

Tesis Doctoral

Caracterización de genes nuevos involucrados en neurodegeneración en *Drosophila melanogaster*

Bernabó, Guillermo

2014-12-22

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bernabó, Guillermo. (2014-12-22). Caracterización de genes nuevos involucrados en neurodegeneración en *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bernabó, Guillermo. "Caracterización de genes nuevos involucrados en neurodegeneración en *Drosophila melanogaster*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-22.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización de genes nuevos involucrados en
neurodegeneración en *Drosophila melanogaster*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Guillermo Bernabó

Director de tesis: Dra. María Fernanda Ceriani
Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir; Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires,
CONICET.

Buenos Aires, Octubre de 2014

Caracterización de genes nuevos involucrados en neurodegeneración en *Drosophila melanogaster*

Resumen

El objetivo de esta tesis es identificar nuevos genes involucrados en neurodegeneración en *Drosophila melanogaster* y comprender su función y el mecanismo por el cual provoca dicha patología. En particular, se hizo foco en *orsai*. Encontramos que adultos envejecidos con la expresión de *orsai* reducida en las neuronas que controlan el comportamiento rítmico locomotor presentaban una caída en la ritmicidad y un alargamiento del período. La reducción de ORSAI en el cerebro adulto envejecido provoca que estos presenten signos de neurodegeneración más severos que sus controles.

También se encontró que la reducción de los niveles de este gen en larvas provoca arresto en el segundo estadio y la consiguiente letalidad temprana. Estas larvas tienen un comportamiento anómalo frente a la comida, alejándose de la misma y reptando en un modo de clásico forrajeo, a pesar de tener alimento disponible, hasta su muerte. Encontramos que acotando la reducción de ORSAI a las tráqueas fenocopia al mutante. También determinamos que la respiración mitocondrial está severamente reducida en el mutante. La alteración de los niveles de ORSAI en distintos tejidos, tanto larvales como adultos, provoca diversos fenotipos, lo que demuestra la importancia de este gen para la homeostasis celular.

El fenotipo en las tráqueas podría, a través de procesos hipóxicos, explicar el comportamiento de forrajeo en larvas y, sumando a esto la disfunción mitocondrial, los fenotipos observados en adultos.

Palabras clave: *Drosophila*, neurodegeneración, mitocondria, comportamiento, larva, alimentación.

Characterization of new genes involved in neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*

Abstract

The goal of this thesis was to identify new genes involved in neurodegeneration in *Drosophila melanogaster* and to understand their function and the mechanisms triggered upon their deregulation. In particular, we focused on *orsai*. We found that aged adult flies with reduced *orsai* expression in neurons that control rhythmic locomotor behavior showed declined rhythmicity and a lengthened period. Reduced ORSAI levels in aged adult brains correlate with signs of neurodegeneration more severe than controls.

We also found that reduced *orsai* levels cause second instar developmental arrest and the ensuing early mortality. These larvae display an anomalous feeding behavior; they crawl away from the food source as if were foraging, and, despite food availability, they do so until their death. We found that limiting ORSAI depletion to the tracheal system phenocopies the mutant behavior. We also determined that mitochondrial respiration is severely reduced in the mutant. Importantly, reducing ORSAI levels in different tissues, both larval as well as adult, triggers diverse phenotypes, highlighting its relevance in cellular homeostasis.

The tracheal phenotype could, through hypoxic processes, account for the abnormal larval foraging behavior and, taking into account the mitochondrial dysfunction, the observed adult phenotypes.

Key words: *Drosophila*, neurodegeneration, mitochondria, behavior, larvae, feeding.

Agradecimientos

Empezando por el labo, presente, pasado y futuro:

Le quiero dar las gracias a Fer, por aceptarme en el labo, por ayudarme con todo (mucho más que lo meramente doctoral), por aguantarme tantos años. Termino el doc con la seguridad de que volvería a elegir su labo y dirección otra vez si volviese a ser un pichón recién recibido.

A Caro por la amistad e iniciarme en las moscas. Por los consejos y la fuerza también.

A Lore, Mariana, Pau, Amaranta y Marta, me quedé con la sensación de que estuvimos poco tiempo compartiendo el labo. Definitivamente me hubiera gustado compartir todos estos años con ustedes. Son la demostración de que lo bueno, si breve, un garrón.

Sí o sí tengo que nombrar a Sebas y a las Sofías, la joven nueva guardia del labo 109. Dejo el labo con la tranquilidad de que está en buenas manos, lleno de buena onda. Sé que a Anastasia le gustaría estar en esta lista, pero ya no es tan joven y su gusto estético deja mucho que desear, así que simplemente digámosle gracias por ser divertida y buena compañera y siempre tener algo *hilarious* que contarnos. ¡Y gracias a Carina “con C” Colque, por supus! Ojalá puedas superar tu adicción a los caramelos.

Con respecto a Maggie (o Margarita y a veces, por qué no, Margarina) le agradezco la confianza en mí para dar sus primeros pasos con las moscas. Es un orgullo ver cómo creciste. ¡Acordate de los controles y todo va a andar bien pequeño saltamontes! Ojalá tengas un futuro laboratoril lleno de maníes.

