observa una progenie aparentemente normal, pero con un mayor porcentaje de pupas muertas en el cruce de sobreexpresión en comparación con el cruce control (*I(3)31-1[31-1]* x *yw* o *C81* x *yw*). Dichas pupas presentan siempre un aspecto de retraimiento.
- En el tercer grupo se incluyen el resto de las líneas *GAL4*, con las que prácticamente el 100% de las pupas emergen a adulto.

La descendencia obtenida de los cruces realizados con cada una de las líneas del 2º o 3º grupo, fue examinada a la lupa para observar su morfología externa. Sólo en algunos individuos sobreexpresados o interferidos con la línea *neur-GAL4*, se encontraron ligeras diferencias respecto a individuos control *neur-GAL4/yw*. Tanto en la sobreexpresión como en la interferencia, se aprecia ausencia y/o desplazamiento en la localización de algunas de las macroquetas del *scutelum* (figura R30). También se observó cierta variabilidad en el número de quetas del *notum* pero siempre en la progenie de los tres cruces (control, sobreexpresión e interferencia), por lo que este carácter no aporta ninguna información.

La alteración en las macroquetas escutelares puede relacionarse con la expresión del *driver neur*, concretamente en las células progenitoras de los órganos sensoriales adultos, como son las macroquetas (Jhaveri *et al.*, 2000).

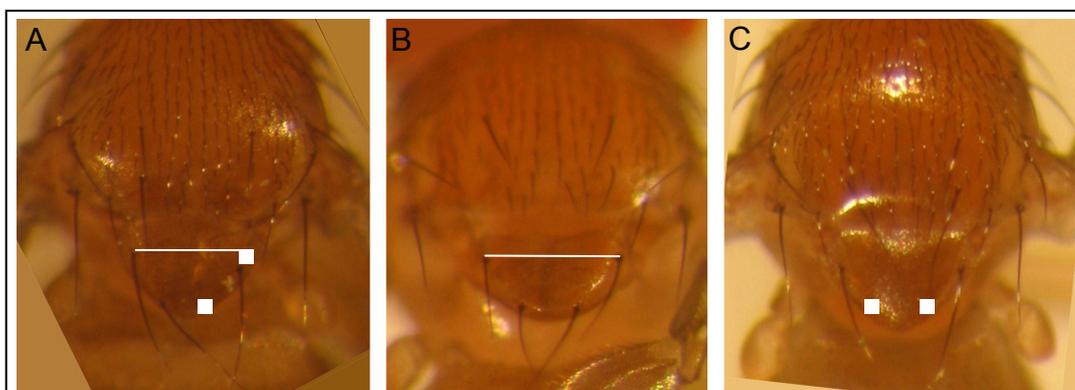


Figura R30. Defectos observados en las macroquetas del *scutelum* al utilizar la línea *neur-GAL4*. (A) Adultos *neur-GAL4/UAS-fh*, se observa ausencia y alteración en la posición de alguna macroqueta. Mediante puntos blancos se marcan las posiciones correctas. (B) Adulto control de genotipo *neur-GAL4/yw*. (C) Adulto *neur-GAL4/UAS-fhIR*, se aprecia la ausencia de las dos macroquetas escutelares inferiores.

Con los adultos obtenidos en los cruces de las líneas del 2º y 3º grupo, se llevaron a cabo además, experimentos de capacidad locomotora y de supervivencia que se describen en el punto 2.4.5.

resultados

Respecto a la línea *V55-GAL4*, los experimentos de sobreexpresión provocaron un 100% de letalidad a los nueve días del inicio del desarrollo, como larva de muy pequeño tamaño, que parece corresponder al primer estadio larvario (figura R31-A y B). Nos planteamos si esta alteración del tamaño podía deberse a una parada del desarrollo o una parada del crecimiento. En *Drosophila*, se puede determinar el estadio de una larva a través de la observación de sus mandíbulas, ya que su grado de curvatura y el número de dientes es directamente proporcional a la edad del individuo. Se extrajeron las mandíbulas de las larvas para su análisis, observando que en las larvas donde se provocó la sobreexpresión del gen *fh*, las mandíbulas correspondían a una larva de tercer estadio (L3) y no a una de primer estadio (L1) (figura R31-D). Por consiguiente, la sobreexpresión produjo una parada del crecimiento, pero no del desarrollo.

Por su parte, en los cruces de silenciamiento del gen *fh* se observó 100% de letalidad en estado de pupa madura (figura R31-C), algunas de las cuales presentaron también un tamaño más pequeño del normal.

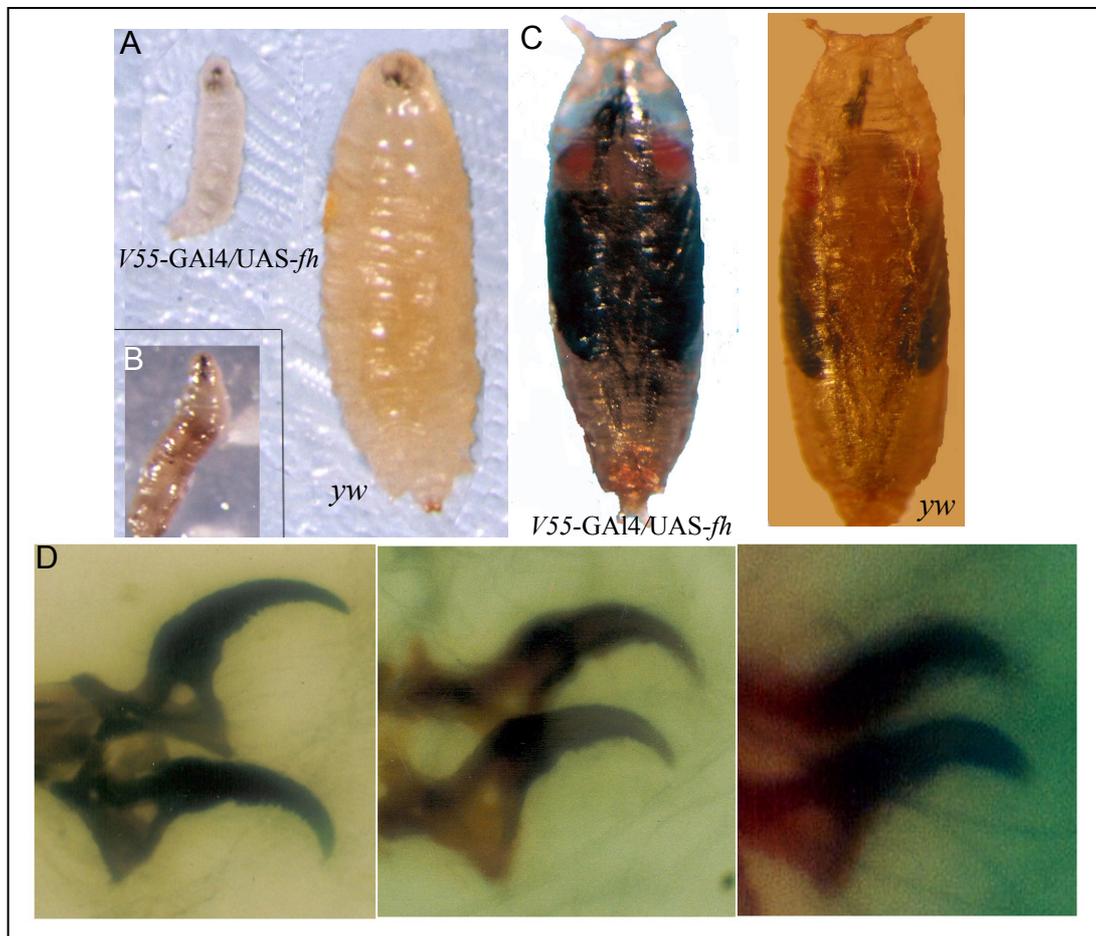
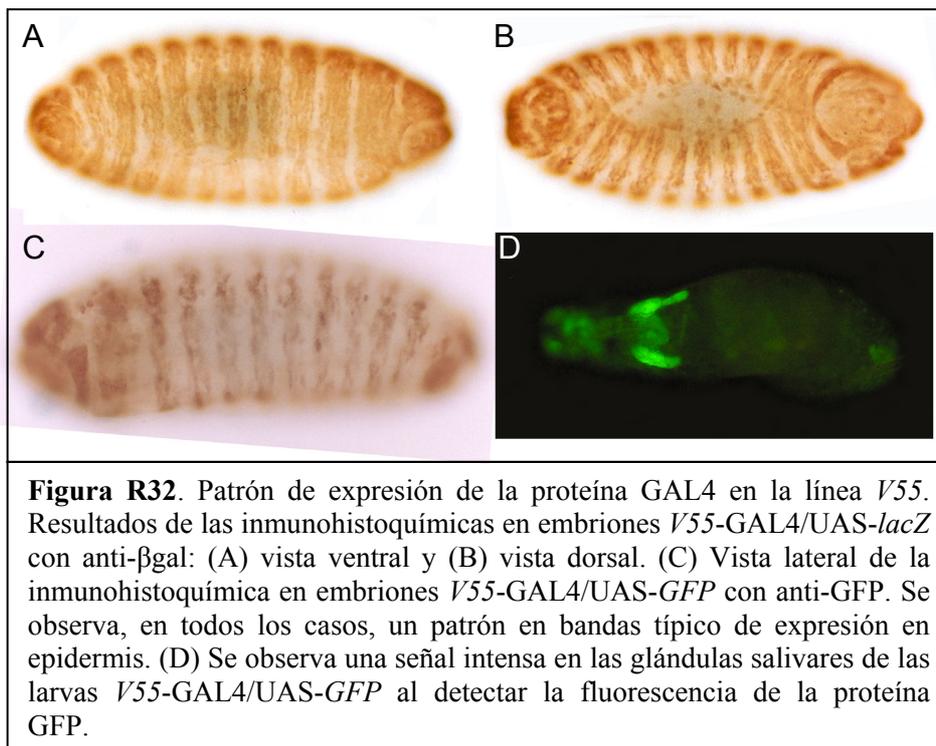
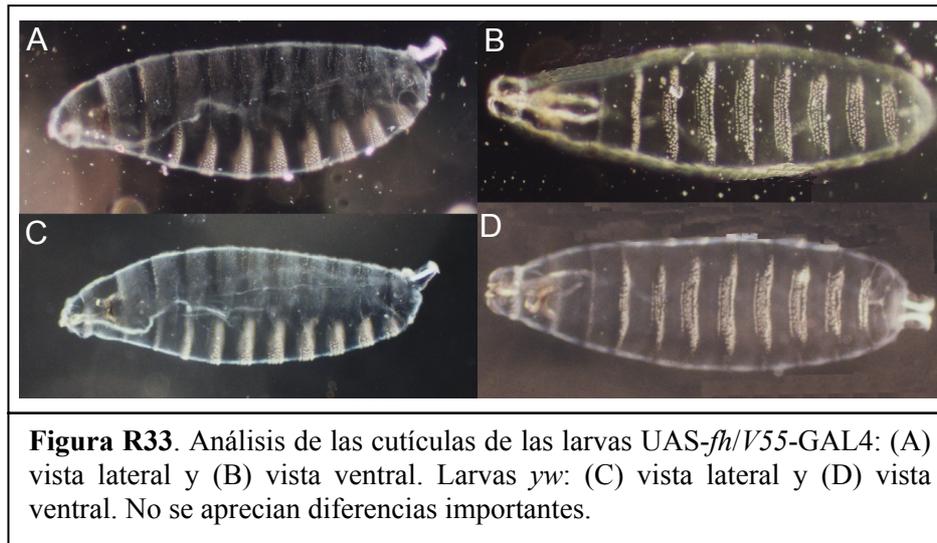


Figura R31. Alteraciones fenotípicas producidas en la sobreexpresión y la interferencia con la línea *V55-GAL4*. (A) Comparación de una larva de pequeño tamaño resultado de la sobreexpresión y una larva control de la misma edad (L3). (B) La larvas sobreexpresadas mueren en este estadio. (C) La interferencia con *V55* provoca letalidad como pupa madura. (D) Mandíbulas de una larva *V55-GAL4/UAS-fh*, una larva control L3 y de una larva control L1 respectivamente. Se observa claramente que las mandíbulas de los individuos sobreexpresados corresponden al estadio larvario L3.

La obtención de larvas de pequeño tamaño en los experimentos de sobreexpresión, nos sorprendió por el hecho de que la línea GAL4 utilizada se expresa teóricamente en el SNP. Se decidió, por tanto, comprobar el patrón de expresión de la línea V55 cruzándola con líneas UAS-*lacZ* y UAS-*GFP* y realizando posteriormente inmunohistoquímica con anticuerpos anti- β gal y anti-GFP. Con ambos anticuerpos se observó un patrón bandeado similar a un patrón de expresión epidérmico (figura R32-A, B, C), aunque en la tinción con anti-GFP se observó también marca en células que podrían formar parte del SNP. Las larvas del cruce con la línea UAS-*GFP* fueron observadas además con luz y filtro adecuados para detectar la emisión de la fluorescencia, encontrándose una señal fuerte en las glándulas salivares (figura R32-D), que no aparece en ninguno de los controles (UAS-*GFP* x *yw*, V55-GAL4 x *yw* y *yw*).



Si el aumento de la dosis génica de *fh* en este patrón epidérmico fuera el responsable de la reducción del tamaño de las larvas sobreexpresadas, se esperaría que aparecieran también defectos en su cutícula. Para ello, se observaron al microscopio óptico las cutículas de larvas V55-GAL4/UAS-*fh*, no detectándose en ningún caso diferencias sustanciales con los controles (figura R33).



Finalmente, y de acuerdo con el patrón descrito en la *flybase* para la línea V55-GAL4 (Tabla R8), se estudió el SNP, así como el SNC, de los embriones V55-GAL4/UAS-*fh* y V55-GAL4/UAS-*fh*IR, con el objetivo de detectar posibles defectos que pudieran explicar el fenotipo de letalidad observado.

En primer lugar, se analizó el SNP de los embriones sobreexpresados e interferidos mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo 22C10. Las tinciones no mostraron ninguna anomalía en los axones sensoriales, pero sí la ausencia de algunos conjuntos ventrales de neuronas sensoriales (figura R34) en los embriones sobreexpresados. En la interferencia, no se detectó ningún defecto a lo largo del desarrollo embrionario, aunque es posible que los defectos puedan aparecer en estadios posteriores del desarrollo.

Para el SNC se utilizaron tres anticuerpos diferentes: anti-ELAV, que marca los núcleos de todas las neuronas del SNC una vez se han diferenciado y algunas neuronas del SNP; BP102, que tiñe la escalera típica del SNC; y 1D4, que permite distinguir los 6 axones centrales del SNC y los axones motores.

Con ELAV no se detecta ninguna diferencia, ya que la señal obtenida es demasiado intensa (figura R35-A y B). Con BP102, la señal es más específica y sí es posible distinguir diferencias. En la sobreexpresión, las neuronas tienen un aspecto menos compacto de lo normal y forman agregados redondeados y algo desorganizados en cada neurómero segmental. Los dos ejes longitudinales parecen más juntos de lo normal, como si las células de la línea media hubiesen desaparecido. También se observa que algunas comisuras transversales son muy finas o no están presentes, y parecen existir defectos de guía axonal en las proyecciones periféricas (figura R35-C y D).

Con el anticuerpo 1D4, se estudió con mayor detalle la integridad y la estructura de los axones longitudinales del SNC. Se observó la ausencia completa de algunos de los axones y en los presentes, se distinguen pequeños cortes en la trayectoria de los mismos, así como un patrón alterado en la marca correspondiente a las comisuras transversales (figura R35-H).

En los embriones de los cruces de interferencia, se detectó con BP-102 una señal de aspecto más difuso que puede implicar menor condensación, sin presentar ninguno de los defectos descritos en los individuos V55-GAL4/UAS-*fh* (figura R35-G). Por su parte, en las inmunohistoquímicas con ELAV y 1D4, no se observó ninguna diferencia respecto a la tinción de embriones control.

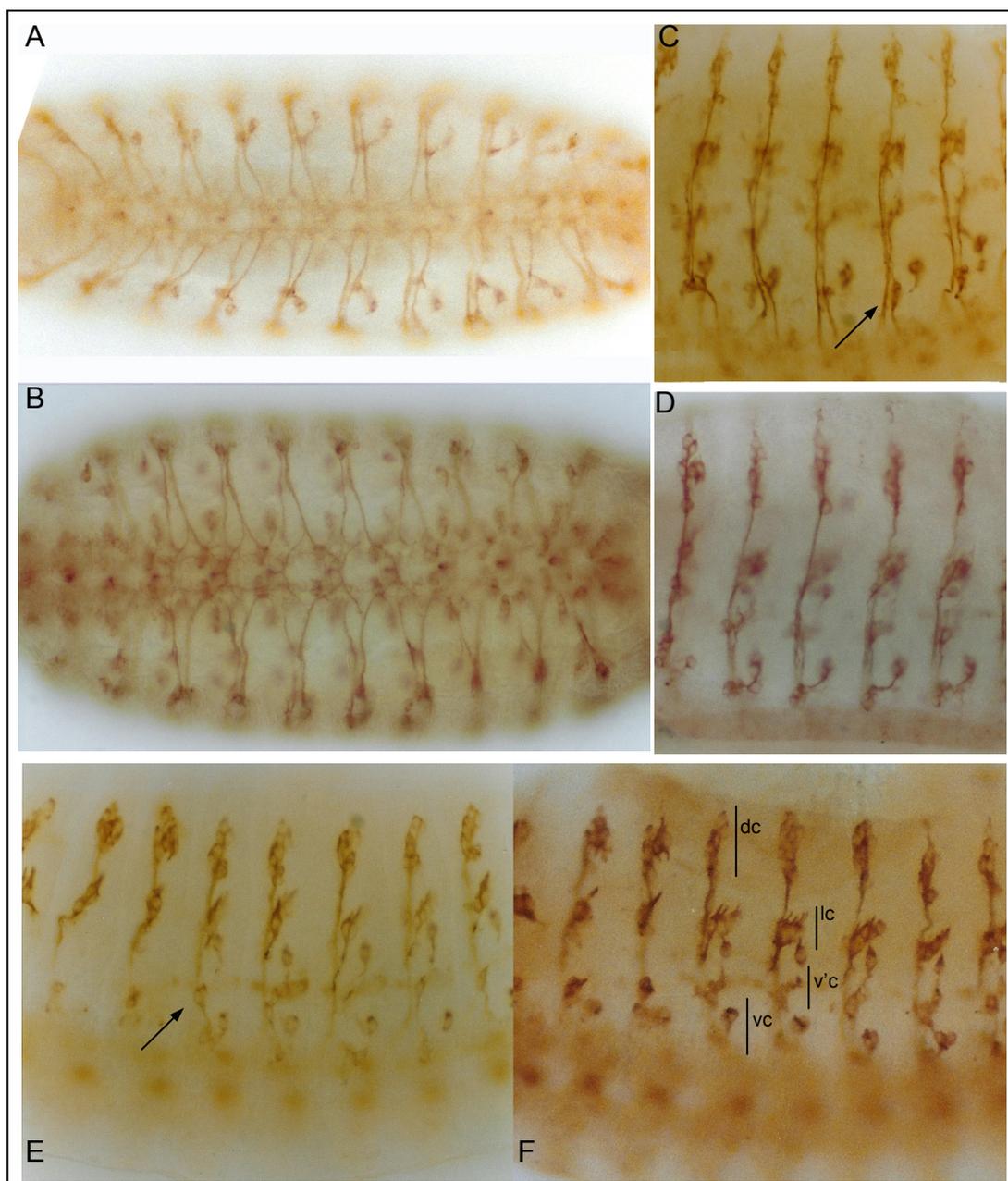


Figura R34. Análisis del SNP de los embriones sobreexpresados con la línea *V55*, con el anticuerpo 22C10. Todas las imágenes corresponden a embriones de estadios 16-17. En todas ellas, el extremo anterior está situado a la izquierda y además en (C, D, E, F) la región dorsal en la parte superior. Embriones *V55-GAL4/UAS-fh* (A, C, E) y *yw* (B, D, F). Vista ventral (A, B). Vista lateral de los axones de los hemisegmentos abdominales A2-A6 (C, D). Vista lateral de los grupos de células sensoriales del SNP de los hemisegmentos abdominales A1-A7 (E, F). En ningún caso se observan diferencias con las tinciones control, a excepción de una posible reducción del número de células sensoriales ventrales (C, E, flechas). En la imagen F, se han señalado los grupos de células sensoriales que se distinguen en cada hemisegmento: dc, conjunto dorsal; lc, conjunto lateral; v'c, conjunto ventral' y vc, conjunto ventral.

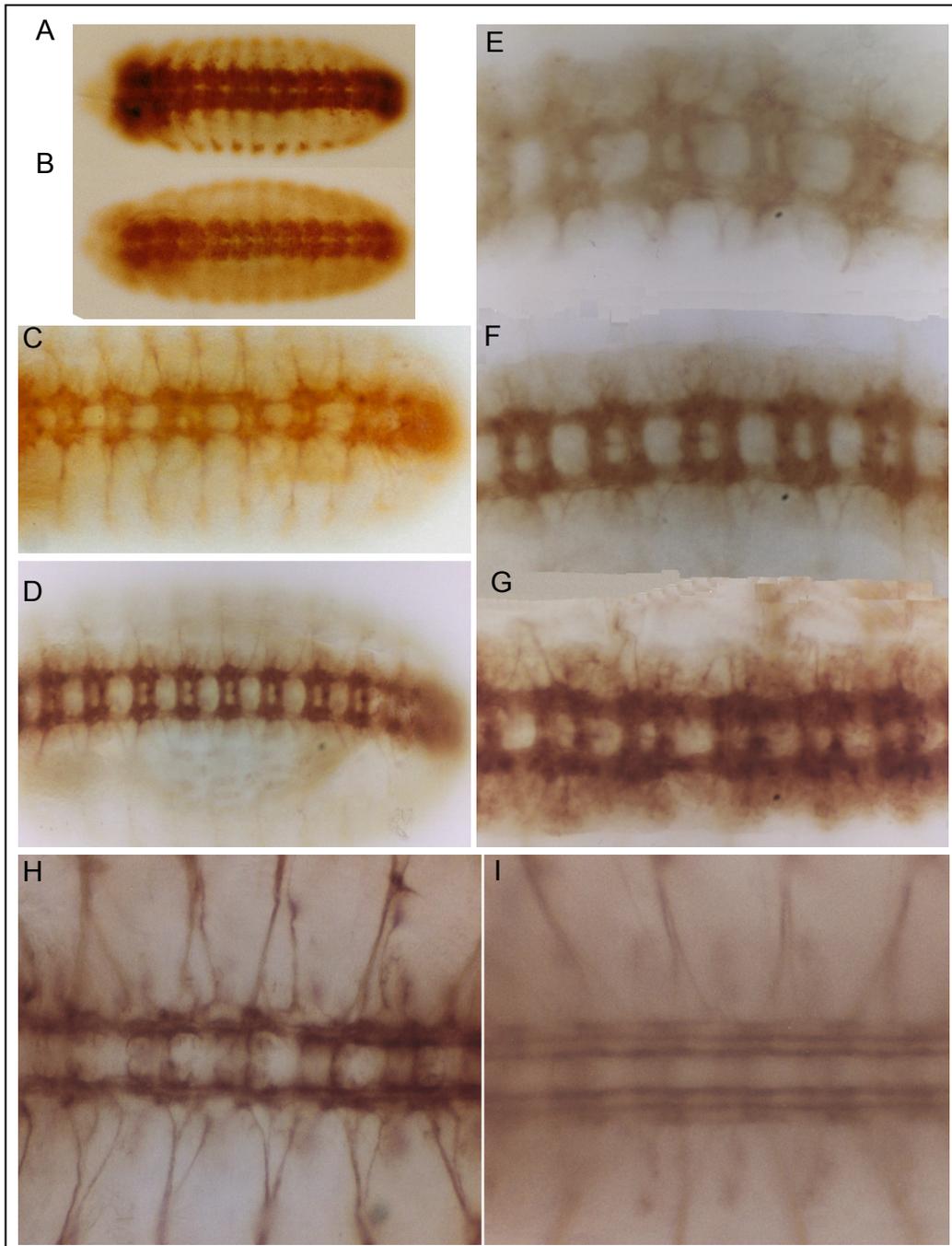


Figura R35. Defectos presentes en el SNC de los embriones sobreexpresados e interferidos con *V55*. En todas las imágenes, el extremo anterior se localiza a la izquierda y todas corresponden a vistas ventrales. *V55-GAL4/UAS-*fh** (A, C, E, H), *V55-GAL4/UAS-*fhIR** (G) y *yw* (B, D, F, I). (A, B) Inmunohistoquímica con anti-ELAV. No se distinguen diferencias. (C, D) Tinción con BP-102. Se observa, en el embrión sobreexpresado, alteraciones importantes en la escalera del SNC, afectando a los axones longitudinales, a las comisuras transversales e incluso a las proyecciones periféricas. (E, F) Ampliación de la zona central de la escalera en embriones sobreexpresados y controles respectivamente. En la interferencia (G), la imagen nos muestra una estructura menos afectada que en la sobreexpresión, pero los neurómeros están menos compactos que en el control. (H, I) Tinción con anticuerpo 1D4. Se puede observar en los embriones sobreexpresados la ausencia, a cada lado, de uno de los axones longitudinales y múltiples microrroturas en los restantes.

De nuevo con la línea *V55-GAL4*, se realizaron los cruces a temperaturas inferiores con resultados similares a los descritos para el resto de líneas, es decir, 100% de letalidad en el caso de los experimentos de sobreexpresión a 25°C y la presencia de pocos adultos a 21°C. Mientras que en el caso de la interferencia se observan muchos más adultos a 21°C y una letalidad casi total en pupa madura a 25°C.

2.4.4 Mutantes funcionales obtenidos a partir de líneas *GAL4* de expresión en el adulto.

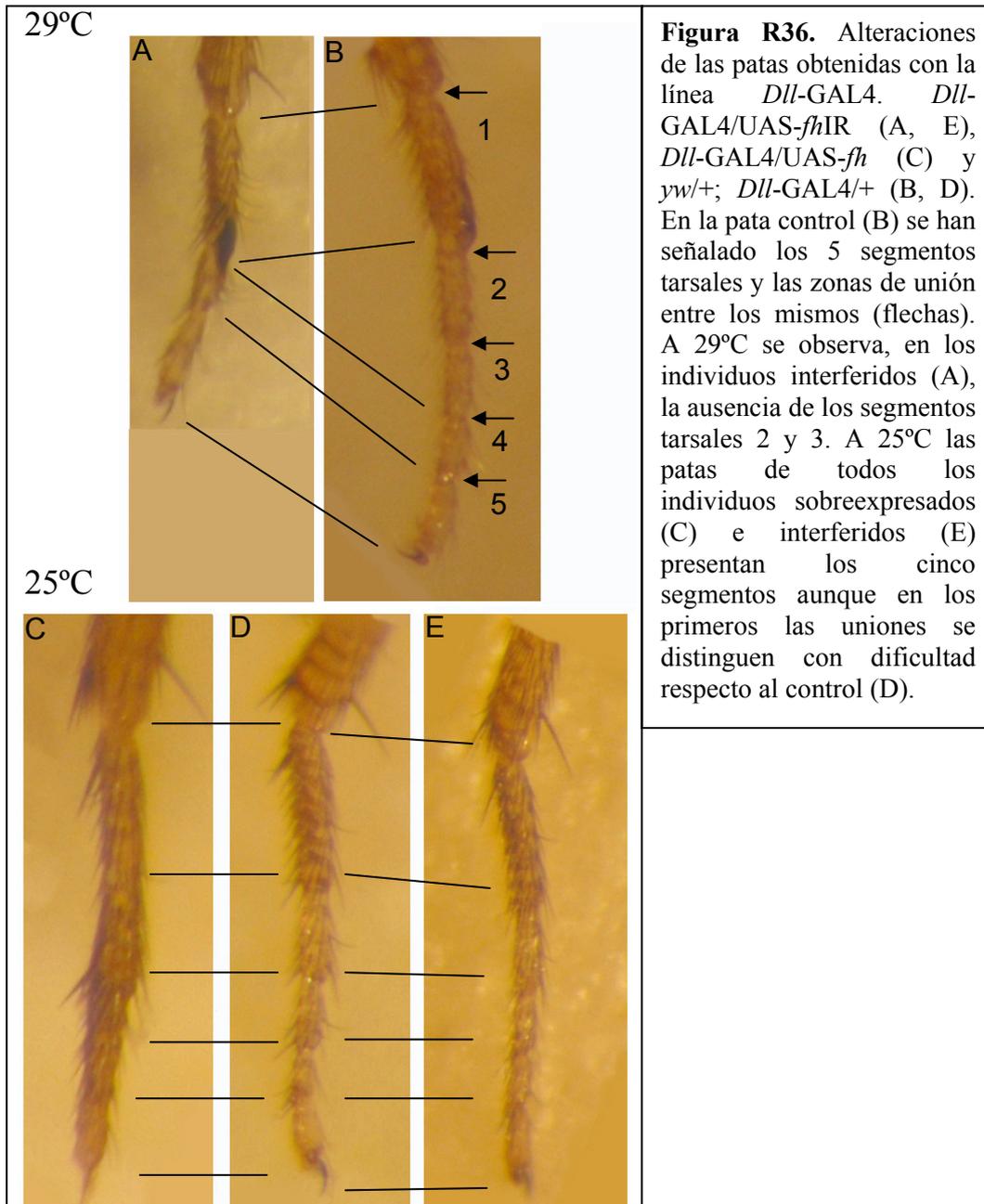
Se utilizaron 9 líneas *GAL4* de expresión restringida a determinadas estructuras del adulto (alas, patas, ojos, etc), con las que se realizaron los cruces correspondientes con las líneas *yw*, *UAS-fh* y *UAS-fhIR*. La obtención de una alteración fenotípica, en alguno de los cruces de sobreexpresión o interferencia, permitiría disponer de un marcador de enorme utilidad para llevar a cabo futuros rastreos genéticos de supresores e intensificadores de la función del gen *fh* y así, detectar proteínas con las que *fh* podría interactuar.

La Tabla R9 muestra las líneas utilizadas, junto con una referencia bibliográfica del uso de cada una de ellas. Los resultados se han presentado en función de si se obtiene el mismo fenotipo que en el cruce control (-) o se ha detectado algún cambio en la estructura indicada (+).

Tabla R9. Líneas <i>GAL4</i> de expresión en estructuras del adulto.			
Línea <i>GAL4</i>	Patrón de expresión en adulto	Sbrex	ARNi
<i>decatentaplegic (dpp)</i>	Ala (Morimura <i>et al.</i> , 1996)	-	-
<i>engrailed (en)</i>	Ala (Hama <i>et al.</i> , 1990)	-	-
<i>patched (ptc)</i>	Ala y <i>notum</i> (Hinz <i>et al.</i> , 1994)	-	-
<i>apterous (ap)</i>	Ala, <i>notum</i> , <i>scutelum</i> y pata (Milan <i>et al.</i> , 1997)	-	-
<i>klumpfuss (klu)</i>	Ala, <i>notum</i> , <i>scutelum</i> y pata (Klein y Campos-Ortega 1997)	-	-
<i>distalless (Dll)</i>	Pata (Gorfinkiel <i>et al.</i> , 1997)	+	+
<i>eyeless (ey)</i>	Ojo (Nagai <i>et al.</i> , 2003)	-	-
<i>ninaE.GMR</i>	Ojo (Enerly <i>et al.</i> , 2002)	-	-
<i>sevenless (sev)</i>	Ojo (Rintelen <i>et al.</i> , 2003))	-	-

+, alteración fenotípica; -, estructura normal

Como puede observarse en la Tabla R9, sólo se observaron alteraciones evidentes con el *driver Dll*. Cuando los experimentos se realizaron a 29°C, la sobreexpresión del gen *fh* indujo la aparición de 100% de letalidad en estadio de pupa madura. Pero en los cruces de interferencia se obtuvieron numerosos descendientes observándose que todos los individuos *Dll-GAL4/UAS-fhIR* mostraban ausencia de los segmentos tarsales 2 y 3 del primer par de patas (figura R36-A). A 25°C se pueden observar los 5 segmentos tarsales típicos de la pata de *Drosophila*, tanto en los individuos sobreexpresados como en los interferidos (figura R36-E), aunque en los primeros son difíciles de distinguir las uniones entre los mismos (figura R36-C).



Con la línea *sev*-GAL4 no se detectó ninguna anomalía morfológica en los ojos de los individuos sobreexpresados o interferidos. La línea *GMR*-GAL4 presenta *per se* un fenotipo de ojo rugoso (Freeman, 1996), por lo que no se pudieron identificar diferencias macroscópicas entre los ojos de la descendencia del cruce control y de los cruces de sobreexpresión y de interferencia. Como en el departamento estaba puesta a punto la metodología de análisis de retinas, se decidió estudiar las retinas de la descendencia de los cruces con ambas líneas GAL4, en individuos de 7 días, por si se detectaba algún defecto a nivel microscópico.

Con la línea *sev*-GAL4, no se observó ninguna anomalía en ningún caso (figura R37-A y B). Por su parte, con la línea *GMR*, las retinas del cruce control ya no presentan la estructura hexagonal normal de los omatidios (figura R37-C) y se observa en ellas una evidente desorganización que también aparece en los adultos interferidos (figura R37-E) siendo más intensa en los individuos sobreexpresados (figura R33-D).

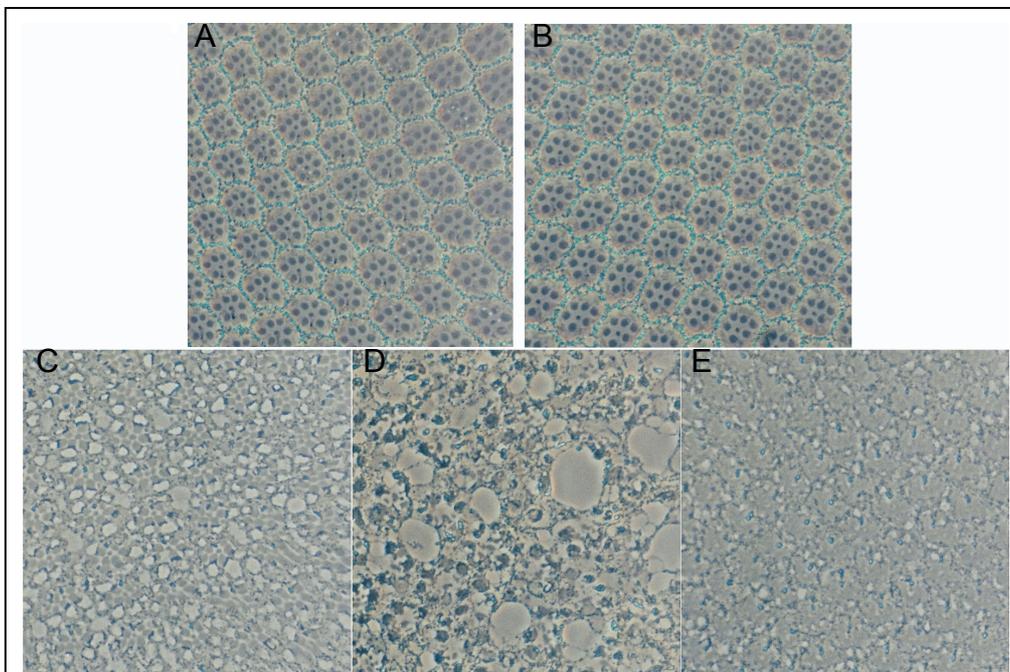


Figura R37. Análisis microscópicos de las retinas de los individuos con expresión alterada de *fh* con *sev*-GAL4 y *GMR*-GAL4. Con *sev*-GAL4 no se observa ninguna diferencia entre las moscas control (A) y las sobreexpresadas (B). Con *GMR*-GAL4, se observa ausencia de fotorreceptores y desorganización de los omatidios en las retinas tanto de los individuos control (C) como de los interferidos (E). En los individuos sobreexpresados (D) se distingue un mayor nivel de degradación.

2.4.5 Análisis de la capacidad locomotora y de la supervivencia en adultos.

Cuando en los cruces de sobreexpresión e interferencia, con líneas GAL4 de expresión en músculo y sistema nervioso, se obtuvo una descendencia aparentemente normal, ésta fue sometida a dos estudios diferentes (sección 8 de materiales y métodos):

- **Un test de supervivencia.**
- **Un test de comportamiento locomotor**, concretamente, un test de escalada que nos permitiría descubrir posibles daños neuronales y musculares.

Los resultados fueron similares para las dos réplicas que se llevaron a cabo de cada cruce con la misma línea GAL4, por lo que se presentan únicamente los de una de ellas.

En todas las representaciones gráficas, el rombo azul corresponde al cruce control (GAL4 x *yw*), el cuadrado rojo al cruce de sobreexpresión (GAL4 x UAS-*fh*) y el punto verde al de interferencia (GAL4 x UAS-*fhIR*).

A-Test de supervivencia.

Se ha contabilizado el número de individuos supervivientes cada dos días, a lo largo de todo el experimento.

Para cada línea GAL4, se muestra la representación gráfica de los resultados y una tabla con el valor medio de supervivientes obtenido para cada genotipo, junto con la desviación estándar que se ha tomado como error.

Las diferentes líneas se han dividido en cinco grupos, según el patrón de expresión de la proteína GAL4: musculatura a lo largo del desarrollo, musculatura en el adulto, sistema nervioso, SNC y SNP.

A-1. Líneas de expresión en músculo visceral o somático a lo largo del desarrollo.

La línea *5053A* se describe inicialmente como de expresión embrionaria en músculos longitudinales, pero tiene sentido analizar la progenie adulta de esta línea porque Klapper (2000) encuentra expresión de la proteína GAL4 en la musculatura visceral a lo largo del desarrollo. Como puede observarse en figura R38, en el caso de la línea *5053A*, desde los primeros días tras la emersión de los adultos, la capacidad de supervivencia disminuye más en los individuos sobreexpresados e interferidos que en los controles. En el caso de la línea *MHC*, este efecto sólo se produce en los embriones sobreexpresados. Por lo tanto, los resultados muestran que la alteración de la expresión de *fh*, en la musculatura somática o visceral de manera continuada desde estadios post-embriónicos, tiene un pequeño efecto negativo sobre la capacidad de supervivencia de los adultos.

Tabla R10. Valores medios de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en músculo a lo largo del desarrollo.

Línea GAL4	yw (%)	UAS- <i>fh</i> (%)	UAS- <i>fhIR</i> (%)
<i>5053A</i>	91,00 ± 3,28	76,89 ± 4,59	77,88 ± 5,46
<i>MHC</i>	83,26 ± 2,90	70,09 ± 4,79	86,92 ± 4,71

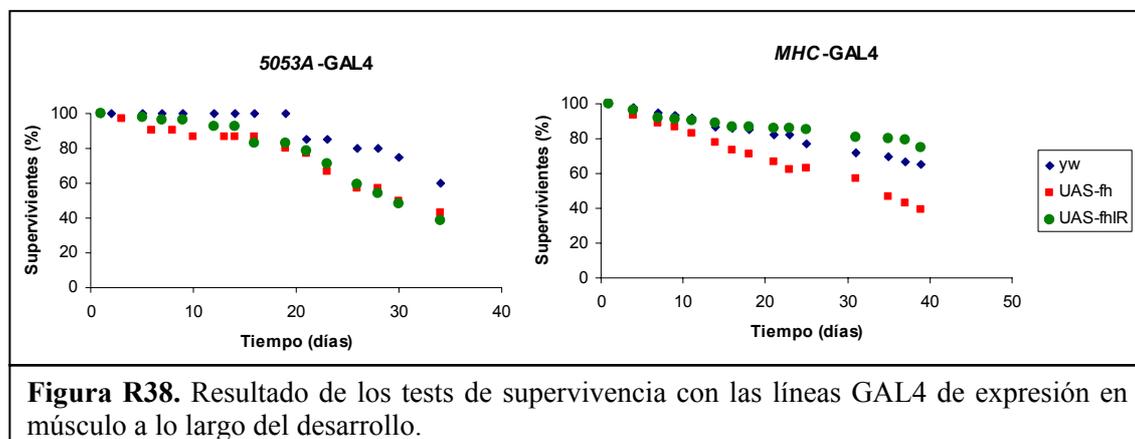


Figura R38. Resultado de los tests de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en músculo a lo largo del desarrollo.

A-2. Líneas de expresión en la musculatura adulta.

En el caso de las líneas GAL4 de expresión en la musculatura adulta, en la figura R39 y la Tabla R11 se puede observar que se han obtenido diferencias con la línea *SG29.1* y algo menores con la línea *act88F*-GAL4. Es decir, tanto la sobreexpresión como la interferencia de *fh* en los músculos indirectos del vuelo (IFM), o sus precursores durante la metamorfosis, disminuyen la capacidad de supervivencia de *D. melanogaster*. El efecto más acusado en la línea *SG29.1*, sobre todo en el cruce de sobreexpresión, puede deberse a la expresión de este *driver* en ciertos dominios del SNP (Ayyub *et al.*, 2005). En el caso de *1151*-GAL4, las diferencias son escasas y sólo a partir del día 22 se aprecia, en los individuos sobreexpresados, un ligero aumento de la mortalidad, sin que ello afecte al valor medio.

Tabla R11. Valores medios de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en la musculatura adulta.

Línea GAL4	<i>yw</i> (%)	UAS- <i>fh</i> (%)	UAS- <i>fhIR</i> (%)
<i>1151</i>	77,78 ± 5,90	78,85 ± 10,02	85,95 ± 7,515
<i>act88F</i>	91,96 ± 1,14	82,38 ± 6,47	78,81 ± 5,59
<i>SG29.1</i>	87,27 ± 6,76	42,70 ± 15,42	72,72 ± 11,7

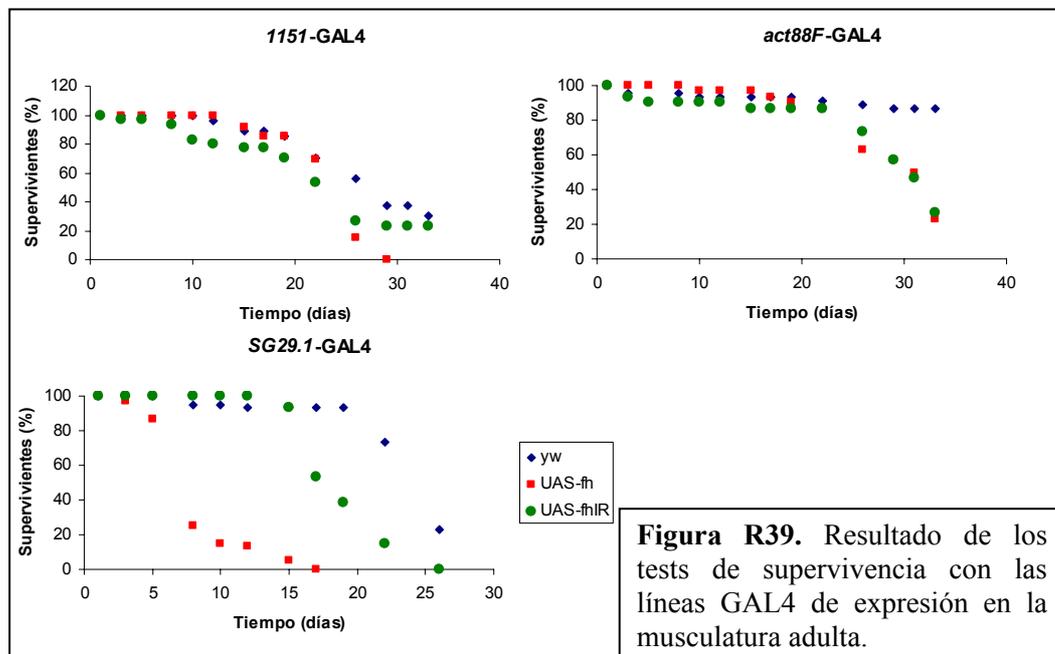


Figura R39. Resultado de los tests de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en la musculatura adulta.

A-3. Líneas de expresión en todo el sistema nervioso.

Las gráficas (figura R40) y el valor medio de supervivientes (Tabla R12) indican que la interferencia de *fh* en el patrón de expresión de *elav*-GAL4 provoca algún efecto sobre la capacidad de supervivencia de los individuos. No se realizaron estudios con los individuos sobreexpresados con *elav*, por problemas en el desarrollo del cruce correspondiente. La alteración con las otras dos líneas parece no tener ningún efecto, al contrario de lo que se esperaría, al menos con la línea de expresión en ectodermo neural (*Ve.NEE*), por ser una línea de expresión muy temprana en el desarrollo embrionario.

Tabla R12. Valores medios de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión general en el sistema nervioso.