Beck, Ana y Axel: ustedes hicieron del labo algo mucho más grande que el lugar donde uno pipetea y tortura moscas. Gracias por la amistad dentro y fuera de la FIL. Un honor.

- Esteban Javier, no lo sabés (o por ahí sí) pero te debo el 100% de esto que es doctorarse.
- Axel, por ahí te sorprenda, pero sos un buen ejemplo de un montón de cosas buenas. Cuando sea grande y me crezca la barba quiero ser como vos.
- Ana, gracias por la petaca de whisky que me regalaste y que está en mi cajón “solo para emergencias”. Creo que en breve la estreno. Gracias por el empuje, uno termina aprendiendo cosas.

Last pero no least: el trío de investigadores del labo. A Nico, gracias por la buena onda y enseñarme que la amistad no tiene color. A Nara, a la que debería ni nombrarla para que no llore pero no lo puedo evitar: Gracias por mil cosas, por escuchar, por aconsejar, por estar y cuidarnos a todos. Por la buena onda constante y la lista sigue. Lía, gracias por hacerme atragantar con tu humor negro y muchas veces incomprensible. Gracias por las charlas y la ayuda con todo. Gracias por la confianza. Gracias por las cervezas after lab. Fueron definitivamente esenciales.

A los otros moscólogos de la FIL, los del ex 112, Agos, Juli, Maxi, Joel y Diego (la vieja guardia) que hicieron del cuarto de moscas una experiencia excelente. A la joven guardia también gracias (Aye, Rochi, Ana, Lautá y Dalmo) que no se quedan atrás.

A las reinas de los *screens* del 104, Silcho, Nanu y Lula, gracias por ser un viento fresco en el mundo de las moscas. Un gracias especial a Lula, por haber demostrado misericordia repetidas veces aquella única vez que hicimos *sparring*.

Y finalmente al príncipe azul del mundo de las moscas, a Andrés, el chef gourmet de las moscas. Sin vos mis moscas la hubieran pasado pésimo. ¡Gracias por la buena onda y la magia con la polenta!

También a un montón de gente de Leloir les debo mucho, Bernabé, Dora, Mari, Diego. Los chicos de la biblioteca, los de mantenimiento. Santi, Pame, Gabi, Sole y un montón más de gente con la que el pasillo se vuelve un campo minado de saludos.

Al Eduardo Castaño, Antonia Marín Burgín y Rolando Rivera Pomar que fueron los miembros de mi comisión de seguimiento de tesis. Gracias por los consejos y el interés.

A Lidia Szczupak, consejera de estudios y gurú científico en las cenas de la SAN.

A CONICET, gracias por la mosca.

Yo quería ser breve con los agradecimientos y ya van dos páginas y no empecé ni con los amigos ni con la familia. ¡Una vergüenza! Remediémoslo:

A Lu, a la que le debo muchísimo más que un techo (2x) y mi salud mental (1000X): ¡Infinito punto rojo de gracias! Y obviamente también a Pinedo, partícipe necesario de la versión 2.0 de todo esto.

A Guido, Ceci, Leti y Javi por ser los gurúes que necesité en el momento justo.

A Vani y Pablo por la amistad y sobre todo por hacerme hacer miles de pomodoros y lograr terminar de escribir esto.

A los amigos de la facu, del secundario y de la vida, que le pusieron condimento a estos años. Flor, Clari, Hernán, José, Luis, Eze, Sango, Gonza, Gus, Isa, Nico. ¡Uff! Y todos los que me olvido en este momento.

A Debi y su grupo por enseñarme a escribir. ¡Me cambiaron la vida para mejor!

A Barbi, por la paciencia para enseñarme a dibujar, de a poco va queriendo...

A Martín y Marcela (y su descendencia), porque cada vez que estoy con ustedes tengo la sensación difícil de describir de “estar en casa”.

A los BETs, que fueron una gran ayuda este último tramo.

A los Coatíes, que de alguna forma mágica y perfecta nos encontramos y encajamos. Un montón de piezas sueltas que ahora tiene sentido. Gracias. Mal y fuerte.

A Eli Schneider y Manu Wolfson: por cocinar, por comer, por beber. Por hacer cerveza y tomarla. Por ser amigazos y hermanos. Por mil cosas más.

Y ahora le toca a la familia:

A todos los primos y tíos, porque cuando estamos juntos el mundo se siente distinto.

A Daniel y Xavi, por compararme con Sheldon.

A mis hermanos Sandra y Ernesto, máquinas imparables generadoras de afecto.

A mis viejos, que sin ellos literalmente no estaría acá de tantas formas que asusta.

*A las ausencias,
por estar siempre presentes,
compañeras ineludibles en este fin de ciclo.*

DON'T PANIC!