Línea GAL4	<i>yw</i> (%)	UAS- <i>fh</i> (%)	UAS- <i>fhIR</i> (%)
<i>Ve.NEE</i>	89,94 ± 1,87	96,45 ± 1,18	91,84 ± 2,18
<i>elav</i>	97,06 ± 1,2	-----	82,88 ± 5,51
<i>V85</i>	82,31 ± 1,20	87,80 ± 2,34	93,56 ± 2,01

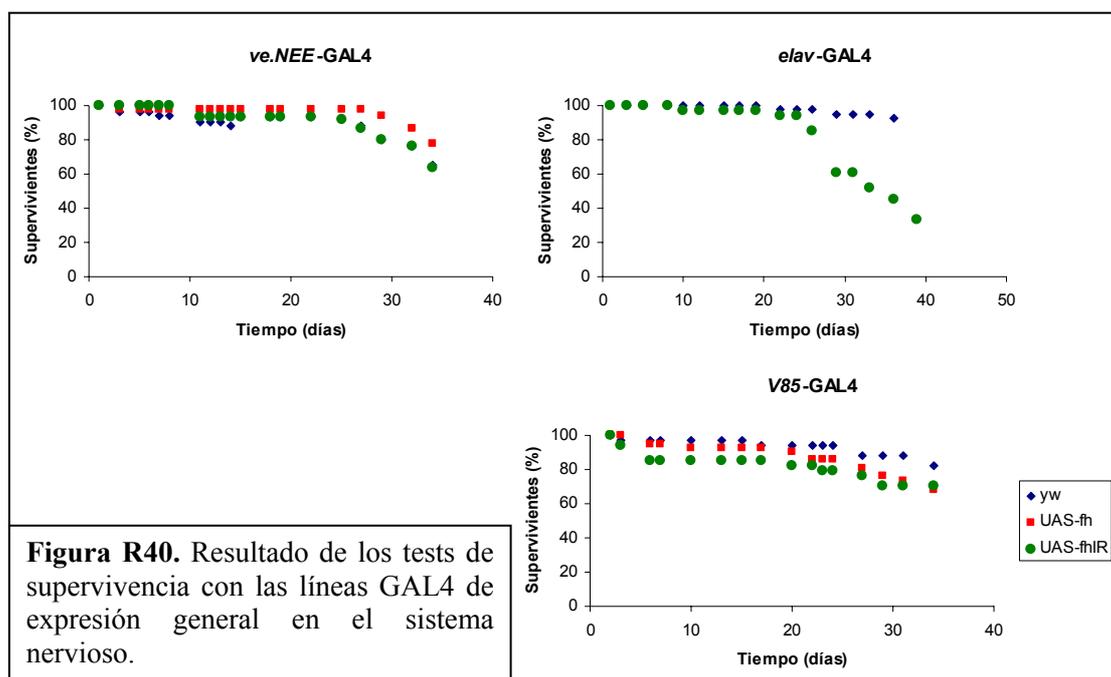


Figura R40. Resultado de los tests de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión general en el sistema nervioso.

A-4. Líneas de expresión en el SNC.

Tal y como se puede apreciar en la Tabla R13 y en la figura R41, en el caso de las líneas GAL4 de expresión en el SNC embrionario (*389*), larvario (*c698a*) y del adulto (*c698a* y *Ddc*), prácticamente no existen diferencias entre los cruces control y los cruces de sobreexpresión e interferencia. Aunque en algunas líneas (*C81* y *389*), en los primeros días se produce una disminución de la capacidad de supervivencia de los individuos sobreexpresados e interferidos, sin embargo, posteriormente y a lo largo de todo el experimento mantienen una tendencia semejante a los individuos control. Estos resultados apoyan que la función de *fh* en el SNC no debe ser demasiado crítica.

Tabla R13. Valores medios de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en el SNC.

Línea GAL4	<i>yw</i> (%)	UAS- <i>fh</i> (%)	UAS- <i>fhIR</i> (%)
<i>389</i>	87,66 ± 3,31	88,60 ± 3,27	75,50 ± 3,05
<i>Ddc</i>	91,14 ± 1,34	89,82 ± 1,77	93,51 ± 1,41
<i>c698a</i>	92,11 ± 2,16	90,09 ± 2,06	92,19 ± 1,97
<i>C81</i>	90,26 ± 3,03	74,54 ± 3,37	64,57 ± 4,03

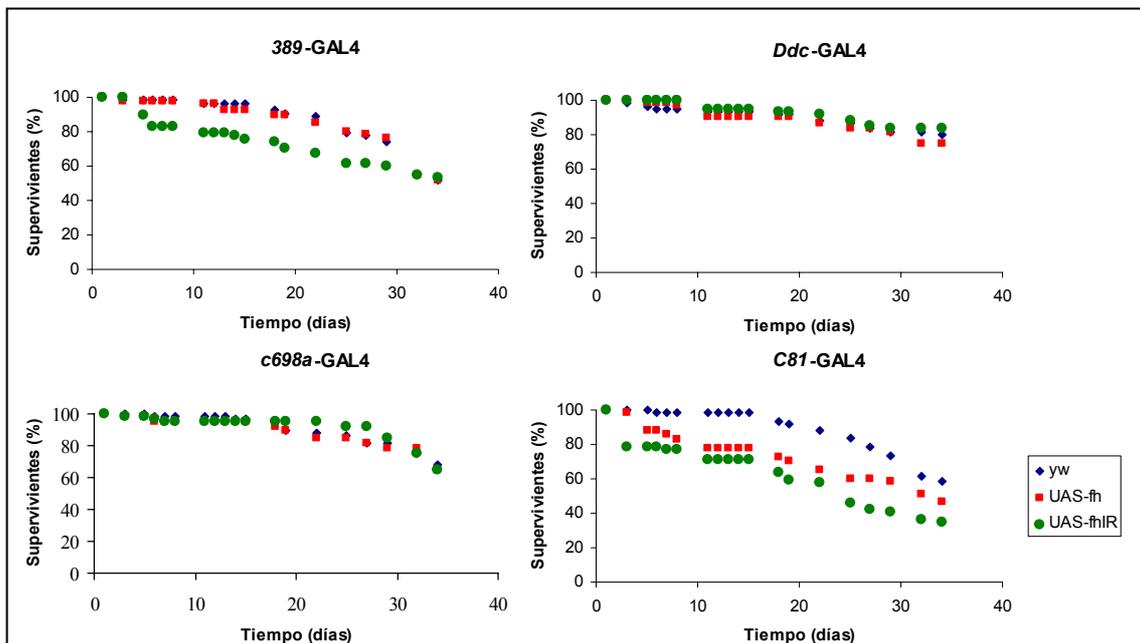


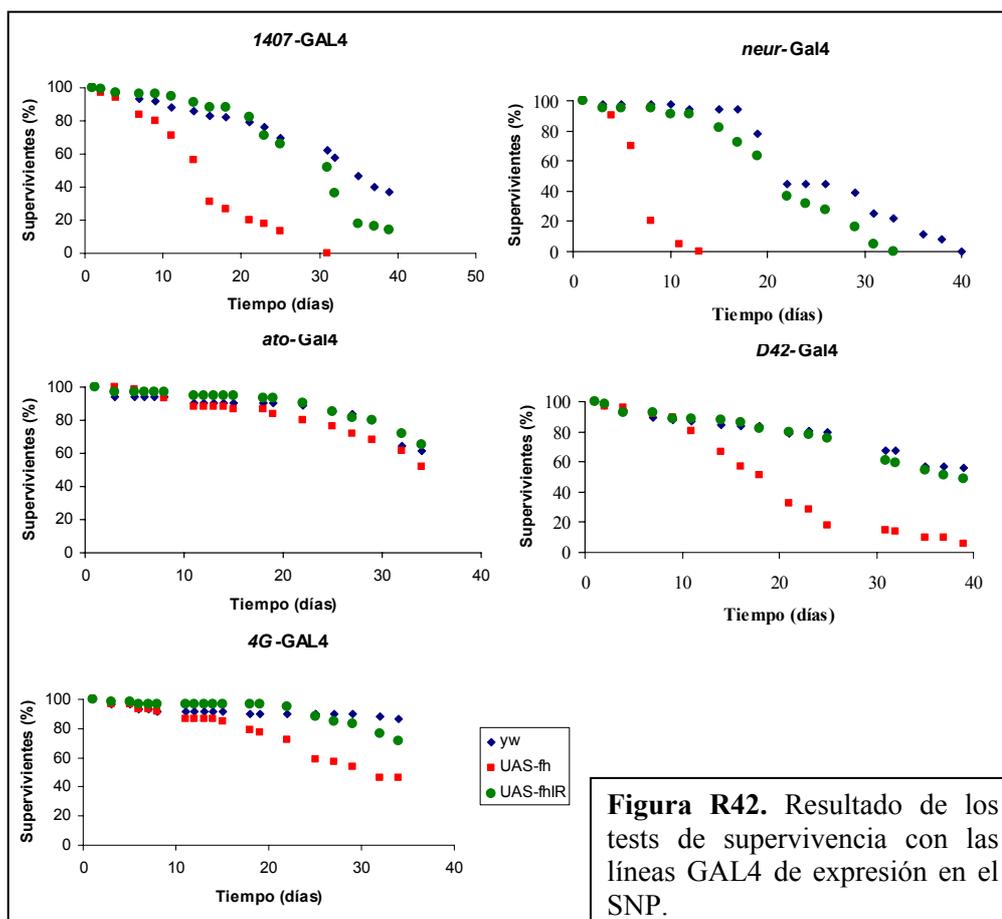
Figura R41. Resultado de los tests de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en el SNC.

A-5. Líneas de expresión en el SNP.

Contrariamente a lo observado en las líneas GAL4 de expresión específica en el SNC, en el caso de las líneas de expresión en el SNP, se observan claras diferencias (figura R42 y Tabla R14) entre los cruces control y los de sobreexpresión de *fh* en neuronas indiferenciadas del SNP (*1407*), en progenitores de órganos sensoriales del adulto (*neur*) y en las neuronas motoras (*D42* y *4G*). En el caso de la interferencia, sólo se observa una disminución de la capacidad de supervivencia en las líneas de sistema sensorial (*neur* y *1407*). Sin embargo, cuando la alteración es específica en los órganos cordotonales (*atonal*) no se observa disminución ni en la sobreexpresión ni en la interferencia, sugiriendo que el papel del gen *fh* no debe ser tan importante en los órganos con función sensorial tensorreceptora.

Tabla R14. Valores medios de supervivencia con las líneas GAL4 de expresión en el SNP.

Línea GAL4	<i>yw</i> (%)	UAS- <i>fh</i> (%)	UAS- <i>fhIR</i> (%)
<i>1407</i>	75,82 ± 4,94	53,20 ± 10,05	70,80 ± 7,63
<i>neur</i>	81,94 ± 6,72	47,50 ± 18,15	73,48 ± 7,86
<i>ato</i>	84,47 ± 2,27	87,91 ± 3,06	90,44 ± 2,17
<i>D42</i>	79,63 ± 3,39	50,69 ± 8,78	77,96 ± 4,07
<i>4G</i>	91,84 ± 0,72	78,49 ± 4,03	92,81 ± 1,83



B-Test de comportamiento locomotor.

El estudio del comportamiento locomotor se ha realizado mediante un test de escalada en que se ha contado el número de moscas que, tras 18s, quedan por debajo de una altura de 10cm.

Tomando como modelo el trabajo de Parkes *et al.* (1998), las medias y las varianzas de cada conjunto de datos fueron sometidas a un test de ANOVA de una vía, mediante el paquete estadístico SPSS v.12, para determinar la existencia de diferencias significativas entre los resultados de los cruces con cada línea GAL4. Se tomó como indicativo de la existencia de significación un P valor por debajo de 0,05. Cuando el valor de P resultó significativo, se realizaron análisis *a posteriori* mediante el test de Student-Newman-Keuls (SNK) para descubrir donde residían las diferencias en cada caso.

Para cada línea GAL4 se muestra la representación gráfica de los resultados, con el valor de P obtenido con el ANOVA de una vía y, en su caso, las tablas del test de Student-Newman-Keuls.

Las diferentes líneas GAL4 se han dividido en los mismos cinco grupos que en los experimentos de supervivencia.

B-1. Líneas de expresión en músculo a lo largo del desarrollo.

No se han detectado diferencias en la capacidad de escalada entre los cruces control y los de sobreexpresión e interferencia con las líneas *5053A-GAL4* y *MHC-GAL4*. Esto indica que la alteración del gen *fh* en la musculatura sea visceral o somática, en estadios posteriores a su diferenciación, no tiene ningún efecto sobre la capacidad locomotora de los individuos.

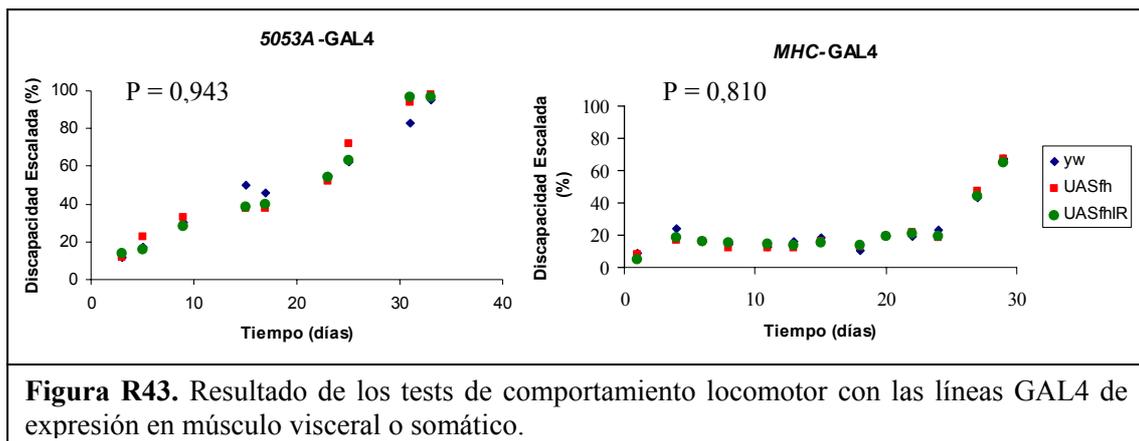


Figura R43. Resultado de los tests de comportamiento locomotor con las líneas GAL4 de expresión en músculo visceral o somático.

B-2. Líneas de expresión en la musculatura adulta.

Sólo se encontraron diferencias significativas ($P = 0,007$) para el caso de la sobreexpresión con la línea *SG29.1* (figura R44). La expresión detectada en parte del SNP por Ayyub *et al.* (2005) para la línea *SG29.1* puede ser la causa del resultado diferente obtenido con las dos líneas de expresión en los IFM (*SG29.1* y *act88F*). El test SNK muestra que para la línea *SG29.1* no existen diferencias entre el cruce control y el de interferencia, pero que ambos sí que presentan diferencias significativas con el de la sobreexpresión. Además, se ha observado, aunque sin cuantificar los resultados, que los individuos sobreexpresados con *SG29.1-GAL4* y *act88F-GAL4* muestran una capacidad de vuelo reducida frente a los controles.

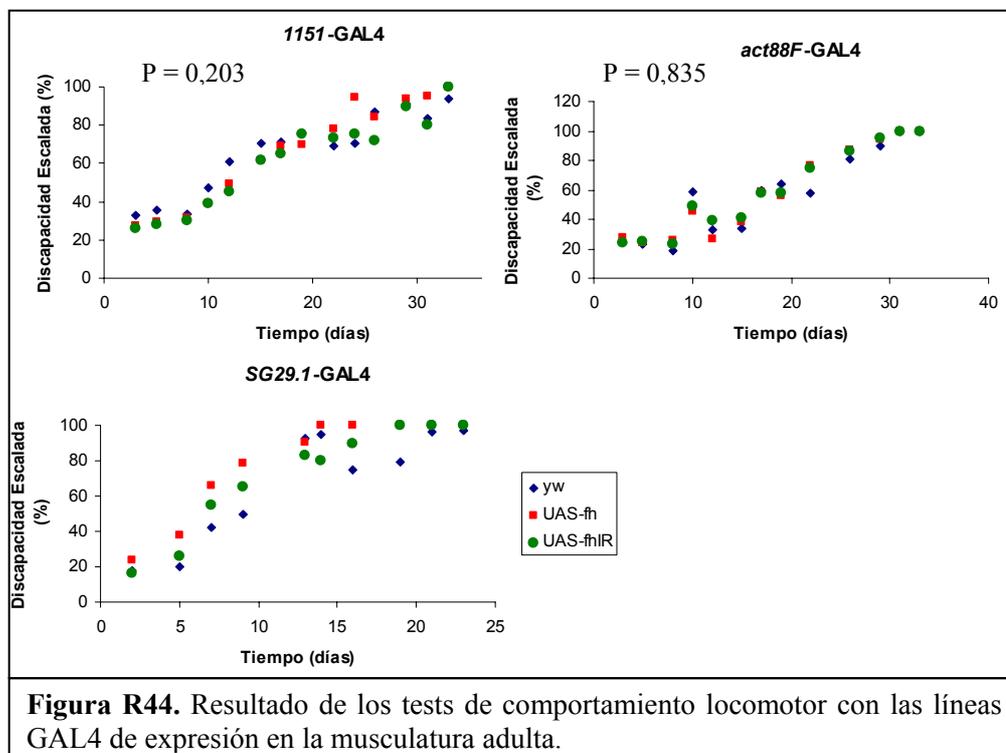


Figura R44. Resultado de los tests de comportamiento locomotor con las líneas GAL4 de expresión en la musculatura adulta.

SG29.1-GAL4		P= 0,007	
Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
yw	70	,5599	
UAS-fhIR	70	,5932	
UAS-fh	70		,7084
Sig.		,494	1,000

B-3. Líneas de expresión en todo el sistema nervioso.

Para este conjunto de 4 líneas GAL4, sólo se han detectado diferencias estadísticamente significativas en el caso de las líneas *elav* y *I(3)31-1[31-1]*, con un valor de $P = 0$ en ambos casos. En estos dos casos, el test de Student-Newman-Keuls nos muestra que existen diferencias entre los tres genotipos de cada cruce. Es decir, un incremento del gen *fh*, según estos dos patrones, afecta a la capacidad locomotora de las moscas de manera diferente a como le afecta la ausencia de la misma y ambos comportamientos son, a su vez, diferentes a la capacidad de escalada en condiciones normales. Con la línea *elav*-GAL4, la discapacidad sigue la secuencia: sobreexpresión > interferencia > control. Sin embargo, con la línea *I(3)31-1[31-1]*, las moscas interferidas presentan una menor discapacidad de escalada que las sobreexpresadas pero ambas muestran, inesperadamente, mayor capacidad locomotora que los individuos control.

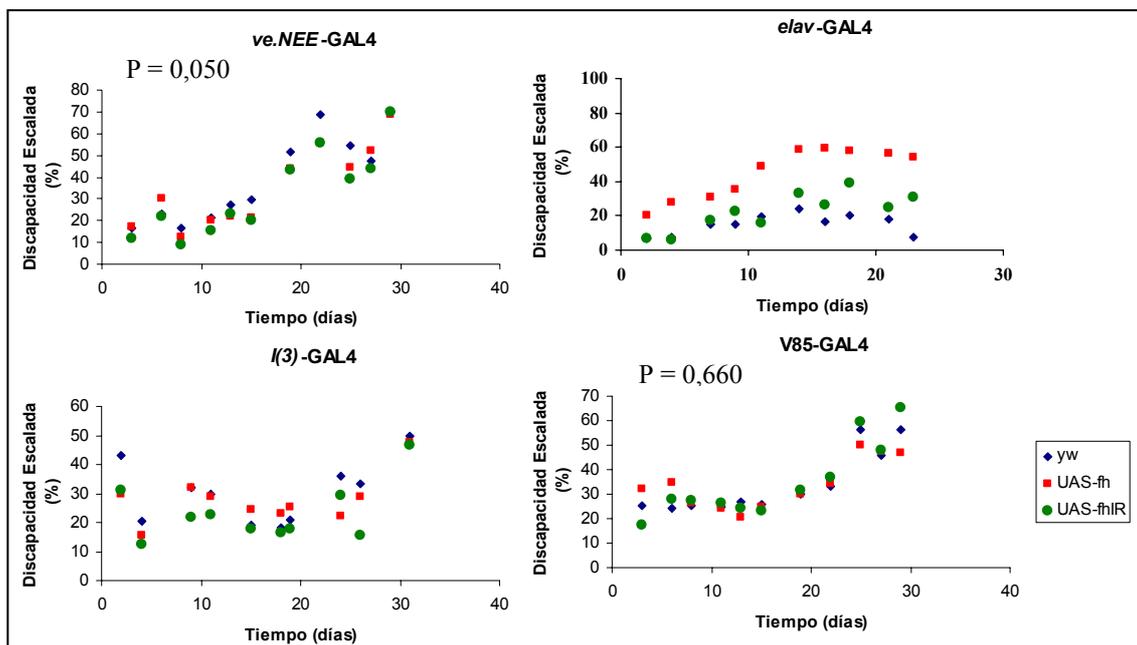


Figura R45. Resultado de los tests de comportamiento locomotor con las líneas GAL4 de expresión general en el sistema nervioso.

elav-GAL4 P= 0.000

Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
<i>yw</i>	100	,1500		
UAS- <i>fh</i> IR	100		,2227	
UAS- <i>fh</i>	100			,4483
Sig.		1,000	1,000	1,000

I(3)31-1[31-1]-GAL4 P= 0.000

Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
UAS- <i>fh</i> IR	60	,2299		
UAS- <i>fh</i>	60		,2751	
<i>yw</i>	60			,3146
Sig.		1,000	1,000	1,000

B-4. Líneas de expresión en el SNC.

Tras los análisis estadísticos, no se obtuvo ninguna diferencia significativa en la capacidad de escalada con las líneas GAL4 389, *Ddc* y *c689a* (figura R46). De nuevo nuestros resultados parecen indicar que este tejido no es sensible a las alteraciones de la expresión del gen *fh* y que por tanto la función que realice no es vital para el desarrollo de este tejido. Únicamente se obtiene significación con la línea *C81*-GAL4. Las diferencias se deben exclusivamente a que la capacidad de escalada de los individuos sobreexpresados es mucho menor que la de los individuos controles o interferidos. Además, los dos últimos muestran el mismo comportamiento locomotor. Las diferencias de los resultados obtenidos con *C81* y *c689a*, aunque el patrón de expresión descrito para la proteína GAL4 es idéntico en ambas, es probable que se deban a que la línea *C81* presenta una expresión adicional aun no descrita.