Douglas Adams, *The Hitchhiker's Guide to the Galaxy*

Índice

Índice.....	1
Introducción.....	4
¿Por qué usar <i>Drosophila melanogaster</i> en el estudio de enfermedades neurodegenerativas? 5	
Ventajas.....	5
Ciclo de vida.....	6
Sistema de expresión UAS/GAL4.....	7
Screens en mosca.....	9
Neurodegeneración.....	11
Enfermedades Neurodegenerativas.....	11
Drosophila como modelo para la investigación de enfermedades humanas.....	12
Mitocondria y neurodegeneración.....	13
Antecedentes específicos.....	15
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares.....	17
Materiales y métodos.....	18
1.- <i>Drosophila melanogaster</i> , el modelo de estudio.....	19
1.1.- Cría y mantenimiento de moscas.....	19
1.2.- Cromosomas balanceadores.....	20
1.5.- Origen de las líneas de moscas utilizadas.....	21
2.- Ensayos comportamentales.....	21
2.1.- Análisis automatizado de actividad locomotora.....	21
2.2.- Ensayo de olfacción.....	23
2.3.- Ensayo de alimentación.....	24
3.- Bioquímica y biología molecular.....	24
3.1.- Rescate plasmídico.....	24
3.2.- Digestión por enzimas de restricción.....	26
3.3.- Ligación.....	26
SOLUCIONES.....	27
3.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
3.5.- Minipreps.....	28

3.6.- Preparación de bacterias electrocompetentes.....	29
3.6.- Secuenciación.....	30
4.- Expresión y purificación de proteínas.....	30
4.1.- Inducción de la expresión	30
4.2- Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)	32
4.3- Cuantificación por el método de Bradford	32
4.4.-Purificación de proteínas de fusión a GST	33
4.4.1.- Columna de afinidad GST-Sepharose.....	33
4.5.- Generación de anticuerpos.....	33
4.6.- Depleción de anticuerpos inespecíficos.....	34
4.7.- Western Blot	34
5.- INMUNOHISTOQUIMICA Y ANALISIS DE IMÁGENES.....	35
5.1.- INMUNOFLUORESCENCIA EN CEREBROS DE ADULTO Y LARVA.....	35
SOLUCIONES.....	36
6.- Análisis estadísticos.....	37
7.- Cultivo de células S2R+	37
7.1- Transfección	37
7.2.- Inmunohistoquímica	38
8.- Consumo de O ₂ tisular	39
9.- Montado de cabezas en parafina para cortes	40
10.- Análisis de los cortes de cerebros.....	40
11.- Búsqueda de compañeros genéticos de <i>orsai</i>	41
10.1.- <i>Screen</i> de deficiencias	41
12.- Hibridización <i>in situ</i>	42
Resultados.....	47
Capítulo 1	48
To strive, to seek, to find, and not to yield.	48
Identificación de un locus mutante.....	49
1) Selección del mutante.....	49
Localización y estructura.....	50
2.1) Análisis bioinformático.....	50
2.1.1) Estructura general de la proteína codificada por el CG6115.....	50
2.1.2) Predicción de la localización	53
2.2) Localización del CG6115.....	53

2.3) Localización del ARNm del CG6115.....	55
Capítulo 2	56
Descripción del fenotipo en la larva.....	57
1) La mutante homocigota presenta arresto en el desarrollo	57
2) Las larvas 100 ^{-/-} se alimentan normalmente.....	61
3) La disminución de la función de <i>orsai</i> no afecta la detección de estímulos quimiotácticos.....	61
4) Requerimiento espacial de la función de <i>orsai</i>	63
5) Rol de <i>orsai</i> en la motivación para alimentación.....	64
6) Niveles de expresión de <i>orsai</i> en distintos tejidos.....	65
7) Evaluación de la potencial contribución de ORSAI al funcionamiento del complejo I de mitocondria	67
8) Consumo de oxígeno.....	68
9) Generación de suero anti <i>orsai</i>	70
10) Localización de <i>orsai</i> mediante inmunohistoquímica.....	70
Capítulo 3	73
Rol de ORSAI en estructuras de la mosca adulta	74
1) Actividad locomotora.....	74
2) Desregulación estadio específica de la expresión de <i>orsai</i> en el cerebro	77
Capítulo 4	81
Búsqueda de modificadores del fenotipo de <i>orsai</i>	82
1) Expresión en el ojo	82
2) Características de la desregulación de OSI	82
3) Búsqueda de genes que interactúen con <i>orsai</i>	83
Discusión	89
La falta <i>orsai</i> en la larva y sus fenotipos	91
Disfunción mitocondrial y neurodegeneración.....	92
Fenotipos en la mosca adulta y procesos neurodegenerativos.....	94
Búsqueda de la función de <i>orsai</i>	94
Anexo	97
Bibliografía	124

Introducción

¿Por qué usar *Drosophila melanogaster* en el estudio de enfermedades neurodegenerativas?

Ventajas

Las ventajas de *D. melanogaster* son muchas y de variada índole. El rango de las mismas abarca desde variables biológicas hasta económicas, pasando por las culturales.

Entre las biológicas se encuentran su corto ciclo de vida (ver más adelante), lo que permite analizar nuevas generaciones en poco tiempo. Se puede agregar que sea un organismo modelo estudiado desde el principio del siglo XX (Thomas Hunt Morgan empezó a usar a la mosca de la fruta para realizar estudios genéticos en 1910) lo que implica que hay una masa crítica de datos útiles del organismo, y que su genoma esté completamente secuenciado desde hace años ([Adams et al. 2000](#); [Rubin et al. 2000](#)). También hay que remarcar la facilidad con que es posible realizar *screens* a gran escala, las múltiples colecciones de mutantes, ARNis y líneas con deficiencias. A todo esto hay que sumarle el sistema heterólogo UAS/GAL4 ([Fischer et al. 1988](#); [Brand and Perrimon 1993](#)), que es una de las herramientas más importantes en el uso de *D. melanogaster*, tanto que se la llegó a llamar “el cortaplumas del genetista” ([Duffy 2002](#)).

Las variables económicas se resumen en el poco lugar que ocupan (en una habitación acondicionada es posible mantener miles de líneas) y el bajo costo de su mantenimiento ([Greenspan 1997](#)). También hay que tener en cuenta los múltiples centros repositorios de moscas y reactivos como Bloomington *Drosophila* Repository

Center y *Drosophila* Genomics Resource Center en EEUU, Vienna *Drosophila* Resource Center en Austria y *Drosophila* Genetic Resource Center en Japón, que a un costo relativamente bajo proveen líneas de moscas con características genéticas prolijamente descritas.

Culturalmente hablando, la comunidad científica que trabaja con *D. melanogaster* suele ser muy generosa (en la mayoría de los casos por lo menos) con los reactivos y las líneas generadas en sus laboratorios.

Ciclo de vida

Una de las mayores ventajas de la mosca es su corto ciclo de vida que, en promedio a 25°C, es de diez días. Las larvas de *D. melanogaster* se dividen en tres estadios y pasan gran parte de esos estadios comiendo o buscando comida. Las larvas se mueven por el sustrato extendiendo su parte anterior y retrayendo la posterior. Ingieren la comida utilizando como palas sus ganchos bucales, que van cambiando con cada muda. Las moscas adultas depositan los huevos cerca de/sobre una fuente de comida y luego de 24 hs post ovipuesta (AEL, *after egg laying*) la larva I eclosiona del huevo. 24 horas después (48 AEL) se produce la primera muda, dando una larva II y nuevamente tras 24 horas (72 AEL) se produce la segunda muda, obteniéndose una larva III. Este tercer estadio larval, que dura 48 hs, se divide a su vez en larva III temprana y *wandering*. La larva III temprana sigue alimentándose continuamente durante las primeras 24 hs que dura dicho estadio. Luego las larvas empiezan a escarbar la comida en grupos, un comportamiento que se llama *burrowing*, para luego abandonar la comida y comenzar a buscar una zona seca donde se formará la prepupa

y luego la pupa. En este estadio la larva sufrirá una histólisis masiva y luego de cinco días emergerá del pupario un adulto (figura 1) ([Sokolowski 1984](#)).

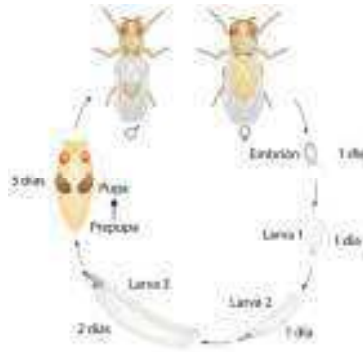


Figura 1 – Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El ciclo completo dura aproximadamente 10 días a 25°C. Luego de 24 hs del huevo eclosiona una larva 1, 24 hs después una larva 2 y nuevamente 24 hs después una larva 3. Luego de 2 días, esta larva da lugar a la prepupa y luego a la pupa. Cinco días después emerge del pupario una mosca adulta y el ciclo puede comenzar otra vez. (Imagen modificada del Laboratorio Lehmann <http://comp.uark.edu/~mlehmann/post.pdf>)

Sistema de expresión UAS/GAL4

Como se mencionó anteriormente, el sistema de expresión heterólogo UAS/GAL4 es una de las herramientas más poderosas con las que se trabaja con la mosca cuando se desea tener una expresión génica restringida espacialmente ([Brand and Perrimon 1993](#)). En este sistema un elemento P que porta el activador transcripcional GAL4 es movilizado al azar por el genoma de la mosca, lo que lleva a la expresión de éste bajo el control de un *enhancer* endógeno tejido específico. Otra opción es generar una mosca transgénica en la que el GAL4 ya esté clonado con una secuencia reguladora a elección. De esta forma el gen clonado ríe abajo de la secuencia UAS (secuencia ríe arriba activadora, por sus siglas en inglés) es expresado

en el mismo patrón tejido específico que el activador GAL4. Una ventaja de este sistema es que el GAL4 y el UAS provienen de líneas parentales diferentes, lo que asegura la viabilidad de las líneas en el caso de que el gen que se pretende expresar provoque letalidad. También hay que tener en cuenta que una vez que se tiene una línea GAL4 esta puede ser cruzada con cualquier línea UAS, lo que convierte a la línea GAL4 en un recurso reutilizable, y lo mismo ocurre con la línea UAS al cruzarla con cualquier otra línea GAL4 (figura 2).