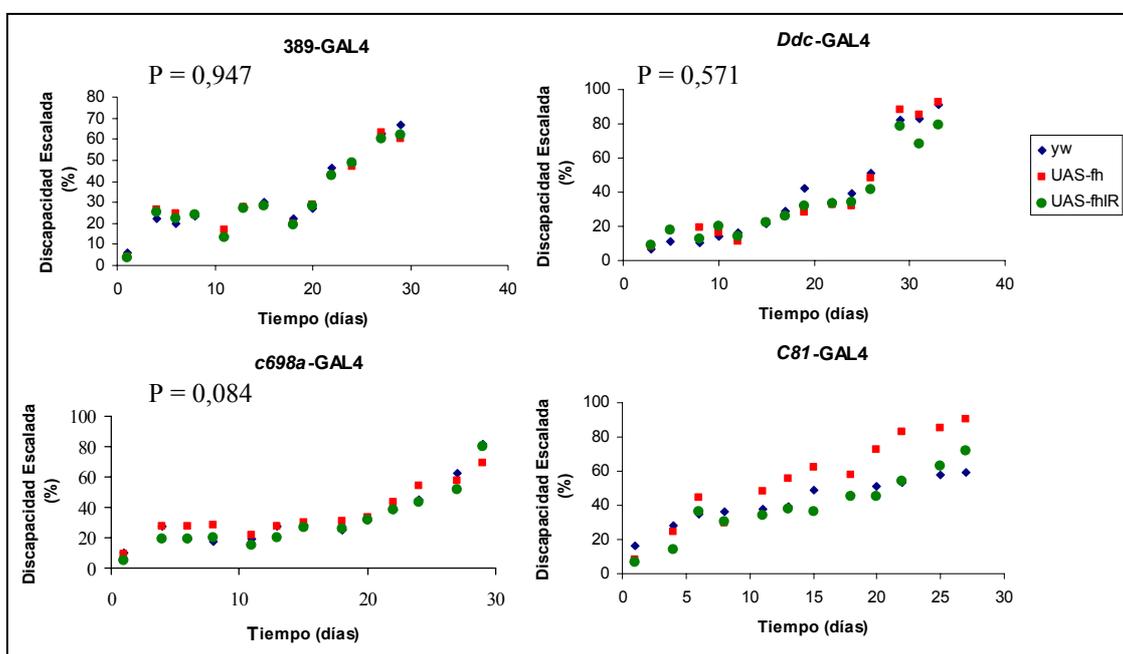


Figura R46. Resultado de los tests de comportamiento locomotor con las líneas GAL4 de expresión en el SNC.

C81-GAL4		P= 0,000	
Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
UAS- <i>fh</i> IR	120	,3958	
<i>yw</i>	120	,4235	
UAS- <i>fh</i>	120		,5572
Sig.		,259	1,000

B-5. Líneas de expresión en el SNP.

Respecto a las líneas del SNP (figura R47), se observó discapacidad en la escalada prácticamente desde el momento en que el adulto emerge, en el caso de los individuos sobreexpresados en las líneas de los progenitores de los órganos sensoriales (*neur*) o en las neuronas motoras (*D42* y *4G*). Al comparar controles e individuos interferidos sólo se encuentran diferencias para las líneas *neur* y *D42* a partir del décimo y el decimoquinto día, respectivamente. Con la línea 1407, la gráfica de la figura R47 y el test SNK muestran que la significación observada se debe a que la sobreexpresión y la interferencia provocan un efecto igual de negativo sobre la capacidad de escalada. Según el test SNK, cada uno de los genotipos del cruce con *neur* se comporta de manera diferente a los otros dos. En este caso, la sobreexpresión de *fh* disminuía, enormemente, la capacidad locomotora de las moscas y lo mismo ocurría con la ausencia de expresión del gen, aunque de manera significativamente menor. Además, los individuos sobreexpresados con el *driver neur* muestran una clara dificultad para recuperar la posición normal cuando se golpea el vial para llevarlos al fondo del mismo. Con las líneas de expresión en las neuronas motoras (*D42* y *4G*), la significación observada es debida a la sobreexpresión, ya que los individuos interferidos y los controles se comportan de la misma manera. En el caso de *neur* y *D42* los experimentos se repitieron a 25°C y se siguieron observando diferencias estadísticamente significativas, aunque el efecto fue más débil que a 29°C. No se encontró diferencia alguna con la alteración de la expresión de *fh* al utilizar una línea con expresión en los órganos cordotonales (*atonal*).

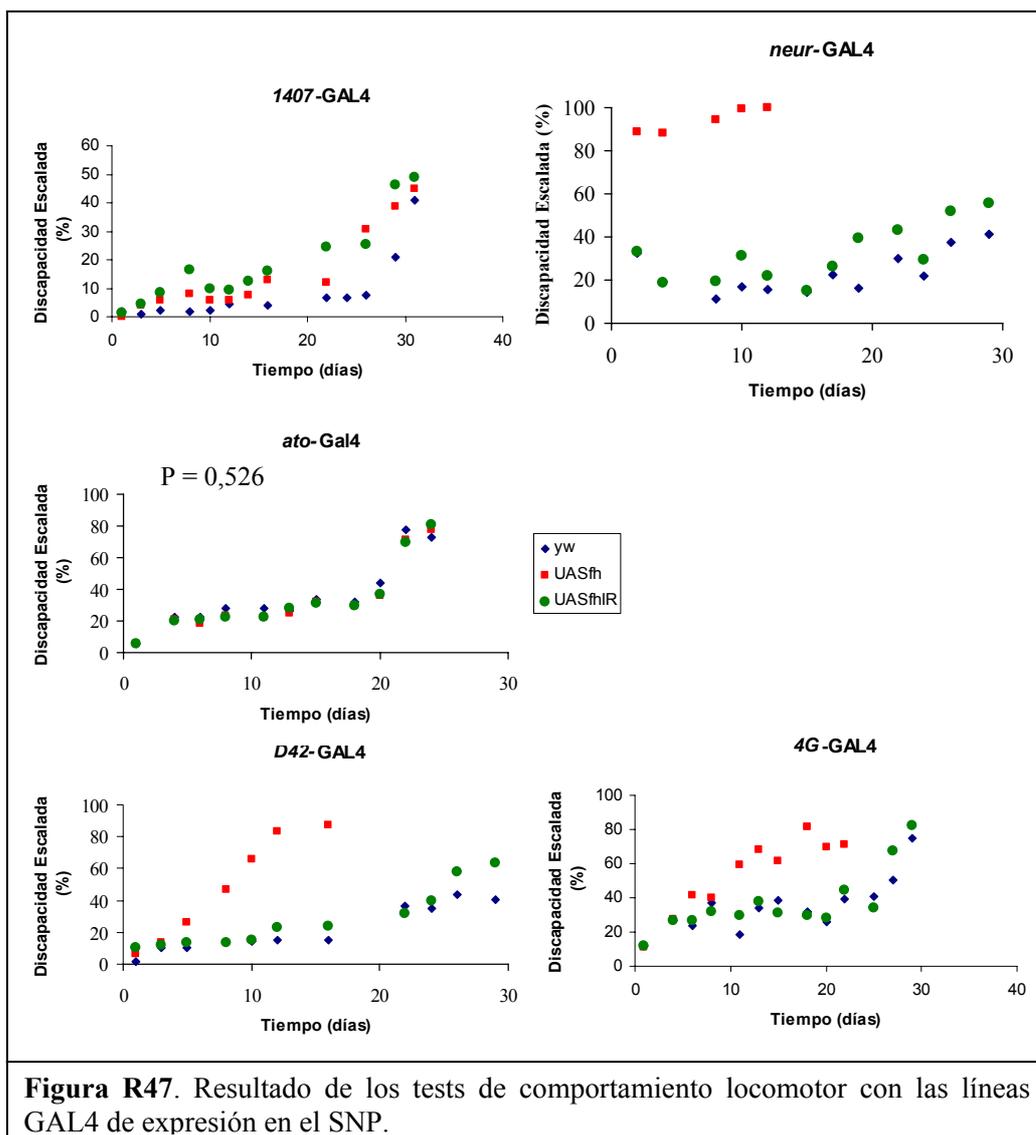


Figura R47. Resultado de los tests de comportamiento locomotor con las líneas GAL4 de expresión en el SNP.

1407-GAL4 P= 0,000

Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
yw	72	,0834	
UAS-fh	72		,1470
UAS-fhIR	72		,1871
Sig.		1,000	,088

neur-GAL4 P= 0,000

Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
yw	72	,2328		
UAS-fhIR	72		,3211	
UAS-fh	30			,9407
Sig.		1,000	1,000	1,000

resultados

D42-GAL4 P= 0,000

Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
<i>yw</i>	66	,2130	
UAS- <i>fh</i> IR	66	,2765	
UAS- <i>fh</i>	42		,4394
Sig.		,108	1,000

4G-GAL4 P= 0,000

Líneas	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
<i>yw</i>	130	,3473	
UAS- <i>fh</i> IR	130	,3697	
UAS- <i>fh</i>	100		,5326
Sig.		,353	1,000

DISCUSIÓN



El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio que pretende desarrollar, en *Drosophila melanogaster*, un modelo para el estudio de la enfermedad humana neurodegenerativa conocida como ataxia de Friedreich (AF). La función del gen responsable, el gen *FRDA*, no pudo ser inferida a partir de la secuencia de aminoácidos del producto codificado porque no presentaba homología con ninguna proteína previamente caracterizada. Por ello, ha sido necesario el estudio de los genes ortólogos de organismos más sencillos, como la levadura y el ratón, gracias a los cuales ahora se conocen muchos datos sobre el posible papel de esta proteína. En nuestro caso, hemos elegido a *Drosophila* como posible modelo porque nuestro laboratorio tiene una larga tradición en el uso de este organismo y por tanto ya dispone de la infraestructura, el equipamiento y la experiencia necesarios para el cultivo y manejo de *Drosophila* y para realizar los experimentos requeridos para llevar a cabo este trabajo.

Como primer paso, nuestro grupo de investigación abordó la clonación y caracterización molecular del gen de *D. melanogaster* ortólogo al gen *FRDA* (Cañizares *et. al* 2000) que fue designado como *fh* (*frataxin homologue*). De acuerdo con los programas informáticos, este gen codifica una proteína de 190 aminoácidos, con un peso molecular de 21kDa, que posee un péptido señal de importación a la mitocondria. La estructura secundaria propuesta presenta hojas β y hélices α de modo semejante a la frataxina humana. Al comparar la frataxina de *Drosophila* con la frataxina humana y con el resto de proteínas frataxina de un amplio número de organismos, se observa que todas presentan una elevada homología de secuencia y de algunas propiedades químicas, como el carácter hidrofóbico, especialmente en la región central y en el extremo C terminal de la proteína.

En este contexto, nos planteamos como objetivo de esta Tesis Doctoral la obtención de mutantes del gen *fh*, como herramienta fundamental para abordar el estudio de su función.

1. Análisis de las metodologías utilizadas para obtener mutantes en *Drosophila*.

Las diferentes estrategias permiten modificar la estructura del gen, generando de este modo un mutante estructural, o alterar específicamente la expresión de su mensajero, para crear un mutante funcional del mismo. En este segundo caso, podemos inducir tanto la disminución como el aumento de la expresión del gen obteniendo fenotipos por pérdida o ganancia de función respectivamente.

1.1 Movilización de elementos transponibles P.

La primera estrategia que llevamos a cabo para abordar el estudio de la función del gen *fh*, fue el uso de elementos transponibles como herramientas para la generación de alelos mutantes del gen. Partimos de dos líneas de *Drosophila*, obtenidas en el Proyecto de Disrupción de Genes, con inserciones en su genoma de un único elemento P artificial, localizado en las inmediaciones del gen *fh*, a 16kB para el P1468 y a 8kb para el EP1598.

discusión

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos presentan muchas de las características de otras movilizaciones descritas en la bibliografía:

(i) La frecuencia de movilización obtenida, considerando a los dos tipos de elementos utilizados, es del 3%, valor dentro del rango de los obtenidos en otros estudios como Zhang y Spradling (1993) con 1,8% y Timakov *et al.* (2002) con 2,7 y 4%.

(ii) En este trabajo se ha obtenido un elevado porcentaje de saltos locales (87,5%) y, en más de la mitad de los casos (54%), detectamos cambios de orientación de la inserción respecto a la original, resultados parecidos a los descritos por Tower *et al.* (1993) con el minicromosoma *Dp1187*.

(iii) Un 81% de las nuevas inserciones aisladas en nuestros experimentos se localizan en la región 5' de los genes *ld14* e *His3.3B*. El gen *His3.3B* codifica para una histona y se conoce que esta categoría de genes de remodelación de la cromatina se encuentran más accesibles para su transcripción que otros tipos de genes. En el trabajo de Tower *et al.* (1993) se pone de manifiesto la preferencia de los elementos P por la región 5' de los genes y especialmente en aquellos con alta tasa de transcripción. Éste es el caso del gen *His3.3B*. Sin embargo, para el gen *ld14* se ha descrito una expresión embrionaria unas 15 veces menor que la del gen *His3.3B* (Tomancak *et al.*, 2002), por lo que la gran tasa de inserción que hemos obtenido en este gen debe de tener otras causas.

(iv) Por último, el contenido en GC de las secuencias diana presenta unos valores bastante cercanos a los obtenidos por Liao *et al.* (2000) al analizar dos grupos independientes de 467 líneas EP distribuidas por todo el genoma.

Estos cuatro puntos avalan el diseño de nuestros experimentos de movilización, aunque de las 33 inserciones locales obtenidas ninguna afectó a la secuencia genómica del gen *fh*. La razón de ello la podemos encontrar en la existencia de dos posibles puntos calientes de inserción de elementos P en la zona. Se trata de las regiones 5' de los genes *ld14* e *His3.3B*, ya que el 100% de las nuevas inserciones obtenidas con la movilización del elemento P1468 se localizan en dicho extremo del gen *ld14*, mientras que en el caso del elemento EP1598, el 85% se localizan en el gen *His3.3B*.

Siguiendo a Thibault *et al.* (2004), podemos definir como punto caliente de inserción a la región genómica de 50kb definida por los genes *ld14* y *mei-P26*, ya que contiene más de 30 inserciones diferentes. No obstante, debemos matizar que el 80% de las inserciones presentes en la región se concentran en dos puntos, *ld14* e *His3.3B*.

La hipótesis de la existencia de dos puntos calientes de inserción de elementos P en esta región se ve apoyada si añadimos a nuestros resultados las líneas generadas en el Proyecto de Disrupción de Genes y en otros proyectos similares: inserciones a lo largo de todo el genoma (Bellen *et al.*, 2004, Hayashi *et al.*, 2002, Parks *et al.*, 2004, Thibault *et al.*, 2004, Ryder *et al.*, 2004 y la colección privada de la empresa coreana GenExel Inc.), y en el cromosoma X (Bourbon *et al.*, 2002, Peter *et al.*, 2002 y Beinert *et al.*, 2004). En concreto, de un total de unas 150.000 líneas, 93 se sitúan en la región de 50kb que va desde el gen *ld14* hasta el gen *mei-P26* y que incluye al gen *fh* (figura D1). Es importante señalar que una de las líneas generadas por la empresa GenExel Inc., la línea G2135, presenta un P artificial supuestamente en el extremo 3' del gen *fh*. Al analizar con el programa BLASTN la secuencia que la empresa había conseguido por PCR

inversa para localizar la nueva inserción, no hemos obtenido ningún parecido con la secuencia del gen *fh*, ni con secuencias adyacentes al mismo. Si bien hay que señalar que la secuencia de partida es de muy mala calidad.

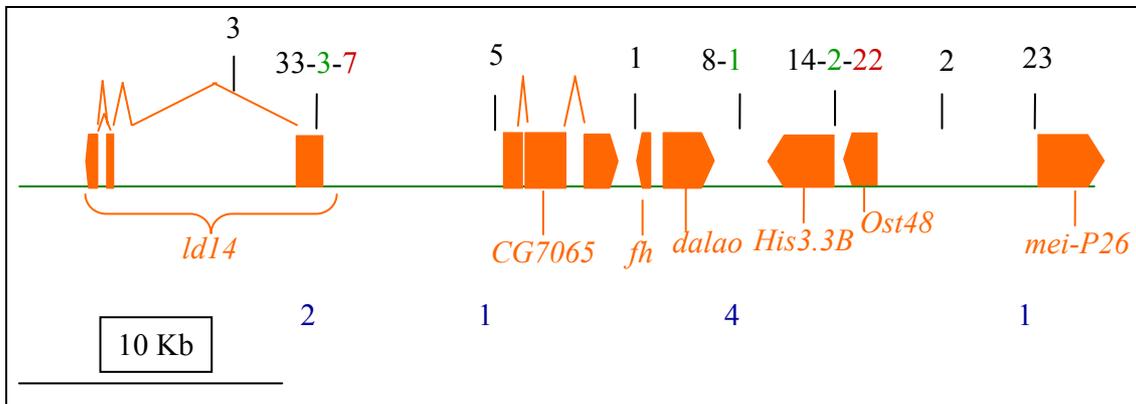


Figura D1. Región definida por los genes *ld14* y *mei-P26* en la que se indican el número y localización de las inserciones generadas por los diferentes Proyectos de Disrupción de Genes. Las cifras corresponden a las inserciones generadas en los proyectos que engloban todo el genoma (en negro), las inserciones generadas en proyectos específicos del cromosoma X (en verde) y las obtenidas en nuestros experimentos de movilización (en rojo). Los números en azul de la parte inferior de la figura señalan el número de inserciones tipo *piggyBac*.

Observando la figura D1, se puede considerar la existencia de un 3^{er} punto caliente situado en la región 5' del gen *mei-P26*. Este gen, al igual que el *ld14*, tampoco posee una elevada tasa de transcripción (Tomancak *et al.*, 2002) que pueda justificar el gran número de inserciones detectadas en él.

Por otro lado, es interesante señalar que también se han identificado elementos transponibles tipo *piggyBac* en estos mismos lugares. No obstante, la mutagénesis insercional basada en este tipo de elementos es bastante más reciente y dado que se han identificado un número bajo de inserciones en la región de estudio, es pronto para saber si los puntos calientes que hemos identificado para el elemento P, lo son también para el elemento *piggyBac*.

Cuatro de las nuevas inserciones obtenidas en nuestros experimentos corresponden a saltos a zonas más alejadas en el genoma, en concreto a las bandas 3B6, 4B1 y 12E4 del cromosoma X. En dichas regiones también se han localizado un número importante de nuevas inserciones del Proyecto de Disrupción de Genes de la Universidad de Berkeley y que por tanto constituirían puntos calientes de inserción dentro del cromosoma X (figura D2).

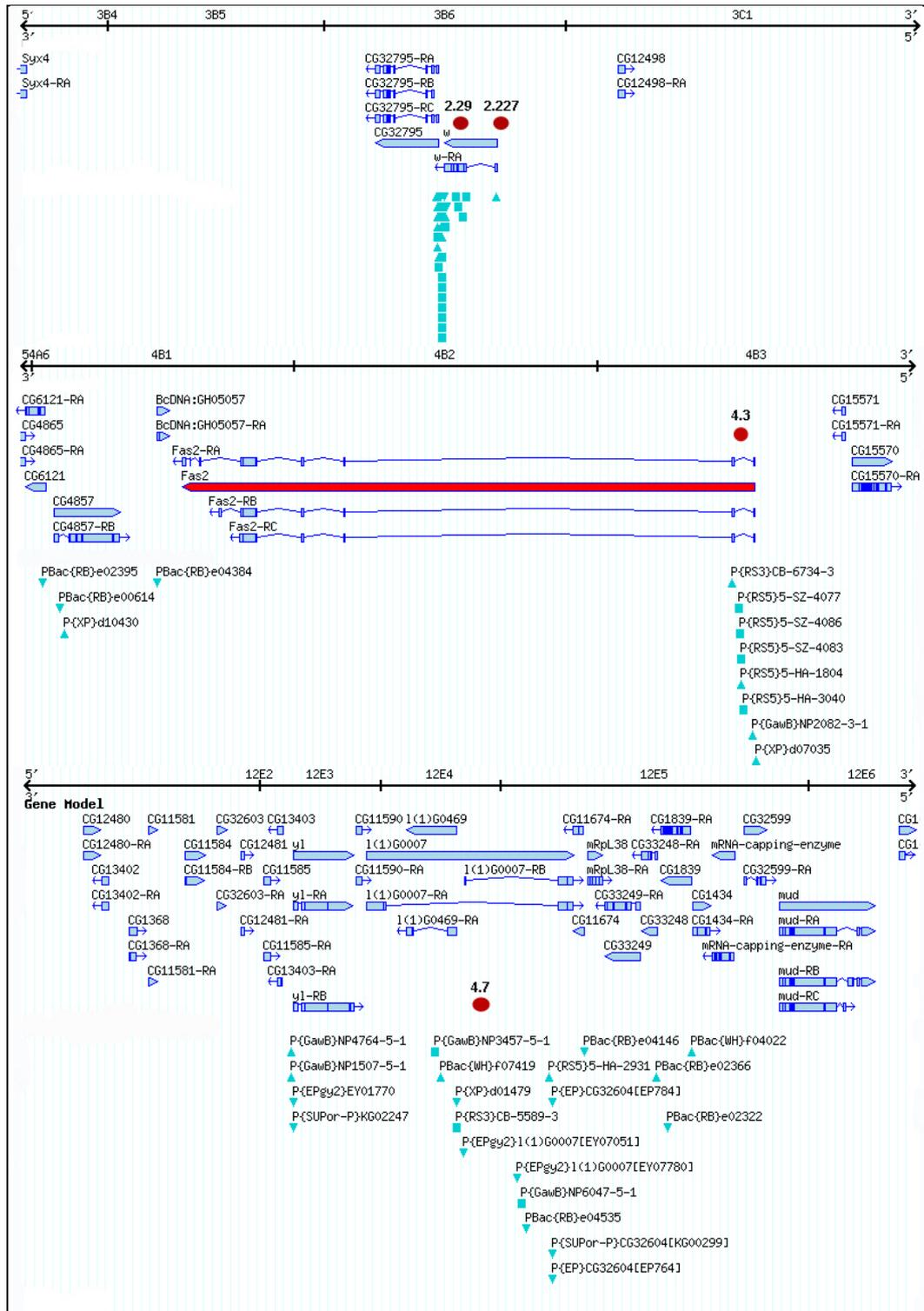


Figura D2. Líneas del Proyecto de Disrupción de Genes que contienen un elemento P artificial en el gen *white* (3B6), en el gen *Fas2* (4B3) y en el gen *l(1)G0007* (12E3-4). Los puntos granate corresponden a las localizaciones de las nuevas inserciones generadas en nuestros experimentos de movilización.