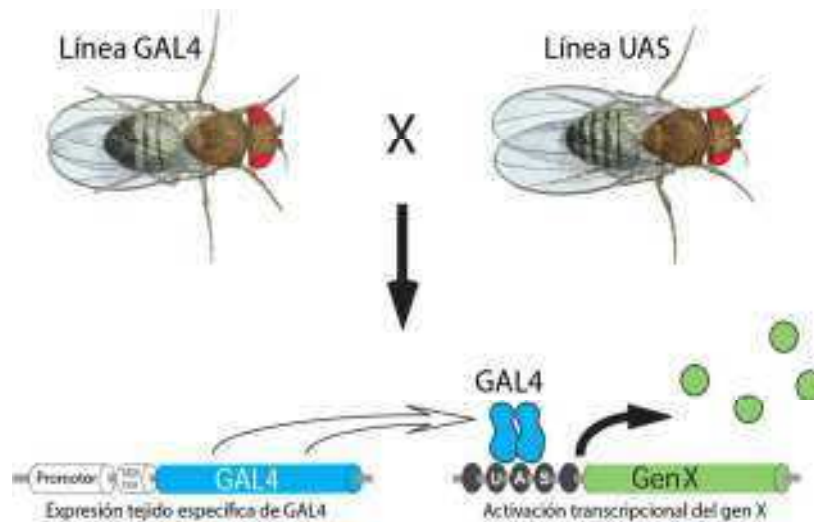


Figura 2 – Sistema UAS/GAL4. Líneas parentales independientes portan cada una una parte del sistema bipartito heterólogo. En este dibujo, el macho, a la izquierda, es un individuo transgénico que expresa la proteína activadora GAL4 bajo el control de un promotor específico. La hembra, a la derecha, posee un gen X de interés bajo la secuencia activable UAS. La descendencia de esta cruce expresará el gen X en el momento y tejido en que se exprese el GAL4. Modificado de <http://cshprotocols.cshlp.org>.

La mayor desventaja de este sistema es la imposibilidad de inducirlo. También hay que tener en cuenta que muchas líneas GAL4 muestran una expresión dinámica, esto es que sus niveles de expresión varían a lo largo del desarrollo y la adultez. Por

esto no es posible realizar experimentos de rescate de fenotipo en la adultez en muchos casos, ni expresar genes tóxicos sin ocasionar letalidad temprana.

Debido a esto se desarrollaron distintas variaciones al sistema que permiten inducir la expresión, como por ejemplo el uso de un represor termosensible de GAL4 llamado GAL80ts (sistema TARGET (McGuire et al. 2004)). En el caso de esta tesis se utilizó el sistema GeneSwitch (Burcin et al. 1998) para lograr la inducción temporal específica de un gen. Este sistema consta de una proteína GAL4 fusionada al receptor humano de progesterona. Solo en presencia de esta hormona (o un análogo como RU486) el activador puede actuar sobre la secuencia UAS. De esta forma aunque la quimera se esté expresando solo habrá transcripción en presencia de la droga. Ya a las 5 hs post inducción es posible detectar la misma y a las 21 hs los niveles son comparables a los de un GAL4 convencional en el caso de *elavGS* (Osterwalder et al. 2001).

Screens en mosca

Existen distintos tipos de *screens* que se pueden realizar en moscas y cada tipo utiliza diferentes estrategias para llevarlos a cabo.

Los *screens* directos (*forward screens*) son realizados mutagenizando al azar las moscas mediante agentes químicos, como el metanosulfonato de etilo (EMS), o por radiación de rayos X. Una vez mutagenizadas las moscas, estas son evaluadas buscando perturbaciones en procesos o fenotipos pre definidos. Otro método para generar mutaciones por pérdida de función es mediante la mutagénesis mediada por transposones, por ejemplo elementos P (Cooley et al. 1988; Bellen et al. 2004). La

ventaja de este método es la relativamente fácil identificación de los genes mutagenizados, pero por el otro lado este tipo de aproximación no es completamente al azar, ya que los transposones se integran a los cromosomas en sitios específicos (*hot-spots*).

Los *screens* reversos se basan en analizar qué ocurre en un determinado fenotipo de la mosca en el contexto de la disrupción de un gen en particular. La forma de generar un mutante para un gen en particular es utilizar una línea con una inserción o una mutación ya localizada que afecte a dicho gen o mediante la utilización de ARN de interferencia (ARNi). Esta última estrategia consiste en utilizar el sistema binario de expresión UAS/GAL4 para expresar horquillas pequeñas de ARN (*short hairpin RNAs* – shRNAs) que producen el silenciamiento de genes endógenos específicos (Dietzl et al. 2007). El centro repositor de Viena posee más de 22 mil líneas de moscas que expresan un ARNi específico. Alrededor de 12 mil genes (un 88.2% del genoma de la mosca) están representados en esta colección (Dietzl et al. 2007).

Los *screens* de modificadores (también llamados de potenciadores y supresores) combinan las ventajas de los *screens* reversos y directos (St Johnston 2002). Las mutaciones por pérdida de función en la gran mayoría de los genes son recesivas, por lo que con solo el 50% del nivel de expresión normal de un gen es posible obtener un individuo viable. Cuando un proceso ya está previamente alterado por otra mutación o por la expresión de un ARNi, este 50% de expresión no siempre es suficiente, por lo que mutantes que participan en dicho proceso pueden ser identificados como potenciadores o supresores dominantes en el fenotipo sensibilizado.