Concluyendo, el gen *fh* se sitúa dentro de una región donde las nuevas inserciones del elemento P quedarían “atrapadas” en los extremos 5' de los genes *ld14*, *His3.3B* y *mei-P26*. Esta observación, junto con el pequeño tamaño de *fh*, siendo el menor de la región (menos de 1kb), y su situación en una zona densa en genes, disminuye las posibilidades de lograr su alteración por mutagénesis insercional. La estructura de la región y la localización de las inserciones obtenidas hasta la fecha, también limitan mucho otras posibilidades, como puede ser la generación de pequeñas deleciones en la zona movilizándolo dos elementos a la vez (Parks *et al.*, 2004 y Ryder *et al.*, 2004). Con esta metodología el mínimo de genes eliminados sería de tres lo cual, probablemente, supondría la aparición de un fenotipo letal, cuyas alteraciones sería complicado asignar de manera individual a cualquiera de los tres genes eliminados.

Las nuevas posibilidades de mutagénesis insercional del gen *fh* habría que buscarlas en mejoras dentro de esta estrategia como es el P *homing* y, quizás, en la utilización de otros elementos transponibles con preferencias de inserción diferentes al elemento P. En nuestro laboratorio se está aplicando la técnica del P *homing* y se proyecta realizar la movilización de algunos de los *piggyBac* situados en las cercanías del gen *fh*. Este tipo de elementos muestra una preferencia de inserción muy diferente a la de los elementos P al insertarse preferentemente en secuencias TTAA (Horn *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en las primeras movilizaciones califican a los *piggyBac* como elementos mutagénicos muy superiores al elemento P (Handler y Harrell, 1999), lo cual nos abre una nueva vía para conseguir mutantes estructurales del gen *fh*.

1.2 Aplicación del sistema UAS-GAL4 de levadura para modificar la expresión génica de *fh*.

La segunda aproximación que pusimos en práctica para estudiar la función del gen *fh* se ha basado en la estrategia desarrollada por Brand y Perrimon (1993). En ella se emplea el factor de transcripción GAL4 presente en la línea *driver*, y las secuencias activadoras UAS introducidas en la línea *responder*. Mediante el cruce de ambas líneas es posible dirigir la expresión de genes concretos de *Drosophila* según un patrón temporal y/o espacial determinado.

Esta técnica ha sido utilizada, en un principio, para incrementar la dosis de genes determinados (sobreexpresión) o para expresar un gen en células o momentos del desarrollo donde no suele hacerlo (expresión ectópica). Posteriormente, también ha sido empleada para silenciar la expresión de un gen al combinarse con la técnica de interferencia de ARN que discutiremos en el siguiente punto.

En algunos trabajos, en los que se ha llevado a cabo la sobreexpresión de un gen utilizando el sistema UAS-GAL4, se ha producido, en realidad, el efecto contrario al deseado. Este efecto se conoce con el nombre de cosupresión génica y fue descrito por Pal-Bhadra *et al.* (1997) en su trabajo con el gen *Adh*. En este trabajo se introdujo, en embriones homocigotos y heterocigotos para un alelo nulo del gen *Adh*, un transgen compuesto por el gen *Adh* bajo el control del promotor del gen *white*. En ambos genotipos se observó una disminución de la tasa de transcripción tanto del transgen como del gen endógeno cuando se insertaban dos o más copias del transgen en el genoma. Además, la disminución era directamente proporcional al número de copias del transgen. Sin embargo, no se obtuvieron este tipo de resultados al realizar estos mismos experimentos con construcciones del gen *white*.

En nuestro caso no se produjo este fenómeno de cosupresión ya que la sobreexpresión del gen *fh* fue monitorizada mediante hibridaciones *in situ* en embriones y *Northern blot*. En ambos experimentos comprobamos que, al menos a nivel molecular, sí que se producía el aumento de la expresión del gen. Para realizar el *Northern blot* empleamos ARNm de embriones sobreexpresados o interferidos con líneas de expresión generalizada como *da* y *arm*, ya que con las líneas de expresión más específica existirían tejidos con una mayor (o menor cantidad de mensajero) y otros con una expresión normal del gen. Dicha coexistencia podría dificultar la detección de un aumento significativo (o de la disminución) de la expresión del gen *fh*.

Otra cuestión que nos planteamos es si el incremento de la dosis génica de *fh* podría provocar la aparición de artefactos que fueran los verdaderos responsables de las alteraciones observadas. Sin embargo, los resultados obtenidos con las diferentes líneas GAL4 nos permiten asegurar que no ha sido así, por tres razones:

- (i) La sobreexpresión no produce los mismos resultados en líneas GAL4 de expresión muy parecida como *da* y *arm*.
- (ii) La sobreexpresión ha dado resultados diferentes con líneas que se expresan en tejidos con un mismo origen pero en momentos diferentes, como *24B* y *MHC*.
- (iii) Las líneas con las que hemos obtenido alguna alteración fenotípica en los experimentos de sobreexpresión, son las mismas en las que la interferencia también ha producido efectos sobre el desarrollo de los individuos.

El mayor problema que presenta esta técnica es la ausencia, en cada línea, de una descripción completa y exhaustiva del patrón de expresión de la proteína GAL4 a lo largo de todo el desarrollo de *Drosophila*. De hecho, en la mayoría de los casos, sólo se dispone de la información correspondiente a determinados momentos del desarrollo, aquellos que han sido analizados por grupos interesados en tales estadios. Según el trabajo de McGuire *et al.* (2004), la mayor parte de las líneas GAL4 presentan expresión dinámica, es decir que los patrones de expresión cambian a lo largo del desarrollo y durante la fase adulta. Por tanto, el desconocimiento de tales patrones puede dificultar, en algunos casos, la interpretación de los resultados obtenidos.

Dado que la descripción de tales patrones implica una cantidad de tiempo y recursos demasiado grandes para laboratorios pequeños como el nuestro, hemos llevado a cabo una profunda revisión de la bibliografía existente y de la información depositada en las bases de datos, para obtener la máxima información disponible de cada una de las líneas. Algunas de las líneas GAL4 están perfectamente descritas, como es el caso de *24B*, *Dot*, *neur*, *D42* y *Ddc*. Otras, como las líneas *da* y *arm*, han sido descritas en un sólo trabajo (Wodarz *et al.*, 1995 y Sanson *et al.*, 1996 respectivamente), al que el resto de grupos hacen siempre referencia. En *T80* y *SG29.1*, la información disponible en la *flybase* se ha completado con la aportada por algunos grupos como Hrdlica *et al.* (2002) y Ayyub *et al.* (2005), respectivamente. Hemos empleado tres *drivers* (*C81*, *C23* y *5053A*) en los que la expresión de la proteína GAL4 sólo ha sido descrita de forma parcial (Manseau *et al.*, 1997 y Klapper, 2000) y que es probable que se expresen en otros estadios. Por último, sólo en una de las líneas, la línea *V55*, la información disponible es contradictoria. Tal y como se indica en el apartado 2.4.3 de resultados, dicha línea GAL4 se describe en la *flybase* como de expresión embrionaria en el SNP. Sin embargo, en la única referencia bibliográfica en la que se cita este *driver* (Gu *et al.*, 2004) se describe como de expresión en el SNP larvario.

A pesar de que las descripciones de los patrones de expresión de las líneas GAL4 no sean del todo completas, algunos fenotipos obtenidos, como la letalidad antes de la emersión, pueden ser explicados más fácilmente, ya que en estos casos la letalidad sólo puede deberse a la expresión de la proteína GAL4 en momentos anteriores a la muerte. Los efectos observados en el estadio adulto son más difíciles de adjudicar a un momento concreto del desarrollo si se desconoce el patrón exacto.

Dentro de los aspectos positivos, la técnica UAS-GAL4 confiere a *Drosophila* una de las ventajas más apreciadas como modelo de enfermedades humanas: el desarrollo de rastreos genéticos en busca de supresores e intensificadores de un fenotipo obtenido con cualquiera de las variantes del sistema. En este sentido, se puede aprovechar la colección de líneas EP y EP^s generadas por el Proyecto de Disrupción de Genes y la capacidad de estos elementos para transcribir los genes adyacentes a las inserciones (Rorth, 1996 y Rorth *et al.*, 1998). Nosotros hemos obtenido con dos líneas GAL4 (*Dll* y *neur*) alteraciones fenotípicas en la pata, en las macroquetas del *scutellum* y en la capacidad de escalada de los adultos, cuando se ha interferido la expresión del gen *fh*. Tales fenotipos pueden ser útiles para la realización de estos rastreos genéticos.

1.3 Aplicación de la técnica de ARNi para silenciar el gen *fh*.

La interferencia de ARN se ha convertido en pocos años en la técnica más potente para anular de manera específica, la expresión de cualquier gen en multitud de organismos y obtener, en poco tiempo, individuos mutantes funcionales transitorios por la pérdida de función génica.

En *Drosophila*, la técnica se comenzó a aplicar mediante microinyección de las moléculas de ARN de doble cadena en la parte posterior de embriones en estadio de blastodermo sincitial (cuando no se ha producido la celularización de los núcleos), con resultados inconsistentes en muchos de los casos y con poco efecto sobre genes de expresión en el adulto. Posteriormente se adaptó para poder combinarla con el sistema UAS-GAL4, generándose estructuras capaces de sintetizar moléculas de ARN de doble cadena. La combinación de ambas técnicas ha sido aplicada con éxito en varios trabajos (Kennerdell y Carthew (2000), Piccin *et al.* (2001), Kalidas y Smith (2002), Enerly *et al.* (2002)). En la mayoría, la estructura de ARN de doble cadena se consiguió mediante dos repeticiones invertidas del ADNc del gen a silenciar. Según Kalidas y Smith (2002), este tipo de construcciones no provocan una supresión completa, pero sí la aparición de fenotipos hipomórficos, requiriéndose entre 3 y 6 copias de las construcciones para obtener fenotipos más fuertes. Los mismos autores generaron un nuevo tipo de construcciones en las que enfrentaban el ADNc y la secuencia genómica del mismo gen. Sus resultados demostraron que este tipo de construcciones producían un silenciamiento más uniforme y más eficaz que las repeticiones invertidas con o sin espaciador separando ambas repeticiones.

La construcción empleada en nuestros experimentos se basa en la descrita por Piccin *et al.* (2001), es decir dos repeticiones invertidas del ADNc del gen *fh* separadas por un fragmento del gen *GFP*. Por lo tanto esperábamos obtener fenotipos hipomórficos.

Mediante *Northern blot* e hibridaciones *in situ* en embriones, monitorizamos el efecto del ARNi sobre la expresión del gen *fh*, observándose que el sistema funcionaba. En el *Northern blot* se detectó una importante degradación del mensajero endógeno, aunque también se observó una banda difusa del tamaño de este mensajero que podría corresponder a cierto porcentaje no degradado. Esto apoyaría que en nuestros resultados se de un efecto de carácter hipomórfico. En el caso concreto de la AF se trataría de una ventaja ya que, de este modo, nuestro modelo se aproximaría más a lo que ocurre en los pacientes, en los que la expansión del triplete GAA permite una expresión mínima del gen *FRDA*.

El resultado de la hibridación *in situ* de los embriones interferidos con *en*-GAL4 ha sido más difícil de interpretar, ya que hubiéramos esperado observar ausencia de expresión del gen *fh* en los compartimentos posteriores de cada segmento embrionario en lugar de en una amplia región central. Este efecto es similar al que se obtiene cuando se microinyectan embriones muy jóvenes con dosis altas de ARNs de genes de expresión temprana de *Drosophila* (Kennerdell y Carthew, 1988). Tal vez en este estadio sincitial, en el que se produce la inyección y el embrión está prácticamente “vacío”, las moléculas de ARN de doble cadena pueden difundir en alguna medida. Dado que la línea *en*-GAL4 se expresa en el embrión antes de que se inicie la gastrulación (Hama *et al.*, 1990), no descartamos que en este caso en concreto pudiera haber ocurrido algo semejante.

La difusión de las moléculas de ARN de doble cadena ha sido demostrada en *C. elegans* (Bosher y Labouesse, 2000). En este organismo se obtiene siempre una supresión potente y específica en todo el individuo, aunque la inyección del ARN de doble cadena se realice en zonas muy diferentes del cuerpo del gusano. Esto sólo es posible si las moléculas del ARNs son capaces de desplazarse a lo largo del cuerpo, cruzando las uniones celulares. Una posibilidad sería que se movieran a través de poros celulares, tal y como lo hacen ciertas proteínas que se sintetizan en el intestino y son transportadas hasta las células germinales. Podríamos pensar que esta posibilidad anularía la capacidad del sistema UAS-GAL4 para dirigir el silenciamiento en células o tejidos concretos. Sin embargo, los resultados de Kalidas y Smith (2002) indican que en *Drosophila* si la interferencia no se inicia en estadíos muy tempranos (5 o anteriores), ésta se restringe a las células en la que se produce, no difundiéndose a las células de alrededor.

2. *Drosophila* como modelo de estudio de la ataxia de Friedreich.

A pesar de la distancia evolutiva entre la especie humana y *Drosophila*, ésta se ha convertido en una de las herramientas más potentes para analizar la función de genes humanos que poseen ortólogos en este organismo.

D. melanogaster ha sido y es útil en el estudio de patologías humanas de etiología diferente: desórdenes del desarrollo, enfermedades cardiovasculares, patologías que afectan a la integridad del sistema nervioso y procesos oncológicos. A pesar de las evidentes diferencias morfológicas entre *Drosophila* y el ser humano, ambos organismos presentan muchas similitudes en el desarrollo temprano de estructuras y tejidos como el sistema muscular, el corazón y el sistema nervioso. Los procesos básicos de la neurodegeneración y del envejecimiento parecen seguir el mismo camino en los dos organismos, e incluso la aparición de estructuras cancerígenas es muy semejante en ambas especies, aunque la mosca no suele desarrollar tumores de manera natural. Todo ello es debido a que las rutas de señalización y los genes involucrados en las mismas han conservado la misma función a lo largo de la evolución (revisado en Bier, 2005).

La mayor parte de patologías en las que se ha desarrollado un modelo en *Drosophila* corresponden a enfermedades de herencia dominante. Este es el caso de las enfermedades de Huntington (Jackson, 1998), Parkinson (Feany y Bender, 2000), Alzheimer (Wittman, 2001) y otros desórdenes neurodegenerativos como las ataxias espinocerebelosas (Warrick *et al.*, 1999). El carácter dominante de la patología facilita la generación de dominantes negativos por sobreexpresión en *Drosophila* del gen ortólogo o del propio gen humano portador de la mutación según los casos.

En las enfermedades de herencia recesiva como es la AF, la estrategia que permite reproducir la enfermedad en la mosca es la obtención de un mutante estructural por pérdida de función del gen correspondiente y, en su defecto, la obtención de mutantes funcionales por interferencia de ARN. Por las razones que ya hemos explicado, ésta ha sido la estrategia que nos ha permitido analizar las alteraciones fenotípicas que se producen en *Drosophila* al reducir significativamente la expresión del gen *fh*. Nuestro trabajo es uno de los primeros estudios que desarrollan un modelo en *Drosophila*, para una enfermedad recesiva, mediante ARNi.

Para que *Drosophila* constituya un modelo adecuado en el que estudiar la AF, es necesario que los procesos celulares relevantes en la patología se encuentren razonablemente conservados entre la especie humana y *Drosophila*. Por ello, escogimos, para nuestros experimentos, el conjunto de líneas GAL4 que mejor se adaptaba a las características de la enfermedad: líneas de expresión generalizada para provocar el defecto en el mayor número de células posible, líneas específicas del sistema nervioso por ser el principal tejido afectado en los pacientes y líneas de expresión en músculo esquelético y corazón por ser tejidos ricos en mitocondrias y también afectados en los pacientes.

2.1 *fh* es un gen esencial para el desarrollo embrionario del SN y del músculo en *Drosophila*.

La disminución de la expresión del gen *fh* en el patrón determinado por las líneas *da*, *T80*, *24B*, *Dot* y *V55* produce letalidad completa en la fase de pupa madura. Este resultado sugiere que *fh* es un gen crítico para el desarrollo correcto de *D. melanogaster*. La misma conclusión se obtuvo de los experimentos con el ratón *knock-out* para el gen *frda* (Cossée *et al.*, 2000), ya que éste también moría en una fase temprana del desarrollo antes del nacimiento del adulto. El hecho de que no se detecten enfermos con mutaciones puntuales en homocigosis, lo que implicaría ausencia total de frataxina, sugiere que tales genotipos mueren durante la gestación, lo cual apoya la hipótesis de una función crítica para la frataxina durante el desarrollo embrionario de los distintos organismos. Sin embargo, en nuestro caso la letalidad en fase de pupa corresponde a un fenotipo de tipo hipomórfico del gen *fh*, probablemente porque *Drosophila* carezca de otros sistemas alternativos que realicen una función semejante a la de la frataxina al tratarse de un organismo más sencillo. Si esto es así, se esperaría que el mutante con pérdida total de función muera durante la embriogénesis temprana.

Los patrones de expresión de los *drivers da* y *arm* son muy semejantes y están descritos como generales en el embrión. Pero *da* es un gen proneural, con un papel importante en el desarrollo de los sistemas nervioso y muscular del embrión al combinarse con otras señales (Vaessin *et al.*, 1994). Por su parte, *arm* forma parte de un complejo multiproteico que participa en la formación y mantenimiento de las capas de células epiteliales. Es posible que la disminución de la expresión de *fh* sea muy crítica, en aquellos dominios en los que el gen *da* interacciona con los productos de otros genes para que se inicie el desarrollo de los sistemas nervioso y muscular del embrión. En cambio, no ocurre así en los dominios de *arm*. Inbal *et al.* (2003) especifican que la expresión de la línea *arm-GAL4*, que hemos utilizado, es ubicua pero no uniforme con una mayor expresión en el ectodermo y muy débil en el SNP. Ello explicaría porqué con la línea *arm-GAL4* obtenemos una progenie de aspecto normal.

Sin embargo, la letalidad en fase de pupa madura es difícil de explicar por el patrón de expresión descrito para la línea *da*-GAL4 en el embrión, ya que durante la pupación se destruye la práctica totalidad de las estructuras larvarias, conservándose únicamente parte del corazón, algunos grupos de músculos y un pequeño conjunto de neuronas. Es plausible suponer que, como el gen *da* se expresa también en los discos imaginales larvarios actuando de nuevo como gen proneural para la formación del sistema sensorial del adulto (Vassein *et al.*, 1994), la línea *da*-GAL4 también lo hará, aunque dicha expresión no haya sido estudiada por el momento. Esta expresión podría explicar mucho mejor la fase en la que se produce la letalidad observada en los experimentos de interferencia.

La expresión de *T80* en los discos imaginales es capaz de explicar la letalidad observada con la interferencia, aunque no podemos descartar la existencia de expresión en otros tejidos que también contribuya a la muerte de los individuos.

La interferencia con la línea *24B* de mesodermo somático, produce una estructura muscular alterada. No obstante, en dicha estructura se pueden apreciar claramente fibras musculares completas y polinucleadas, con lo que los procesos de fusión, migración y diferenciación no parecen estar alterados, tal y como nos indican las tinciones con anticuerpos marcadores de distintos grupos de células fundadoras como *eve* o *Kr*. Con ellos no observamos ninguna diferencia entre los embriones interferidos y los embriones control. Nuestros resultados sugieren más cierta falta de energía para completar el entramado muscular del embrión que defectos en los procesos específicos de su desarrollo.

La letalidad observada, cuando se altera la expresión de *fh* en el corazón de *Drosophila* con la línea *Dot*-GAL4, es muy importante para considerar a *Drosophila* como modelo de la AF, por tratarse de un órgano gravemente afectado en los pacientes. Aunque con los tres anticuerpos empleados (*zfh-1*, *eve* y *EC11*) no hemos detectado ningún defecto en el corazón embrionario, la expresión de la línea *Dot* continúa en momentos posteriores del desarrollo, que no hemos analizado, y en los que muy probablemente aparecerán los defectos responsables de la letalidad.

En lo que respecta a las líneas de sistema nervioso, a excepción de la línea *V55*-GAL4, se obtuvo en todos los casos una progenie con un porcentaje normal de individuos. El análisis morfológico de los adultos obtenidos en los cruces con este conjunto de líneas reveló, como única alteración, la ausencia de las macroquetas inferiores del *scutellum*, en la descendencia del cruce de interferencia con *neur*-GAL4. La línea *neur*-GAL4 se expresa en todos los progenitores de órganos sensoriales de los adultos, en el momento en que se establece en cada conjunto de células precursoras cuál de ellas va a convertirse en neuroblasto. La disminución de la expresión de *fh* en este momento puede provocar que no se diferencie ningún neuroblasto o que muera el neuroblasto especificado. Estos defectos explicarían la ausencia de las macroquetas del *scutellum*.

En los embriones interferidos con la línea *V55-GAL4*, únicamente se observa una menor condensación de la estructura del SNC, con lo que es posible que no se haya alcanzado la densidad celular óptima. Tal vez la interferencia de *fh* altere la capacidad de división de los neuroblastos para generar todas las neuronas necesarias. La línea *V55* es la única línea en la que el SNC se ha visto afectado de manera evidente o de manera que comprometa la viabilidad de los individuos. Este defecto es difícil de explicar en una línea cuya expresión se ha descrito en el SNP, más aún cuando con líneas de fuerte expresión en el SNC como *da-GAL4* o *elav-GAL4* no hemos observado este tipo de defectos.

2.2 La reducción de la expresión de *fh* afecta a la supervivencia y a la capacidad de escalada.

En todos los cruces de interferencia en los que se obtenía progenie viable, ésta fue analizada mediante un test de supervivencia y un test de capacidad locomotora. La interferencia de *fh* no aumenta el tiempo de vida de la mosca en ninguna de las líneas empleadas como se ha descrito recientemente para *C. elegans* (Ventura *et al.*, 2005). De hecho, lo que se observa es una pequeña disminución de la supervivencia con los *drivers* de expresión en los músculos indirectos de vuelo (*act88F* y *SG29.1*) y con ciertos *drivers* de expresión en el SNP (*1407*, *neur* y *elav*).

Los tests de capacidad locomotora muestran, en líneas generales, los mismos resultados, observándose diferencias significativas entre los individuos control y los individuos interferidos con las líneas GAL4 de sistema nervioso general que incluyen al SNP o específicas de éste último, como *elav*, *I(3)* y *neur*. En todos los casos los dos conjuntos de individuos muestran inicialmente la misma capacidad de escalada, aunque con el tiempo la capacidad de los interferidos disminuye más rápidamente, observándose un déficit de la misma desde los días 15° (*elav*), 24° (*I(3)*) y 10° (*neur*). Con las líneas de expresión en las motoneuronas (*D42* y *4G*), las gráficas muestran también la aparición muy tardía de diferencias entre los individuos interferidos y los controles correspondientes. La disminución de la capacidad de escalada ha sido extensamente relacionada con procesos de degeneración de las estructuras neuronales del adulto (Feany y Bender, 2000).