Lo ideal para esta identificación es partir de fenotipos que sean fácilmente observables y a la vez que sean sensibles a modificaciones genéticas. En el caso de enfermedades neurodegenerativas el ojo de la mosca es la opción por excelencia. La expresión de un gen tóxico en el ojo da un fenotipo llamado de ojo rugoso (FOR) (Pignoni et al. 1997), por degeneración de células del ojo, como los fotorreceptores. Dado que estas células no son esenciales para la vida ni para la fertilidad de la mosca es posible expresar genes de alta toxicidad en dicho tejido. Por lo general la severidad del FOR se correlaciona con el grado de pérdida celular. Dado que el ojo de la mosca es una estructura altamente regular (ver más adelante) y que puede ser fácilmente accesible sin necesidad de disecar al animal, los FOR dan un resultado fácil de observar, lo que los vuelve ideales para un *screen* de esta naturaleza. También hay que tener en cuenta que mediante este tipo de *screens* es posible detectar interacciones epistáticas que en un *screen* directo no podrían ser identificadas.

Neurodegeneración

Enfermedades Neurodegenerativas

Las principales enfermedades neurodegenerativas en humanos son Alzheimer (AD), Parkinson (PD) y Huntington (HD). Estos desórdenes tienen cada vez mayor incidencia entre la población debido a la mayor longevidad de la misma alcanzada durante el último siglo. Estas patologías tienen en común su inicio tardío y la degeneración progresiva de poblaciones neuronales específicas. Se estima que en los EEUU el número de casos de Alzheimer pasarán de 377.000 en 1995 a 959.000 en 2050

(Hebert et al. 2001) mientras que para el caso de Parkinson la tasa de incidencia es de 12.3 casos cada 100.000 personas, pero si se calcula para personas mayores de 50 años la tasa sube a 44.0 casos cada 100.000 personas (Van Den Eeden et al. 2003).

Hasta el momento no se ha encontrado una cura para estas enfermedades ni una forma de detener su avance, por lo que las personas que sufren estas patologías solo reciben tratamientos paliativos que mejoran los síntomas. Es por esto que es de vital importancia conocer y comprender las causas y los mecanismos de estas dolencias para así poder diseñar potenciales terapias.

Distintos aspectos de la biología celular, como la regulación de la expresión génica, pasando por conectividad neuronal, sinaptogénesis y muerte celular, entre otros, son muy similares entre los humanos y las moscas. De hecho muchos genes y vías estudiadas primero en moscas fueron posteriormente descritos en humanos, como por ejemplo la vía de la quinasa 1 inducida por PTEN, llamada vía PINK1/Parkin (Clark et al. 2006; Park et al. 2006).

Drosophila como modelo para la investigación de enfermedades humanas.

Con el advenimiento de la secuencia completa del genoma de *Drosophila* se ha puesto de manifiesto su potencial en el estudio de enfermedades humanas. El 75% de todos los genes humanos que provocan enfermedades tienen secuencias relacionadas en *D. melanogaster* (definidas como correspondencias con valores de expectación (E-values) $\leq 10^{-10}$). De hecho, cuando se aumenta la astringencia de la búsqueda hasta un nivel que es típico de genes que tienen contrapartes funcionales conocidas (E-values $\leq 10^{-100}$) aún se puede encontrar que un tercio de los genes humanos que provocan enfermedades tienen correspondencias en la mosca: de 2309 genes humanos, ~700

tienen homólogos suficientemente bien conservados en mosca como para ser analizados (Bier 2005). Una base de datos exhaustiva de los genes homólogos de ambas especies, llamada Homophila, se puede encontrar en <http://superfly.ucsd.edu/homophila>.

Teniendo en cuenta esta alta conservación de genes entre ambas especies y utilizando genética reversa se han podido estudiar distintos procesos neurodegenerativos en *Drosophila*. Esta técnica ha sido particularmente útil para estudiar HD (Lee et al. 2004), AD (Greeve et al. 2004) y PD (Feany and Bender 2000), entre otras. Asimismo, se han descubierto fenotipos importantes para la comprensión de mecanismos que operan en enfermedades neurodegenerativas a partir de *screens* realizados mediante genética directa. Gracias a estos *screens* se han podido detectar distintos tipos de degeneración y se ha logrado identificar componentes moleculares de los mismos (Palladino et al. 2002; Palladino et al. 2003; Bettencourt da Cruz et al. 2005), para citar algunos ejemplos).

Mitocondria y neurodegeneración

Las mitocondrias son organelas celulares encargadas de la síntesis de ATP vía fosforilación oxidativa (OXPHOS) en las células eucariotas. Esto las vuelve esenciales para la función celular, transducción de señales y otras actividades generales de la célula. En la matriz mitocondrial las enzimas del ciclo de Krebs generan los transportadores de electrones NADH y FADH₂ que a su vez donan electrones a la cadena de transporte de electrones (Adams et al. 2000) localizada en la membrana interna de la mitocondria. La ETC consiste de cuatro complejos de proteínas

nombradas de I a IV. Estas, a través de reacciones redox secuenciales, sufren cambios conformacionales que permiten bombear protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. El gradiente de protones generado por los complejos I, III y IV es liberado a través de la ATP sintasa que fosforila ADP a ATP ([Nunnari and Suomalainen 2012](#)). El complejo I (principalmente) y el complejo III también generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que son capaces de dañar componentes esenciales de la célula como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las ROS han sido asociadas a enfermedades relacionadas con disfunciones mitocondriales, incluyendo neurodegeneración ([Federico et al. 2012](#)).