Los músculos indirectos de vuelo (IFM) son un conjunto de 6 músculos situados en el tórax del individuo adulto y presentan una estructura muy similar al músculo estriado de los vertebrados, lo que los convierte en un modelo excelente para el estudio de enfermedades cardíacas (Ferrús *et al.*, 2000). Por ello, la disminución de la capacidad de supervivencia observada con las líneas *SG29.1* y *act88F*, y los problemas de escalada y de posición de las alas detectadas con el *driver* *SG29.1* resultan de especial interés y nos sugieren analizar con detalle los IFM de los individuos interferidos con estas líneas.

2.3 La reducción de la expresión de *fh* ha generado alteraciones fenotípicas útiles para futuros rastreos genéticos.

El objetivo de los rastreos genéticos es identificar posibles proteínas que interaccionen con el gen que nos interesa. Una forma sencilla de hacerlo es comprobar si los fenotipos observados al alterar la expresión de dicho gen se ven modificados al alterar también la expresión de otros genes. A la hora de llevar a cabo rastreos a gran escala, que implican estudiar un elevado número de individuos obtenidos en un elevado número de cruces, es muy importante que la alteración que puedan producir los modificadores sea fácilmente analizable, sin necesidad de recurrir a técnicas moleculares, para invertir un periodo de tiempo que sea razonable.

Las alteraciones en el número de segmentos tarsales encontradas en los individuos interferidos con el *driver Dll* y las anomalías observadas en las macroquetas del *scutellum* al alterar la expresión de *fh* con *neur-GAL4*, resultan de enorme interés y utilidad, porque la simple observación de los individuos sería suficiente para encontrar modificaciones en tales alteraciones en el fenotipo, sin necesidad de análisis histológicos más profundos.

3. La sobreexpresión del gen *fh* produce el mismo efecto que su interferencia pero con mayor intensidad.

En general, la sobreexpresión provoca la aparición de fenotipos más potentes y de aparición más temprana que la interferencia. Esto ha permitido observar un mayor número de anomalías.

Al igual que en la interferencia, la sobreexpresión de *fh* en el patrón determinado por las líneas *da*, *T80*, *24B*, *Dot*, *V55* y *SG29.1* produce letalidad.

Según los defectos observados en las inmunohistoquímicas de los embriones sobreexpresados con *da-GAL4*, el incremento de la expresión del gen *fh* no afecta al desarrollo embrionario del SNC y el efecto sobre el músculo se concentra en unas pocas fibras musculares. Las aberraciones más grandes se observan en el SNP tanto sensorial como motor, sobre todo a nivel del desarrollo de las proyecciones axonales. Este tipo de alteraciones son características de la modificación del proceso normal de diferenciación neuronal. Aún así, no podemos descartar la posibilidad de que los efectos sobre el SNC u otras estructuras aparezcan posteriormente.

Dado que la línea *T80-GAL4* se expresa en los discos imaginales larvarios y los individuos sobreexpresados con esta línea se muestran incapaces de iniciar la pupación, pensamos que presentarían algún tipo de defecto en tales tejidos que impediría su desarrollo para formar las estructuras adultas. En *D. melanogaster* se han descrito mutantes que presentan discos muy pequeños o ausencia total de los mismos, sin que ello afecte a la viabilidad y morfología de la larva, pero que son incapaces de llevar a cabo la metamorfosis de pupa a imago (Szabad y Bryant, 1982).

Sin embargo, éste no fue nuestro caso, ya que al estudiar los discos de 40 larvas sobreexpresadas con *T80*, se observó la presencia, en todos los casos, de discos imaginales de aspecto normal. Por tanto, la letalidad observada podría ser explicada porque esta línea muestra también expresión en músculo y sistema nervioso del embrión (Hrdlicka *et al.*, 2002). Esto apoyaría los resultados obtenidos con *da*.

La sobreexpresión del gen *fh* en el mesodermo embrionario con la línea *24B* provoca la aparición de letalidad al inicio de la pupación. Dicha letalidad se debe, en parte, a que la sobreexpresión da lugar a una estructura muscular bastante alterada, mucho más que en el caso de la interferencia. En estos embriones podemos observar algunas fibras musculares de aspecto normal, con lo que es probable que los procesos de formación de los músculos no estén totalmente alterados. Las tinciones con los anticuerpos eve o Kr, muestran una localización irregular de algunas de las células fundadoras, lo cual dificulta distinguir si en algunos de los conjuntos también se ve afectado el número de células. Dicha disposición puede deberse a problemas en el proceso de migración de las células fundadoras, lo cual podría provocar el reclutamiento de células competentes para la fusión que no le corresponden, y de este modo se interrumpiría la estructura normal del patrón muscular.

La alteración de la expresión del gen *fh* en el mesodermo embrionario no se limita a generar defectos en los músculos, sino también en diferentes partes del sistema nervioso, tal y como muestran las tinciones con 1D4 y 22C10. En ambas se observa la aparición de fusiones entre axones motores o sensoriales de hemisegmentos contiguos. Este tipo de defectos es coherente con la existencia de problemas en el sistema muscular ya que éste y el sistema nervioso están estrechamente relacionados.

Un defecto sorprendente, que observamos en la tinción con el anticuerpo eve, fue la ausencia específica del conjunto de interneuronas EL del hemisegmento abdominal izquierdo A2. Esto podría explicarse porque dicho conjunto de células haya muerto o por que ellas mismas o sus precursoras hayan sufrido cambios intrínsecos que afecten al mantenimiento de la expresión de la proteína eve. Este resultado sugiere la existencia de una asimetría en este conjunto de neuronas, asociada a la función del gen *fh*, cuya génesis es difícil de explicar. Hemos encontrado también un gran número de defectos axonales en el hemisegmento izquierdo A2 que pensamos deben estar relacionados con la ausencia de las neuronas EL del mismo hemisegmento. Sin embargo, los axones que están alterados no son propiamente los que generan estas neuronas, ya que éstos se proyectan en otra dirección, más bien se trata de los axones que proyectan las motoneuronas, como aCC o RP2, en el propio hemisegmento.

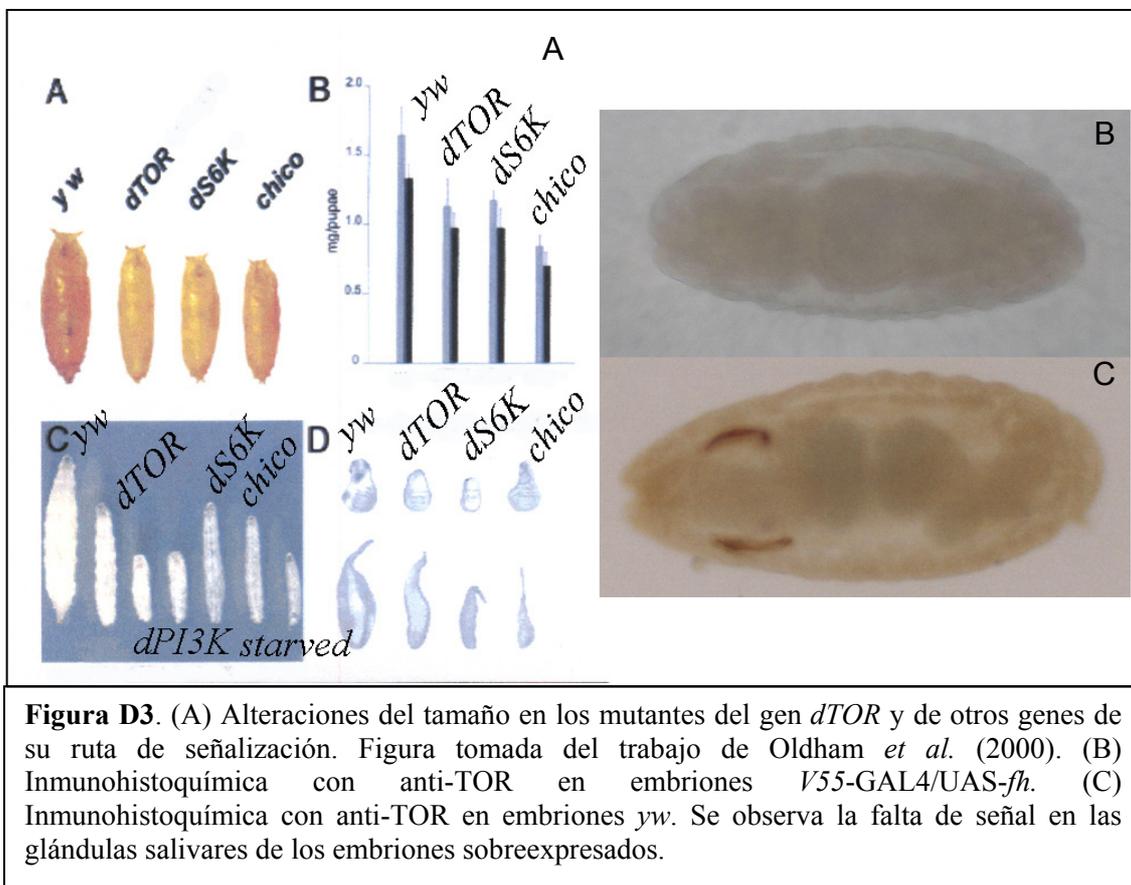
Todas estas alteraciones en los sistemas muscular y nervioso podrían explicar el movimiento significativamente más lento de la larva *+UAS-fh; 24B/+* respecto al control *yw*. También los adultos que se obtienen a 25°C muestran problemas de movilidad que aumentan día a día. Como la modificación de la expresión de *fh* tiene lugar en todo el mesodermo temprano, es probable que estemos afectando al conjunto de mioblastos de origen embrionario que formarán la musculatura del adulto durante la pupación.

La sobreexpresión del gen *fh* específicamente en el corazón también provoca la aparición de letalidad completa. En este caso, con los anticuerpos *zfh-1*, *eve* y EC11 se han detectado huecos en la estructura embrionaria de este órgano debido a la ausencia de células cardíacas y/o pericardiacas. Sin embargo, la tinción con *eve* en embriones de estadios 11 y 12 no muestra ausencia de las células precursoras del corazón. Es posible que los huecos observados se originen por problemas en la diferenciación de las células precursoras o por muerte de las células cardíacas o pericardiacas ya diferenciadas.

En la sobreexpresión con el *driver V55* se obtiene letalidad en larva de 3^{er} estadio, las cuales muestran un tamaño significativamente menor al que les corresponde. Este fenotipo se asemeja al que presentan varios mutantes en *D. melanogaster*, como *peterpan* (Migeon *et al*, 1999) y *target of rapamycin (dTOR)*, Oldham *et al.*, 2000) entre otros. En la figura D3-A se presenta una imagen extraída de Oldham *et al.* (2000) en la que se puede apreciar la reducción del tamaño de las larvas, de las pupas y de los discos imaginales en los mutantes del gen *dTOR* y de otros genes, todos ellos componentes de la ruta de respuesta a la insulina.

El gen *dTOR* resulta de especial interés porque se ha descrito su implicación en algunas enfermedades neurodegenerativas. Se ha comprobado en los modelos celulares, en ratones transgénicos y en cerebros humanos con la enfermedad de Huntington que las proteínas con la expansión patológica de poliglutaminas secuestran de modo específico a la proteína TOR en el interior de los agregados típicos de estas enfermedades. El secuestro provoca la inactivación de la proteína TOR, lo cual induce el proceso de autofagia típico de la neurodegeneración en estas enfermedades (Ravikumar *et al*, 2004). La autofagia es también el tipo de muerte celular que se ha descrito en las células sensoriales del modelo murino de la AF (Simon *et al*, 2004). También se ha descrito en el modelo de *D. melanogaster* que expresa la huntingtina mutante humana una clara degeneración de los omatidios de la mosca. Dicha degeneración se ve ralentizada si las moscas son tratadas con rapamicina (Ravikumar *et al*, 2004).

En base a todo lo anterior, hemos realizado experimentos preliminares mediante inmunohistoquímica con anti-TOR para comprobar si hay relación entre este gen y el fenotipo obtenido con el *driver V55*. Mientras que en los embriones *yw* (figura D3-C) se apreció claramente una señal en las glándulas salivares, ésta no aparecía en los embriones *V55-GAL4/UAS-fh* (figura D3-B). Este resultado podría indicar algún papel de esta proteína en las anomalías encontradas en los embriones *V55-GAL4/UAS-fh*.



Es posible que el aumento de la cantidad de frataxina inducido por la sobreexpresión, actúe sobre la proteína TOR de un modo semejante a como lo hacen las proteínas con expansiones anómalas de poliglutaminas. De este modo, podría explicarse la ausencia de señal en las inmunohistoquímicas de los embriones *V55-GAL4/UAS-fh*. La inactivación de TOR dispararía un proceso de autofagia que podría explicar el pequeño tamaño de las larvas y/o la degeneración del SNC de estos embriones.

Además, el gen TOR está relacionado con el control temporal de la diferenciación del sistema nervioso en humanos y en *Drosophila* (Leopold, 2004) y actúa como sensor molecular de la concentración de ATP (Dennis *et al.*, 2001). Si dicha concentración es baja, TOR se inactiva y se induce la autofagia. Una concentración baja de ATP es una de las características de la AF. Por otro lado, es curioso que la sobreexpresión del gen *TOR* de *Drosophila* de lugar a alteraciones muy parecidas a las que presentan las mutaciones de pérdida de función de dicho gen (Hennig y Neufeld, 2002), hecho que también ocurre con *fh* de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo.

La interacción entre la frataxina y la proteína TOR es sólo una posibilidad que necesita de estudios más exhaustivos para ser confirmada. Por ejemplo: comprobar, mediante *Western blot*, la disminución de la proteína TOR en el desarrollo embrionario de los individuos sobreexpresados con la línea *V55*; comprobar si dicha disminución también se observa en los individuos interferidos con el *driver V55* y en la sobreexpresión con otras líneas GAL4 interesantes como *da-GAL4*; comprobar que se está produciendo un fenómeno de autofagia; testar si el tratamiento de las moscas con rapamicina es capaz de atenuar los efectos tanto de la sobreexpresión como de la interacción, tal y como ocurre en los pacientes de Huntington y en el modelo de *Drosophila* para esta enfermedad y comprobar, mediante ensayos de coimmunoprecipitación, la interacción entre ambas proteínas.

En los embriones sobreexpresados con *V55*, se detectó una pequeña disminución del número de neuronas sensoriales ventrales en algunos hemisegmentos abdominales y un gran efecto sobre la estructura del SNC, tanto en los axones longitudinales como en las comisuras e incluso en las raíces de las proyecciones periféricas. La ausencia de varias neuronas sensoriales implica su muerte o la muerte de sus precursores. Los defectos en las proyecciones axonales longitudinales pueden asociarse a problemas en algunas de las neuronas, ya sea por ausencia o por incapacidad de proyectar los conos de crecimiento de los axones. Estas deficiencias suelen repercutir en daños en los axones motores que en nuestro caso no hemos podido detectar.

Con las demás líneas de expresión en el sistema nervioso se obtiene una progenie completamente normal cuando se sobreexpresa *fh*. El análisis morfológico de la descendencia de todos estos cruces reveló que sólo la línea *neur-GAL4* produjo una alteración visible. Dicha alteración consistía en la ausencia y/o la posición irregular de las macroquetas del *scutellum*. Es posible que la sobreexpresión provoque la muerte del neuroblasto o de su precursor y que en algunas ocasiones se convierta en neuroblasto alguna célula que no estaba destinada a ello.

La descendencia de los cruces de sobreexpresión con estas líneas también fue analizada mediante un test de supervivencia y un test de capacidad locomotora. La sobreexpresión de *fh* reduce la supervivencia de los individuos, pero sólo cuando se incrementa la cantidad de frataxina en las células precursoras de los órganos sensoriales (*neur*), en el SNP (*1407*), en las neuronas motoras (*D42* y algo menos *4G*) y en todas las neuronas (*elav*). A través de las gráficas podemos inferir la vida media (tiempo correspondiente al 50% de supervivientes) de algunos de los genotipos. En el caso de las líneas GAL4 *neur*, *1407* y *D42* encontramos unos valores de 8, 16 y 18 días, respectivamente, para los individuos sobreexpresados, muy inferiores a los valores de 22, más de 32 y más de 39 días observados en los cruces control correspondientes. No hemos observado ninguna diferencia en la capacidad de supervivencia de la progenie de las líneas GAL4 de expresión general en el sistema nervioso, ni en las de expresión en el SNC, células dopaminérgicas o en los órganos cordotonales. En este último caso, puede ser que muchas de sus funciones puedan realizarlas también las neuronas multidendríticas, como ha sido postulado (en Jan y Jan, 1993).

Los test de capacidad locomotora muestran, en líneas generales, los mismos resultados. La sobreexpresión de *fh* sólo altera, de manera significativamente estadística, la capacidad de escalada con los *drivers* de expresión en SNP (*1407*), precursores (*neur*), neuronas motoras (*D42* y *4G*) y, aparentemente, en *elav*, sugiriendo con ello la

existencia de un daño neuronal. En estos individuos la alteración se aprecia desde la emersión del adulto o en los primeros días de la vida de los mismos. Es muy probable que la brusca disminución de la supervivencia y la capacidad de escalada en los individuos sobreexpresados sea fruto de un rápido proceso de neurodegeneración.

La sobreexpresión en *Drosophila*, empleando el sistema UAS-GAL4, de enzimas protectoras frente al estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa de cinc y cobre o la catalasa, entre otras, produce resultados ambiguos o muy diferentes, que dependen en gran medida del fondo genético de la cepa empleada. Algunos autores proponen que la sobreexpresión de uno de estos enzimas o la combinación de varios de ellos no incrementa de manera significativa el tiempo de vida de la mosca (Orr *et al.*, 2003; Sohal, 2002), mientras que otros autores (Parkes *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2000) consideran que la sobreexpresión sí es beneficiosa dependiendo del sistema o de la línea GAL4 empleada. Estos autores encuentran que la sobreexpresión de la enzima SOD1 humana con *drivers* como *da*, *MHC* y *elav* no tiene ningún efecto sobre el tiempo de vida, mientras que con un *driver* específico de motoneuronas, como *D42*, se incrementa el tiempo de vida hasta un 40%, ya que, al parecer, las motoneuronas son un tejido muy sensible frente al estrés oxidativo. Sin embargo, para otro tipo de genes de respuesta frente a distintos tipos de estrés y que actúan como chaperonas moleculares, como son los genes de choque térmico, la sobreexpresión sí provoca la aparición de potentes efectos deletéreos como se observa en los trabajos de Bhole *et al.* (2004) y Krebs y Feder (1997) para las proteínas Hsp22 y 70 respectivamente.

En nuestro caso, la sobreexpresión nunca ha aumentado el periodo de vida, todo lo contrario, lo ha reducido de manera importante y significativa especialmente con las líneas GAL4 *D42* y *neur*. Estos resultados sugieren que probablemente la función principal del gen *fh* no sea la de agente protector frente al estrés oxidativo actuando directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo sino más bien como una chaperona, tal y como se sugiere en Bulteau *et al.* (2004).

Los resultados de sobreexpresión presentados en este trabajo difieren bastante de los obtenidos en el ratón (Miranda *et al.*, 2004) cuando se sobreexpresa la frataxina y su efecto es inocuo. Además, en estos ratones no encuentran ninguna diferencia en muchos parámetros respecto al ratón salvaje. Creemos que la principal diferencia debe residir en el nivel de sobreexpresión alcanzado, siendo probablemente mucho mayor con el sistema UAS-GAL4.

Sin embargo, en cultivos celulares de adipocitos, se observa un incremento de la producción de energía o la activación de rutas antioxidantes (Shoichet *et al.*, 2002 y Ristow *et al.*, 2000). Puede ser que un pequeño aumento de la cantidad de frataxina sea en cierta medida hasta beneficioso, pero una mayor sobreexpresión más allá de un nivel crítico, generará un estrés oxidativo o una disfunción del sistema demasiado grande para que cualquier agente de protección de la célula pueda contenerlo.

Se han descrito interacciones de la frataxina con proteínas implicadas en la biosíntesis de centros Fe-S y con proteínas de la cadena de transporte electrónico y del ciclo de Krebs que a su vez interaccionan con otras proteínas. En este entorno, es probable que una sobreexpresión de la frataxina sea capaz de secuestrar algunas de estas proteínas, impidiendo que desarrollen su labor adecuadamente, generándose un estrés oxidativo muy intenso en un corto espacio de tiempo.

En resumen, la interferencia y la sobreexpresión del gen *fh* en los mismos tejidos y momentos del desarrollo, inducen la aparición de letalidad, de alguna alteración fenotípica o de alguna modificación del comportamiento. Esto no sólo minimiza las posibilidades de que los resultados de la sobreexpresión sean en realidad artefactos experimentales, sino que nos permite plantear la hipótesis de que tanto el aumento como la disminución de la frataxina afectan, en *Drosophila*, a los mismos procesos.

Los defectos encontrados se concentran por una parte en el SNP, tanto en las neuronas y axones del componente sensorial, como en los axones del componente motor (en este caso las neuronas motoras no parecen afectadas). Por otra parte, se han observado alteraciones importantes en varios de los derivados del mesodermo embrionario, como son el músculo somático y las células cardíacas y pericardiacas. Todos estos defectos conducen a la aparición de 100% de letalidad antes de la emergencia del adulto o a una disminución de la capacidad de supervivencia y escalada en los casos en los que se obtiene descendencia. A excepción de los resultados obtenidos con la línea *V55* no hemos encontrado ningún otro efecto sobre el SNC.

La interferencia y la sobreexpresión en el músculo sólo han resultado efectivas si la alteración se produce en los primeros momentos del desarrollo de las estructuras afectadas. Por su parte, en el SNP sólo se han producido alteraciones cuando se han afectado conjuntos de precursores sensoriales o de neuronas sensoriales recién diferenciadas, que participan en la formación de los órganos sensoriales en el embrión y en el adulto. Pero al parecer, la función de *fh* no es igual de importante en todos los órganos sensoriales, ya que la modificación de su expresión en los órganos cordotonales no produce ninguna alteración significativa.

Es posible que, junto con las alteraciones descritas en las estructuras sensoriales, el proceso de transmisión y procesamiento de la información sensorial también esté afectado. Dicho proceso necesita de la activación de canales iónicos, de la remodelación de citoesqueletos celulares, de movimientos o fusiones de vesículas sinápticas, etc., lo cual requiere un enorme aporte de energía que suponemos está alterado en nuestros mutantes.

Nuestros resultados reflejan los fenotipos característicos de mutaciones en genes mitocondriales de *Drosophila* (Toivonen *et al.*, 2001), como problemas sensoriales, letalidad en estadios de generación de biomasa como son el estadio larvario y la pupación, porque estos procesos requieren mucha energía y ésta se encuentra limitada en tales mutantes, etc.

Todos los resultados descritos permiten establecer un modelo, en *D. melanogaster*, de estudio de la AF. Se trataría del primer modelo, en la mosca, de una ataxia recesiva y uno de los primeros trabajos que emplean la interferencia de ARN para reproducir las características de una patología.

A pesar de todo, el camino es largo y son necesarios estudios a nivel de ultraestructura de tejidos y análisis a nivel bioquímico que demuestren la equivalencia de la función de *fh* entre *Drosophila* y el ser humano.

CONCLUSIONES



1. Los experimentos de movilización con los elementos P1468 y EP1598 han permitido identificar la existencia de dos puntos calientes de inserción para elementos transponibles P a ambos lados del gen *fh*, a 16 y 8kb, respectivamente. Al analizar la localización de las diferentes líneas generadas por los proyectos de interrupción de genes se confirman tales puntos e incluso se añade un tercero. Este dato, junto con la densidad génica de la región y el tamaño del gen *fh*, indican que la mutagénesis insercional no es un buen sistema para alterar el gen *fh*.
2. La supresión de la expresión del gen *fh* en el mesodermo somático, en estadios iniciales de desarrollo del sistema nervioso periférico y en el corazón embrionario, provoca la aparición de 100% de letalidad en fase de pupa madura, lo cual indica que *fh* es un gen esencial en el desarrollo de *Drosophila*.
3. Los individuos en los que se ha reducido la expresión de *fh* mediante líneas GAL4 de expresión en los músculos indirectos de vuelo, en el sistema nervioso periférico y en las neuronas motoras, presentan una menor capacidad de supervivencia y de locomoción.
4. La reducción de la expresión de *fh* en los progenitores de los órganos sensoriales del adulto y en discos imaginales de pata, produce la ausencia de las macroquetas inferiores del *scutellum* y de dos segmentos tarsales del primer par de patas, respectivamente. Ambos defectos pueden ser de utilidad para llevar a cabo rastreos genéticos que nos permitan identificar proteínas que interactúen con la frataxina de *Drosophila*.
5. La sobreexpresión del gen *fh* provoca, con las mismas líneas GAL4, el mismo tipo de alteraciones que la interferencia del gen, aunque con un efecto mucho más acusado. Esto indica que en ambos casos se está afectando a los mismos sistemas y/o procesos.

conclusiones

6. La sobreexpresión del gen *fh* en los dominios de establecimiento de los derivados mesodérmicos y del sistema nervioso produce en el embrión alteraciones musculares, huecos en el corazón, anomalías en algunos conjuntos de células sensoriales, defectos en las proyecciones axonales sensoriales y motoras y ausencia de las neuronas EL del hemisegmento abdominal izquierdo A2. Este conjunto de defectos podrían explicar el movimiento significativamente más lento de las larvas sobreexpresadas.
7. Cuando el gen *fh* se sobreexpresa mediante líneas GAL4 de expresión en el sistema nervioso periférico y en las neuronas motoras, se observa una profunda disminución de la capacidad de supervivencia y de la capacidad locomotora de los adultos.
8. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los tejidos más afectados en la AF también están seriamente afectados en *Drosophila*, por lo que este organismo puede ser un modelo adecuado para el estudio de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA



- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M. y Isaya, G. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 549-562 (2000).
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M. y Venter, J.C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195 (2000).
- Ahmed, A., Chandra, S., Magarinos, M. y Vaessin, H. Echinoid mutants exhibit neurogenic phenotypes and show synergistic interactions with the Notch signaling pathway. *Development* **130**, 6295-6304 (2003).
- Akhmanova, A.S., Bindels, P.C., Xu, J., Miedema, K., Kremer, H. y Hennig, W. Structure and expression of histone H3.3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome* **38**, 586-600 (1995).
- Altschul, S.F., Stephen, F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402 (1997).
- Arbeitman, M.N., Furlong, E.E., Imam, F., Johnson, E., Null, B.H., Baker, B.S., Krasnow, M.A., Scott, M.P., Davis, R.W. y White, K.P. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* **297**, 2270-2275 (2002).

bibliografía

- Ashburner,M., Golic,K.G. y Scott, R.** *Drosophila* a Laboratoty Handbook. 2nd Edition. Cold Spring Harbour Press (2004).
- Ashburner,M.** *Drosophila* a Laboratoty Handbook. New York, USA, Cold Spring Harbour Press (1989).
- Ayyub,C., Sen,A., Gonsalves,F., Badrinath,K., Bhandari,P., Shashidhara,L.S., Krishna,S. y Rodrigues,V.** Cullin-5 plays multiple roles in cell fate specification and synapse formation during *Drosophila* development. *Dev. Dyn.* **232**, 865-875 (2005).
- Babcock,M., de Silva,D., Oaks,R., Davis-Kaplan,S., Jiralerspong,S., Montermini,L., Pandolfo,M. y Kaplan,J.** Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709-1712 (1997).
- Bate M.** The Mesoderm and its derivates (cap.17) en The Development od *Drosophila melanogaster*. Bate M. y Martínez-Arias A. Cold Spring Harbour Press (1993).
- Baylies,M.K. y Michelson,A.M.** Invertebrate myogenesis: looking back to the future of muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 431-439 (2001).
- Beinert,N., Werner,M., Dowe,G., Chung,H.R., Jackle,H. y Schafer,U.** Systematic gene targeting on the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (2004).
- Bellen,H.J., Grossniklaus,U., O’Kane,C., Pearson,R.K., Wilson,C. y Gehering,W.** The little Blue Book. (1988).
- Bellen,H.J., Levis,R.W., Liao,G., He,Y., Carlson,J.W., Tsang,G., Evans-Holm,M., Hiesinger,P.R., Schulze,K.L., Rubin,G.M., Hoskins,R.A. y Spradling,A.C.** The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**, 761-781 (2004).
- Bender,W. y Hudson,A.** P element homing to the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **127**, 3981-3992 (2000).
- Berg,C.A. y Spradling,A.C.** Studies on the rate and site-specificity of P element transposition. *Genetics* **127**, 515-524 (1991).
- Bhole,D., Allikian,M.J., y Tower,J.** Doxycycline-regulated over-expression of hsp22 has negative effects on stress resistance and life span in adult *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 651-663 (2004).
- Bier,E. y Bodmer,R.** *Drosophila*, an emerging model for cardiac disease. *Gene* **342**, 1-11 (2004).
- Bier,E.** *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 9-23 (2005).
- Blanca,J.M.** Tesis Doctoral “Caracterización y Análisis Molecular de la Zona Homóloga, en *D. melanogaster*, al gen responsable de la Ataxia de Friedreich” (2001).
- Bodmer,R. y Venkatesh,T.V.** Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev. Genet.* **22**, 181-186 (1998).

- Boehringer Mannheim** GMBH, Biochemica. The DIG System User's Guide for Filter Hybridization (1993).
- Boehringer Mannheim** GMBH, Biochemica. Nonradiative In Situ Hybridization Application Manual (1996).
- Bonini,N.M.** *Drosophila* as a genetic approach to human neurodegenerative disease. **7**, 171-175 (2001).
- Bosher,J.M. y Labouesse,M.** RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* **2**, E31-E36 (2000).
- Bossing,T., Udolph,G., Doe,C.Q. y Technau,G.M.** The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **179**, 41-64 (1996).
- Bourbon,H.M., Gonzy-Treboul,G., Peronnet,F., Alin,M.F., Ardourel,C., Benassayag,C., Cribbs,D., Deutsch,J., Ferrer,P., Haenlin,M., Lepesant,J.A., Noselli,S. y Vincent,A.** A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **110**, 71-83 (2002).
- Brand,A.H. y Perrimon,N.** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415 (1993).
- Brand,A.H., Manoukian,A.S., y Perrimon,N.** Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.* **44**, 635-654 (1994).
- Bulteau,A.L., O'Neill,H.A., Kennedy,M.C., Ikeda-Saito,M., Isaya,G. y Szweda,L.I.** Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**, 242-245 (2004).
- Busi,M.V., Zabaleta,E.J., Araya,A. y Gomez-Casati,D.F.** Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **576**, 141-144 (2004).
- Campanella,A., Isaya,G., O'Neill,H.A., Santambrogio,P., Cozzi,A., Arosio,P. y Levi,S.** The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum. Mol. Genet* **19**, 2279-2288 (2004).
- Campos-Ortega,J.A.** Early Neurigenesis in *Drosophila melanogaster* (cap.18) en The Development od *Drosophila melanogaster*. Bate M. y Martínez-Arias A. Cold Spring Harbour Press (1993).
- Campuzano,V., Montermini,L., Molto,M.D., Pianese,L., Cossee,M., Cavalcanti,F., Monros,E., Rodius,F., Duclos,F., Monticelli,A., Zara,F., Cañizares,J., Koutnikova,H., Bidichandani,S.I., Gellera,C., Brice,A., Trouillas,P., De Michele,G., Filla,A., De Frutos,R., Palau,F., Patel,P.I., Di Donato,S., Mandel,JL., Coccozza,S., Koenig,M. y Pandolfo,M.** Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427 (1996).
- Campuzano,V., Montermini,L., Lutz,Y., Cova,L., Hindelang,C., Jiralerspong,S., Trottier,Y., Kish,S.J., Faucheux,B., Trouillas,P., Authier,F.J., Durr,A., Mandel,J.L., Vescovi,A.,**

bibliografía

- Pandolfo,M. y Koenig,M.** Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771-1780 (1997).
- Cañizares,J., Blanca,J.M., Navarro,J.A., Monros,E., Palau,F. y Molto,M.D.** dfh is a *Drosophila* homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene* **256**, 35-42 (2000).
- Cavadini,P., Adamec,J., Taroni,F., Gakh,O. y Isaya,G.** Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J. Biol. Chem.* **275**, 41469-41475 (2000).
- Celniker,S.E. y Rubin,G.M.** The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**, 89-117 (2003).
- Chen,O.S. y Kaplan,J.** YFH1-mediated iron homeostasis is independent of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* **509**, 131-134 (2001).
- Chen,O.S., Hemenway,S., y Kaplan,J.** Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 12321-12326 (2002).
- Cooley,L., Kelley,R. y Spradling,A.** Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**, 1121-1128 (1988).
- Cossee,M., Puccio,H., Gansmuller,A., Koutnikova,H., Dierich,A., LeMeur,M., Fischbeck,K., Dolle,P. y Koenig,M.** Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219-1226 (2000).
- Cripps,R.M. y Olson,E.N.** Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev. Biol.* **246**, 14-28 (2002).
- De Frutos,R., Kimura,K. y Peterson,K.** *In situ* hibridizationod *Drosophila* Polytene Chromosomas with Diogoxigenin-dUTP Labeled Probes. *Methods in Molecular and Cellular biology* **2**: 32-38 (1990).
- Delatycki,M.B., Williamson,R. y Forrest,S.M.** Friedreich ataxia: an overview. *J. Med. Genet.* **37**, 1-8 (2000).
- Dennis,P.B., Jaeschke,A., Saitoh,M., Fowler,B., Kozma,S.C. y Thomas,G.** Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* **294**, 1102-1105 (2001).
- Dhe-Paganon,S., Shigeta,R., Chi,Y.I., Ristow,M. y Shoelson,S.E.** Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30753-30756 (2000).
- Di Donato,S., Pandolfo,M., Finocchiaro,G. y Protti,A.** Skeletal muscle malic enzymes: a study in Friedreich's disease. *Int. J. Neurol. Sci. Suppl.* **275**, 34-40 (1984).
- Duffy,J.B.** GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* **34**, 1-15 (2002).
- Dworak,H.A. y Sink,H.** Myoblast fusion in *Drosophila*. *Bioessays* **24**, 591-601 (2002).

- Dzitoyeva,S., Dimitrijevic,N. y Manev,H.** Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol. Psychiatry* **6**, 665-670 (2001).
- Eggleston,P. y Exley,K.A.** Chromosome interactions in P-M dysgenic male recombination of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* **60**, 165-174 (1992).
- Enerly,E., Larsson,J. y Lambertsson,A.** Reverse genetics in *Drosophila*: from sequence to phenotype using UAS-RNAi transgenic flies. *Genesis.* **34**, 152-155 (2002).
- Feany,M.B. y Bender,W.W.** A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394-398 (2000).
- Felix,M.A.** Genomes: a helpful cousin for our favourite worm. *Curr. Biol.* **14**, R75-R77 (2004).
- Fernandes,J.J. y Keshishian,H.** Motoneurons regulate myoblast proliferation and patterning in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **277**, 493-505 (2005).
- Fernandez-Funez,P., Nino-Rosales,M.L., de Gouyon,B., She,W.C., Luchak,J.M., Martinez,P., Turiegano,E., Benito,J., Capovilla,M., Skinner,P.J., McCall,A., Canal,I., Orr,H.T., Zoghbi,H.Y. y Botas,J.** Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* **408**, 101-106 (2000).
- Ferrus,A., Acebes,A., Marin,M.C. y Hernandez-Hernandez,A.** A genetic approach to detect muscle protein interactions in vivo. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 293-298 (2000).
- Fire,A., Albertson,D., Harrison,S.W., y Moerman,D.G.** Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* **113**, 503-514 (1991).
- Fischer,J.A., Giniger,E., Maniatis,T. y Ptashne,M.** GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* **332**, 853-856 (1988).
- Foury,F. y Cazzalini,O.** Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **411**, 373-377 (1997).
- Foury,F.** Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett.* **456**, 281-284 (1999).
- Frasch,M.** Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 522-529 (1999).
- Freeman,M.** Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **87**, 651-660 (1996).
- Geley,S. y Muller,C.** RNAi: ancient mechanism with a promising future. *Exp. Gerontol.* **39**, 985-998 (2004).
- Gerber,J., Muhlenhoff,U. y Lill,R.** An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906-911 (2003).

bibliografía

- Giordano,E., Rendina,R., Peluso,I. y Furia,M.** RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 637-648 (2002).
- Giot,L., Bader,J.S., Brouwer,C., Chaudhuri,A., Kuang,B., Li,Y., Hao,Y.L., Ooi,C.E., Godwin,B., Vitols,E., Vijayadamar,G., Pochart,P., Machineni,H., Welsh,M., Kong,Y., Zerhusen,B., Malcolm,R., Varrone,Z., Collis,A., Minto,M., Burgess,S., McDaniel,L., Stimpson,E., Spriggs,F., Williams,J., Neurath,K., Ioime,N., Agee,M., Voss,E., Furtak,K., Renzulli,R., Aanensen,N., Carrola,S., Bickelhaupt,E., Lazovatsky,Y., DaSilva,A., Zhong,J., Stanyon,C.A., Finley,R.L., Jr., White,K.P., Braverman,M., Jarvie,T., Gold,S., Leach,M., Knight,J., Shimkets,R.A., McKenna,M.P., Chant,J. y Rothberg,J.M.** A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736 (2003).
- Girardot,F., Monnier,V. y Tricoire,H.** Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. *BMC. Genomics* **5**, 74 (2004).
- Goodman,C.S. y Doe,C.Q.** Embryonic Development of the *Drosophila* Central Nervous System (cap.19) en The Development of *Drosophila melanogaster*. Bate M. y Martínez-Arias A. Cold Spring Harbour Press (1993).
- Gong,W.J. y Golic,K.G.** Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 2556-2561 (2003).
- Gonzalez-Cabo,P., Vazquez-Manrique,R.P., Garcia-Gimeno,M.A., Sanz,P. y Palau,F.** Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2091-2098 (2005).
- Gorfinkiel,N., Morata,G. y Guerrero,I.** The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 2259-2271 (1997).
- Greene,J.C., Whitworth,A.J., Kuo,I., Andrews,L.A., Feany,M.B. y Pallanck,L.J.** Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 4078-4083 (2003).
- Greenspan,R.J.** Fly Pushing. The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics. Cold Spring Harbour Press (1997).
- Gu,G., Yang,J., Mitchell,K.A. y O'Tousa,J.E.** *Drosophila* *ninaB* and *ninaD* act outside of retina to produce rhodopsin chromophore. *J. Biol. Chem.* **279**, 18608-18613 (2004).
- Guo,S. y Kempfues,K.J.** *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620 (1995).
- Hama,C., Ali,Z. y Kornberg,T.B.** Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. *Genes Dev.* **4**, 1079-1093 (1990).
- Handler,A.M. y Harrell,R.A.** Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol. Biol.* **8**, 449-457 (1999).
- Harding,A.E.** Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* **104**, 589-620 (1981).

- Hartenstein V.** Atlas of *Drosophila* Development. Cold Spring Harbour Press (1993).
- Hayashi,S., Ito,K., Sado,Y., Taniguchi,M., Akimoto,A., Takeuchi,H., Aigaki,T., Matsuzaki,F., Nakagoshi,H., Tanimura,T., Ueda,R., Uemura,T., Yoshihara,M. y Goto,S.** GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis*. **34**, 58-61 (2002).
- Hazelrigg,T., Levis,R. y Rubin,G.M.** Transformation of white locus DNA in *Drosophila*: dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell* **36**, 469-481 (1984).
- Heberlein,U.** Genetics of alcohol-induced behaviors in *Drosophila*. *Alcohol Res. Health* **24**, 185-188 (2000).
- Helfand,S.L. y Rogina,B.** From genes to aging in *Drosophila*. *Adv. Genet.* **49**, 67-109 (2003).
- Hennig,K.M. y Neufeld,T.P.** Inhibition of cellular growth and proliferation by dTOR overexpression in *Drosophila*. *Genesis*. **34**, 107-110 (2002).
- Henrich,T., Ramialison,M., Segerdell,E., Westerfield,M., Furutani-Seiki,M., Wittbrodt,J. y Kondoh,H.** GSD: a genetic screen database. *Mech. Dev.* **121**, 959-963 (2004).
- Hidalgo,A.** Neuron-glia interactions during axon guidance in *Drosophila*. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 50-55 (2003).
- Hinz,U., Giebel,B. y Campos-Ortega,J.A.** The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77-87 (1994).
- Horn,C., Offen,N., Nystedt,S., Hacker,U. y Wimmer,E.A.** piggyBac-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. *Genetics* **163**, 647-661 (2003).
- Hoskins,R.A., Nelson,C.R., Berman,B.P., Lavery,T.R., George,R.A., Ciesiolka,L., Naeemuddin,M., Arenson,A.D., Durbin,J., David,R.G., Tabor,P.E., Bailey,M.R., DeShazo,D.R., Catanese,J., Mammoser,A., Osoegawa,K., de Jong,P.J., Celniker,S.E., Gibbs,R.A., Rubin,G.M. y Scherer,S.E.** A BAC-based physical map of the major autosomes of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2271-2274 (2000).
- Hoskins,R.A., Smith,C.D., Carlson,J.W., Carvalho,A.B., Halpern,A., Kaminker,J.S., Kennedy,C., Mungall,C.J., Sullivan,B.A., Sutton,G.G., Yasuhara,J.C., Wakimoto,B.T., Myers,E.W., Celniker,S.E., Rubin,G.M. y Karpen,G.H.** Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Genome Biol.* **3** (2002).
- Hrdlicka,L., Gibson,M., Kiger,A., Micchelli,C., Schober,M., Schock,F. y Perrimon,N.** Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*. **34**, 51-57 (2002).
- Iijima,K., Liu,H.P., Chiang,A.S., Hearn,S.A., Konsolaki,M., y Zhong,Y.** Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6623-6628 (2004).
- Inbal,A., Levanon,D., y Salzberg,A.** Multiple roles for u-turn/ventral veinless in the development of *Drosophila* PNS. *Development* **130**, 2467-2478 (2003).

bibliografía

- Jackson,G.R.** Polyglutamine-expanded human Huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neuron. *Neuron* **21**, 633-642 (1998).
- Jacobs,H.T., Fernandez-Ayala,D.J., Manjiry,S., Kemppainen,E., Toivonen,J.M. y O'Dell,K.M.** Mitochondrial disease in flies. *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 190-196 (2004).
- Jan,Y.N. y Jan,L.Y.** The Peripheral Nervous System (cap.20) en The Development of *Drosophila melanogaster*. Bate M. y Martínez-Arias A. Cold Spring Harbour Press (1993).
- Jasny,B.R.** The universe of *Drosophila* genes. *Science* **287**, 2181 (2000).
- Jhaveri,D., Sen,A., Reddy,G.V. y Rodrigues,V.** Sense organ identity in the *Drosophila* antenna is specified by the expression of the proneural gene atonal. *Mech. Dev.* **99**, 101-111 (2000).
- Junakovic,N., Caneva,R. y Ballario,P.** Genomic distribution of copia-like elements in laboratory stocks of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **90**, 378-372 (1984).
- Kalidas,S. y Smith,D.P.** Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* **33**, 177-184 (2002).
- Karthikeyan,G., Lewis,L.K. y Resnick,M.A.** The mitochondrial protein frataxin prevents nuclear damage. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1351-1362 (2002).
- Kaufman,P.D. y Rio,D.C.** *Drosophila* P-element transposase is a transcriptional repressor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 2613-2617 (1991).
- Kennerdell,J.R. y Carthew,R.W.** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026 (1998).
- Kennerdell,J.R. y Carthew,R.W.** Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat. Biotechnol.* **18**, 896-898 (2000).
- Keshishian,H., Broadie,K., Chiba,A. y Bate,M.** The *Drosophila* neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 545-575 (1996).
- Kidwell,M.G.** P-M mutagenesis. pp 59-82 in *Drosophila: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford (1977).
- Kidwell,M.G., Kidwell,J.A. y Sved,J.A.** Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: A syndrome of aberrant traits including mutation, sterility, and male recombination. *Genetics* **86**, 813-833 (1986).
- Kimmerly,W., Stultz,K., Lewis,S., Lewis,K., Lustre,V., Romero,R., Benke,J., Sun,D., Shirley,G., Martin,C. y Palazzolo,M.** A P1-based physical map of the *Drosophila* euchromatic genome. *Genome Res.* **6**, 414-430 (1996).
- Klapper,R.** The longitudinal visceral musculature of *Drosophila melanogaster* persists through metamorphosis. *Mech. Dev.* **95**, 47-54 (2000).