En particular, el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) es una enzima con múltiples subunidades que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria (figura 3). Esta enzima acopla la transferencia de dos electrones del NADH a la ubiquinona con la translocación de cuatro protones a través de la membrana ([Bridges et al. 2011](#)).

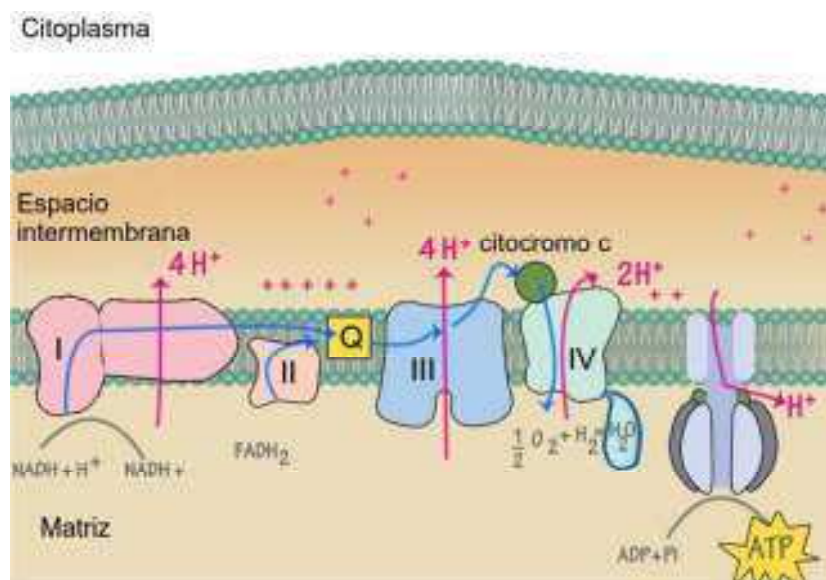


Figura 3.- Diagrama de una sección de la membrana mitocondrial. Se muestran los componentes de la cadena respiratoria oxidativa, incluyendo el complejo I en el extremo izquierdo.

Antecedentes específicos

La actividad locomotora (AL) es un comportamiento que ha sido ampliamente estudiado en nuestro laboratorio ([Fernandez et al. 2008](#); [Depetris-Chauvin et al. 2011](#)) entre otros y en particular para la investigación de procesos neurodegenerativos ([Rezaval et al. 2008](#)). En ausencia de claves ambientales los animales mantienen un patrón rítmico de ciclos de actividad y reposo de aproximadamente 24 horas. Esto implica que hay un reloj circadiano que controla la AL. En *Drosophila melanogaster* hay alrededor de 150 neuronas que componen el reloj circadiano ([Helfrich-Forster 2003](#); [Helfrich-Forster 2005](#)) y de estas, más específicamente, el control circadiano de la AL recae en un grupo de ocho neuronas en cada hemisferio del cerebro de la mosca llamadas neuronas laterales ventrales (LNV, por sus siglas en inglés) ([Peschel and Helfrich-Forster 2011](#)). Estas LNvs expresan el gen *pdf* (pigment dispersing factor).

Dado que una de las características principales de las enfermedades neurodegenerativas es la progresión en el tiempo ([Celotto and Palladino 2005](#)) y con el fin de descubrir nuevos genes que puedan estar involucrados en estos procesos, se realizó en el laboratorio un *screen* donde se generaron y evaluaron cerca de 1000 líneas de moscas con inserciones al azar que permitían desregular el o los genes en la vecindad de la inserción. La lógica detrás de este *screen* es que se identifiquen genes cuya expresión desregulada altere el patrón comportamental de las moscas y que a la vez esta alteración sea progresiva en el tiempo. Para esto se analizaron a moscas jóvenes (0 a 3 días) y envejecidas (19 a 21 días) en ensayos de AL. Para restringir la desregulación a las LNvs, se utilizó el sistema heterólogo UAS/GAL4 ([Rorth 1996](#)). Cada línea ensayada poseía una inserción al azar de un transposón conteniendo la secuencia

UAS, lo que permitiría en principio sobreexpresar el gen que se encuentre río abajo de la misma en presencia del factor de transcripción GAL4 asociado al promotor del gen *pdf*, expresando así el GAL4 en estas neuronas que controlan el comportamiento rítmico de la mosca. Si estas son afectadas de alguna forma por la desregulación de un gen, los cambios se verán reflejados en el patrón comportamental de las mismas. Esta estrategia permitió buscar fenotipos de desregulación de la AL presentes únicamente en los individuos viejos y que a su vez los jóvenes no presentasen fenotipo. De esta forma en el laboratorio se encontró al gen *enabled* y se demostró que su disfunción disparaba procesos neurodegenerativos ([Rezaval et al. 2008](#)). Durante este proyecto de investigación se caracterizó otro de los genes identificados durante este *screen*.

Objetivo general

Detectar, identificar y caracterizar genes nuevos involucrados en procesos neurodegenerativos en *Drosophila melanogaster* y ahondar en los posibles mecanismos.

Objetivos particulares

1.- Utilizar los resultados de un *screen* genético de actividad locomotora para detectar y seleccionar líneas mutantes con defectos comportamentales progresivos en el tiempo que puedan ser relacionados con procesos neurodegenerativos.