- Klein,T. y Campos-Ortega,J.A.** klumpfuss, a *Drosophila* gene encoding a member of the EGR family of transcription factors, is involved in bristle and leg development. *Development* **124**, 3123-3134 (1997).
- Kornberg,T.B. y Krasnow,M.A.** The *Drosophila* genome sequence: implications for biology and medicine. *Science* **287**, 2218-2220 (2000).
- Krebs,R.A. y Feder,M.E.** Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress. Chaperones.* **2**, 60-71 (1997).
- Landgraf,M., Bossing,T., Technau,G.M. y Bate,M.** The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **17**, 9642-9655 (1997).
- Lee,Y.S. y Carthew,R.W.** Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-329 (2003).
- Lemaitre,B., Ronsseray,S. y Coen,D.** Maternal repression of the P element promoter in the germline of *Drosophila melanogaster*: a model for the P cytotype. *Genetics* **135**, 149-160 (1993).
- Leopold,P.** Neuronal differentiation: TOR and insulin receptor pathways set the tempo. *Cell* **119**, 4-5 (2004).
- Lewis,E.B. y Bacher,F.** Methods of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Inf. Service* **43** (1968).
- Lewis,S.E., Searle,S.M., Harris,N., Gibson,M., Lyer,V., Richter,J., Wiel,C., Bayraktaroglu,L., Birney,E., Crosby,M.A., Kaminker,J.S., Matthews,B.B., Prochnik,S.E., Smithy,C.D., Tupy,J.L., Rubin,G.M., Misra,S., Mungall,C.J. y Clamp,M.E.** Apollo: a sequence annotation editor. *Genome Biol.* **3** (2002).
- Li,H., Chaney,S., Roberts,I.J., Forte,M. y Hirsh,J.** Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **10**, 211-214 (2000).
- Liao,G.C., Rehm,E.J. y Rubin,G.M.** Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 3347-3351 (2000).
- Lindsley,D.L. y Zimm G.G.** The Genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, Academic Press, Inc (1992).
- Lodi,R., Cooper,J.M., Bradley,J.L., Manners,D., Styles,P., Taylor,D.J. y Schapira,A.H.** Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11492-11495 (1999).
- Madueno,E., Papagiannakis,G., Rimmington,G., Saunders,R.D., Savakis,C., Siden-Kiamos,I., Skavdis,G., Spanos,L., Trenear,J., Adam,P., Ashburner,M., Benos,P., Bolshakov,V.N., Coulson,D., Glover,D.M., Hermann,S., Kafatos,F.C., Louis,C., Majerus,T. Y Modolell,J.** A physical map of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*: cosmid contigs and sequence tagged sites. *Genetics* **139**, 1631-1647 (1995).
- Manev,H., Dimitrijevic,N. y Dzitoyeva,S.** Techniques: fruit flies as models for neuropharmacological research. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 41-43 (2003).

bibliografía

- Manh,T.P., Mokrane,M., Georghenthum,E., Flavigny,J., Carrier,L., Semeriva,M., Piovant,M. y Roder,L.** Expression of cardiac myosin-binding protein-C (cMyBP-C) in *Drosophila* as a model for the study of human cardiomyopathies. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 7-17 (2005).
- Manseau,L., Baradaran,A., Brower,D., Budhu,A., Elefant,F., Phan,H., Philp,A.V., Yang,M., Glover,D., Kaiser,K., Palter,K. y Selleck,S.** GAL4 enhancer traps expressed in the embryo, larval brain, imaginal discs, and ovary of *Drosophila*. *Dev. Dyn.* **209**, 310-322 (1997).
- McGuire,S.E., Roman,G. y Davis,R.L.** Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet.* **20**, 384-391 (2004).
- Meister,G. y Tuschl,T.** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349 (2004).
- Migeon,J.C., Garfinkel,M.S. y Edgar,B.A.** Cloning and characterization of peter pan, a novel *Drosophila* gene required for larval growth. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1733-1744 (1999).
- Miklos,G.L. y Rubin,G.M.** The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* **86**, 521-529 (1996).
- Milan,M., Campuzano,S. y Garcia-Bellido,A.** Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 5691-5696 (1997).
- Min,K.T. y Benzer,S.** Spongecake and eggroll: two hereditary diseases in *Drosophila* resemble patterns of human brain degeneration. *Curr. Biol.* **7**, 885-888 (1997).
- Min,K.T. y Benzer,S.** Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant bubblegum. *Science* **284**, 1985-1988 (1999).
- Miranda,C.J., Santos,M.M., Ohshima,K., Smith,J., Li,L., Bunting,M., Cossee,M., Koenig,M., Sequeiros,J., Kaplan,J. y Pandolfo,M.** Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* **512**, 291-297 (2002).
- Miranda,C.J., Santos,M.M., Ohshima,K., Tessaro,M., Sequeiros,J. y Pandolfo,M.** Frataxin overexpressing mice. *FEBS Lett.* **572**, 281-288 (2004).
- Misquitta,L. y Paterson,B.M.** Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1451-1456 (1999).
- Montgomery,M.K., Xu,S. y Fire,A.** RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 15502-15507 (1998).
- Morimura,S., Maves,L., Chen,Y. y Hoffmann,F.M.** decapentaplegic overexpression affects *Drosophila* wing and leg imaginal disc development and wingless expression. *Dev. Biol.* **177**, 136-151 (1996).
- Mungall,C.J., Misra,S., Berman,B.P., Carlson,J., Frise,E., Harris,N., Marshall,B., Shu,S., Kaminker,J.S., Prochnik,S.E., Smith,C.D., Smith,E., Tupy,J.L., Wiel,C., Rubin,G.M. y Lewis,S.E.** An integrated computational pipeline and database to support whole-genome sequence annotation. *Genome Biol.* **3** (2002).

- Mutsuddi,M. y Nambu,J.R.** Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause. *Curr. Biol.* **8**, R809-R811 (1998).
- Mutsuddi,M., Marshall,C.M., Benzow,K.A., Koob,M.D. y Rebay,I.** The spinocerebellar ataxia 8 noncoding RNA causes neurodegeneration and associates with stau68 in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **14**, 302-308 (2004).
- Nagai,Y., Fujikake,N., Ohno,K., Higashiyama,H., Popiel,H.A., Rahadian,J., Yamaguchi,M., Strittmatter,W.J., Burke,J.R. y Toda,T.** Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1253-1259 (2003).
- Negeri,D., Eggert,H., Gienapp,R. y Saumweber,H.** Inducible RNA interference uncovers the *Drosophila* protein Bx42 as an essential nuclear cofactor involved in Notch signal transduction. *Mech. Dev.* **117**, 151-162 (2002).
- O'Hare,K. y Rubin,G.M.** Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34**, 25-35 (1983).
- O'Kane,C.J. y Gehring,W.J.** Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 9123-9127 (1987).
- O'Kane,C.J.** Modelling human diseases in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 3-10 (2003).
- Ohler,U., Liao,G.C., Niemann,H. y Rubin,G.M.** Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* **3** (2002).
- Ohshima,K., Montermini,L., Wells,R.D. y Pandolfo,M.** Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 14588-14595 (1998).
- Oldham,S., Montagne,J., Radimerski,T., Thomas,G., y Hafen,E.** Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.* **14**, 2689-2694 (2000).
- Orr,W.C., Mockett,R.J., Benes,J.J. y Sohal,R.S.** Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **278**, 26418-26422 (2003).
- Pal-Bhadra,M., Bhadra,U. y Birchler,J.A.** Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell* **90**, 479-490 (1997).
- Palau,F.** Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis (Review). *Int. J. Mol. Med.* **7**, 581-589 (2001).
- Pandolfo,M. y Koenig,M.** Friedreich's Ataxia (cap26) en Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases. Academic Press (1998).

bibliografía

- Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P. y Boulianne, G.L. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* **19**, 171-174 (1998).
- Parkes, T.L., Hilliker, A.J. y Phillips, J.P. Motorneurons, reactive oxygen, and life span in *Drosophila*. *Neurobiol. Aging* **20**, 531-535 (1999).
- Parks, A.L., Cook, K.R., Belvin, M., Dompe, N.A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L.R., Winter, C.G., Bogart, K.P., Deal, J.E., Deal-Herr, M.E., Grant, D., Marcinko, M., Miyazaki, W.Y., Robertson, S., Shaw, K.J., Tabios, M., Vysotskaia, V., Zhao, L., Andrade, R.S., Edgar, K.A., Howie, E., Killpack, K., Milash, B., Norton, A., Thao, D., Whittaker, K., Winner, M.A., Friedman, L., Margolis, J., Singer, M.A., Kopczynski, C., Curtis, D., Kaufman, T.C., Plowman, G.D., Duyk, G. y Francis-Lang, H.L. Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* **36**, 288-292 (2004).
- Pendleton, R.G., Parvez, F., Sayed, M. y Hillman, R. Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 91-96 (2002).
- Pennisi, E. Ideas fly at gene-finding jamboree. *Science* **287**, 2182-2184 (2000).
- Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P., Benos, P.V., Gatt, M.K., Murphy, L., Harris, D., Barrell, B., Ferraz, C., Vidal, S., Brun, C., Demaille, J., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Borkova, D., Minana, B., Kafatos, F.C., Bolshakov, S., Siden-Kiamos, I., Papagiannakis, G., Spanos, L., Louis, C., Madueno, E., de Pablos, B., Modolell, J., Bucheton, A., Callister, D., Campbell, L., Henderson, N.S., McMillan, P.J., Salles, C., Tait, E., Valenti, P., Saunders, R.D., Billaud, A., Pachter, L., Klapper, R., Janning, W., Glover, D.M., Ashburner, M., Bellen, H.J., Jackle, H. y Schafer, U. Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* **3**, 34-38 (2002).
- Phillips, J.P., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Boulianne, G.L., Kirby, K. y Hilliker, A.J. Subunit-destabilizing mutations in *Drosophila* copper/zinc superoxide dismutase: neuropathology and a model of dimer dysequilibrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 8574-8578 (1995).
- Phillips, J.P., Parkes, T.L. y Hilliker, A.J. Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* **35**, 1157-1164 (2000).
- Pianese, L., Busino, L., De Biase, I., De Cristofaro, T., Lo Casale, M.S., Giuliano, P., Monticelli, A., Turano, M., Criscuolo, C., Filla, A., Varrone, S. y Coccozza, S. Up-regulation of c-Jun N-terminal kinase pathway in Friedreich's ataxia cells. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2989-2996 (2002).
- Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C.P. y Costa, R. Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.* **29**, E55 (2001).
- Pirrotta, V., Steller, H. y Bozzetti, M.P. Multiple upstream regulatory elements control the expression of the *Drosophila* white gene. *EMBO J.* **4**, 3501-3508 (1985).

- Potaman,V.N., Oussatcheva,E.A., Lyubchenko,Y.L., Shlyakhtenko,L.S., Bidichandani,S.I., Ashizawa,T. y Sinden,R.R.** Length-dependent structure formation in Friedreich ataxia (GAA) n^* (TTC) n repeats at neutral pH. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1224-1231 (2004).
- Priller,J., Scherzer,C.R., Faber,P.W., MacDonald,M.E. y Young,A.B.** Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann. Neurol.* **42**, 265-269 (1997).
- Puccio,H., Simon,D., Cossee,M., Criqui-Filipe,P., Tiziano,F., Melki,J., Hindelang,C., Matyas,R., Rustin,P. y Koenig,M.** Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181-186 (2001).
- Radisky,D.C., Babcock,M.C. y Kaplan,J.** The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J. Biol. Chem.* **274**, 4497-4499 (1999).
- Ramazzotti,A., Vanmansart,V. y Foury,F.** Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **557**, 215-220 (2004).
- Ravikumar,B., Vacher,C., Berger,Z., Davies,J.E., Luo,S., Oroz,L.G., Scaravilli,F., Easton,D.F., Duden,R., O'Kane,C.J. y Rubinsztein,D.C.** Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**, 585-595 (2004).
- Reiter,L.T., Potocki,L., Chien,S., Gribskov,M. y Bier,E.** A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**, 1114-1125 (2001).
- Rintelen,F., Hafen,E. y Nairz,K.** The *Drosophila* dual-specificity ERK phosphatase DMKP3 cooperates with the ERK tyrosine phosphatase PTP-ER. *Development* **130**, 3479-3490 (2003).
- Ristow,M., Pfister,M.F., Yee,A.J., Schubert,M., Michael,L., Zhang,C.Y., Ueki,K., Michael,M.D., Lowell,B.B. y Kahn,C.R.** Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 12239-12243 (2000).
- Robertson,H.M., Preston,C.R., Phillis,R.W., Johnson-Schlitz,D.M., Benz,W.K. y Engels,W.R.** A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 461-470 (1988).
- Rogina,B., Benzer,S. y Helfand,S.L.** *Drosophila* drop-dead mutations accelerate the time course of age-related markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6303-6306 (1997).
- Rong,Y.S. y Golic,K.G.** Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* **288**, 2013-2018 (2000).
- Rorth,P.** A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 12418-12422 (1996).
- Rorth,P., Szabo,K., Bailey,A., Laverty,T., Rehm,J., Rubin,G.M., Weigmann,K., Milan,M., Benes,V., Ansorge,W. y Cohen,S.M.** Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-1057 (1998).

bibliografía

- Rotig,A., de Lonlay,P., Chretien,D., Foury,F., Koenig,M., Sidi,D., Munnich,A. y Rustin,P.** Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215-217 (1997).
- Rotig,A., Sidi,D., Munnich,A. y Rustin,P.** Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol. Med.* **8**, 221-224 (2002).
- Roy,S. y VijayRaghavan,K.** Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis. *Bioessays* **21**, 486-498 (1999).
- Rubin,G.M. y Spradling,A.C.** Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353 (1982).
- Rubin,G.M. y Spradling,A.C.** Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6341-6351 (1983).
- Rubin,G.M.** Mobile Genetic elements. Academic Press Orlando FL (1983).
- Rubin,G.M. y Lewis,E.B.** A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science* **287**, 2216-2218 (2000).
- Rueger,B., Thalhammer,J., Obermaier,I. y Gruenewald-Janho,S.** Experimental procedure for the detection of a rare human mRNA with the Dig System. *Frontiers in Bioscience* **2**,(1-5), 1997.
- Ryder,E., Blows,F., Ashburner,M., Bautista-Llacer,R., Coulson,D., Drummond,J., Webster,J., Gubb,D., Gunton,N., Johnson,G., O'Kane,C.J., Huen,D., Sharma,P., Asztalos,Z., Baisch,H., Schulze,J., Kube,M., Kittlaus,K., Reuter,G., Maroy,P., Szidonya,J., Rasmuson-Lestander,A., Ekstrom,K., Dickson,B., Hugentobler,C., Stocker,H., Hafen,E., Lepesant,J.A., Pflugfelder,G., Heisenberg,M., Mechler,B., Serras,F., Corominas,M., Schneuwly,S., Preat,T., Roote,J. y Russell,S.** The DrosDel Collection: A Set of P-Element Insertions for Generating Custom Chromosomal Aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 797-813 (2004).
- Sambrook,J., y Russell,D.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. New York, USA, Cold Spring Harbour Press (2001).
- Sanger,F., Nicklen,S. y Coulson,A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
- Sanson,B., White,P. y Vincent,J.P.** Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**, 627-630 (1996).
- Santos,M.M., Miranda,C.J., Levy,J.E., Montross,L.K., Cossee,M., Sequeiros,J., Andrews,N., Koenig,M. y Pandolfo,M.** Iron metabolism in mice with partial frataxin deficiency. *Cerebellum*. **2**, 146-153 (2003).
- Schmidt,H., Rickert,C., Bossing,T., Vef,O., Urban,J. y Technau,G.M.** The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **189**, 186-204 (1997).

- Seznec,H., Simon,D., Monassier,L., Criqui-Filipe,P., Gansmuller,A., Rustin,P., Koenig,M. y Puccio,H.** Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1017-1024 (2004).
- Seznec,H., Wilson,R.B. y Puccio,H.** 2003 International Friedreich's Ataxia Research Conference, 14-16 February 2003, Bethesda, MD, USA. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 70-82 (2004).
- Seznec,H., Simon,D., Bouton,C., Reutenauer,L., Hertzog,A., Golik,P., Procaccio,V., Patel,M., Drapier,J.C., Koenig,M. y Puccio,H.** Friedreich ataxia, the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* (2004).
- Shoichet,S.A., Baumer,A.T., Stamenkovic,D., Sauer,H., Pfeiffer,A.F., Kahn,C.R., Muller-Wieland,D., Richter,C. y Ristow,M.** Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 815-821 (2002).
- Simon,D., Seznec,H., Gansmuller,A., Carelle,N., Weber,P., Metzger,D., Rustin,P., Koenig,M. y Puccio,H.** Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* **24**, 1987-1995 (2004).
- Skeath,J.B. y Thor,S.** Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 8-15 (2003).
- Sohal,R.S.** Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 37-44 (2002).
- Spradling,A.C., Stern,D.M., Kiss,I., Roote,J., Lavery,T. y Rubin,G.M.** Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 10824-10830 (1995).
- Spradling,A.C., Stern,D., Beaton,A., Rhem,E.J., Lavery,T., Mozden,N., Misra,S. y Rubin,G.M.** The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-177 (1999).
- Stapleton,M., Carlson,J., Brokstein,P., Yu,C., Champe,M., George,R., Guarin,H., Kronmiller,B., Pacleb,J., Park,S., Wan,K., Rubin,G.M. y Celniker,S.E.** A *Drosophila* full-length cDNA resource. *Genome Biol.* **3** (2002).
- Stein,L.D.** Human genome: end of the beginning. *Nature* **431**, 915-916 (2004).
- Sturm,B., Bistrich,U., Schranzhofer,M., Sarsero,J.P., Rauen,U., Scheiber-Mojdehkar,B., de Groot,H., Ioannou,P. y Petrat,F.** Friedreich's ataxia: no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts. A decrease in antioxidative capacity? *J. Biol. Chem.* (2004).
- Su,M.T., Fujioka,M., Goto,T. y Bodmer,R.** The *Drosophila* homeobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a numb-dependent lineage decision. *Development* **126**, 3241-3251 (1999).
- Szabad,J. y Bryant,P.J.** The mode of action of "discless" mutations in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **93**, 240-256 (1982).

bibliografía

- Tabara,H., Grishok,A. y Mello,C.C.** RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-431 (1998).
- Taillebourg,E. y Dura,J.M.** A novel mechanism for P element homing in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6856-6861 (1999).
- Tan,G., Napoli,E., Taroni,F. y Cortopassi,G.** Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin-deficient cells. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1699-1711 (2003).
- Thibault,S.T., Singer,M.A., Miyazaki,W.Y., Milash,B., Dompe,N.A., Singh,C.M., Buchholz,R., Demsky,M., Fawcett,R., Francis-Lang,H.L., Ryner,L., Cheung,L.M., Chong,A., Erickson,C., Fisher,W.W., Greer,K., Hartouni,S.R., Howie,E., Jakkula,L., Joo,D., Killpack,K., Laufer,A., Mazzotta,J., Smith,R.D., Stevens,L.M., Stuber,C., Tan,L.R., Ventura,R., Woo,A., Zakrajsek,I., Zhao,L., Chen,F., Swimmer,C., Kopczynski,C., Duyk,G., Winberg,M.L. y Margolis,J.** A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat. Genet.* **36**, 283-287 (2004).
- Timakov,B., Liu,X., Turgut,I. y Zhang,P.** Timing and targeting of P-element local transposition in the male germline cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 1011-1022 (2002).
- Timmons,L. y Fire,A.** Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854 (1998).
- Tissot,M. y Stocker,R.F.** Metamorphosis in *drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Prog. Neurobiol.* **62**, 89-111 (2000).
- Toivonen,J.M., O'Dell,K.M., Petit,N., Irvine,S.C., Knight,G.K., Lehtonen,M., Longmuir,M., Luoto,K., Touraille,S., Wang,Z., Alziari,S., Shah,Z.H. y Jacobs,H.T.** Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness. *Genetics* **159**, 241-254 (2001).
- Tomancak,P., Beaton,A., Weizmann,R., Kwan,E., Shu,S., Lewis,S.E., Richards,S., Ashburner,M., Hartenstein,V., Celniker,S.E. y Rubin,G.M.** Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol.* **3** (2002).
- Tower,J., Karpen,G.H., Craig,N. y Spradling,A.C.** Preferential transposition of *Drosophila* P elements to nearby chromosomal sites. *Genetics* **133**, 347-359 (1993).
- Tower,J. y Kurapati,R.** Preferential transposition of a *Drosophila* P element to the corresponding region of the homologous chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 484-490 (1994).
- Tseng,J.C., Zollman,S., Chain,A.C. y Laski,F.A.** Splicing of the *Drosophila* P element ORF2-ORF3 intron is inhibited in a human cell extract. *Mech. Dev.* **35**, 65-72 (1991).
- Vaessin,H., Brand,M., Jan,L.Y. y Jan,Y.N.** daughterless is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 935-945 (1994).
- Vázquez,R.P.** Tesis Doctoral “Expresión génica y biología celular de la frataxina en *Caenorhabditis elegans*” (2003).
- Venken,K.J. y Bellen,H.J.** Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 167-178 (2005).

- Ventura,N., Rea,S., Henderson,S.T., Condo,I., Johnson,T.E. y Testi,R.** Reduced expression of frataxin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4**, 109-112 (2005).
- Voncken,M., Ioannou,P. y Delatycki,M.B.** Friedreich ataxia-update on pathogenesis and possible therapies. *Neurogenetics*. **5**, 1-8 (2004).
- Warrick,J.M., Chan,H.Y., Gray-Board, Chai, Y., Paulson,H.L. y Bonini,N.M.** Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70.. *Nat Genet* **23**, 425-428 (1999).
- Webster,N., Jin,J.R., Green,S., Hollis,M. y Chambon,P.** The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**, 169-178 (1988).
- Whiteley,M. y Kassis,J.A.** Rescue of *Drosophila* engrailed mutants with a highly divergent mosquito engrailed cDNA using a homing, enhancer-trapping transposon. *Development* **124**, 1531-1541 (1997).
- Wittmann,C.W., Wszolek,M.F., Shulman,J.M., Salvaterra,P.M., Lewis,J., Hutton,M. y Feany,M.B.** Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293**, 711-714 (2001).
- Wodarz,A., Hinz,U., Engelbert,M. y Knust,E.** Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76 (1995).
- Worby,C.A., Simonson-Leff,N. y Dixon,J.E.** RNA interference of gene expression (RNAi) in cultured *Drosophila* cells. *Sci. STKE*. **2001**, L1 (2001).
- Xie,H.B. y Golic,K.G.** Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **168**, 1477-1489 (2004).
- Zhang,P. y Spradling,A.C.** Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* **133**, 361-373 (1993).
- Zou,S., Meadows,S., Sharp,L., Jan,L.Y. y Jan,Y.N.** Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 13726-13731 (2000).

bibliografia



VNIVERSITATIS VALÈNCIA