2.- Caracterizar al mutante seleccionado

2.1.- Identificar el gen que está afectado por la mutación y que causa el fenotipo comportamental.

2.2.- Localizar a nivel histológico y anatómico dicho gen.

2.3.- Caracterizar la función de este gen.

2.4.- Identificar otros genes que modulen el fenotipo comportamental provocado por la disfunción del gen de interés.

Materiales y métodos

1.- *Drosophila melanogaster*, el modelo de estudio

1.1.- Cría y mantenimiento de moscas

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis se mantuvieron en viales o botellas que contienen un medio de crecimiento estándar preparado a base de polenta, agar, levadura, sacarosa, Nipagin y ácido propiónico. Para mantener los stocks de moscas o para largar cruzamientos controlados (con pocos individuos) se utilizaron viales, mientras que las botellas fueron empleadas para amplificar las líneas debido a su mayor capacidad.

Los cruzamientos normalmente consistieron de un promedio de 5 hembras por cada 3 machos, los cuales fueron repicados al cabo de tres días y fueron mantenidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se agregó una punta de espátula de levadura hidratada a los viales para optimizar la ovipuesta, y se controló que los mismos se mantuvieran hidratados a lo largo del tiempo mediante la adición de gotas de agua en la comida. Los viales que contenían moscas para envejecer se repicaron al menos una vez por semana. Previo a los cruzamientos se seleccionaron hembras vírgenes (menos de 12 hs transcurridas desde el momento de la eclosión a 25°C) con el objetivo de controlar el genotipo de la progenie (las hembras de *Drosophila* tienen una espermateca en la que puede “almacenarse” el esperma de los machos con los que se han apareado anteriormente). Para seleccionar los individuos, éstos se durmieron utilizando CO₂ y fueron observados bajo la lupa sobre una plataforma porosa a través de la cual se continúa filtrando CO₂. Se trató de evitar el hacinamiento de las moscas en los viales o botellas, ya que las mismas compiten por la comida y se ha demostrado,

por ejemplo, que las moscas hambreadas muestran mayor actividad ([Martin 2003](#)). Se procuró, de esta manera, que las condiciones de cría de los individuos fueran siempre las mismas, así como el tiempo al que se las expone a anestesia (CO₂), puesto que se ha reportado que a corto plazo el CO₂ causa defectos en la fisiología y comportamiento de la mosca ([Seiger and Kink 1993](#)). Para los experimentos se incluyeron controles adecuados (*background* genético, edad, temperatura), y el análisis comportamental se realizó al menos 24 hs después de que las moscas fueran sometidas al tratamiento con el anestésico para evitar evaluar los efectos del tratamiento con CO₂. Dado que la temperatura a la cual se crían las moscas es una variable que influye en el tiempo de desarrollo del animal, es posible retrasar la aparición de la progenie a 18-22°C o, contrariamente, acelerarla a 25-29°.

1.2.- Cromosomas balanceadores

Los cromosomas balanceadores contienen inversiones, translocaciones y/o deleciones impidiendo la recombinación entre ellos y los cromosomas normales, ya que en ellos no existen regiones homólogas que faciliten el apareamiento entre cromátidas. Estas características han resultado en una enorme ventaja para la genética de *Drosophila* puesto que evitan la pérdida de mutaciones de interés por recombinación. Debido a las múltiples rearrreglos y mutaciones acumuladas en estas líneas, los balanceadores son letales en homocigosis, lo cual permite el mantenimiento de líneas que poseen mutaciones letales en homocigosis. Estos balanceadores portan, además, mutaciones asociadas a marcadores fenotípicos dominantes fácilmente reconocibles que son muy útiles para el análisis de segregación en la progenie. Los cromosomas balanceadores pueden, además, llevar marcadores moleculares (como

los genes lacZ o gfp) que permiten su identificación por tinción y/o directamente al microscopio de fluorescencia. Algunos de los cromosomas balanceadores más utilizados son CyO (en el cromosoma II) que tiene una mutación que genera alas curvadas, TM3 (en el III) cuyo marcador fenotípico son quetas más cortas en el dorso de la mosca, así como DB (*double balancer*), que posee los cromosomas balanceadores CyO y TM3 sobre un marcador denominado ES, que es una translocación entre el segundo y tercer cromosoma, que los mantiene unidos de modo que segregan juntos.

1.5.- Origen de las líneas de moscas utilizadas

Las líneas utilizadas provienen mayormente de los centros repositórios Bloomington Stock Center (Indiana, USA), Vienna *Drosophila* RNAi Center (Viena, Austria) y *Drosophila* Genetic Resource Center (Kioto, Japón). En caso contrario la procedencia se aclara en el texto.

2.- Ensayos comportamentales

2.1.- Análisis automatizado de actividad locomotora

El monitoreo de la actividad locomotora se llevó a cabo poniendo machos individualmente en tubos de vidrio de 50 mm de diámetro, que contienen comida en uno de los extremos. Los tubos se colocan en monitores de actividad (Trikinetics) en alguna de las 32 posiciones disponibles. Cada uno de los tubos es flanqueado por un haz de luz infrarroja, que no afecta el comportamiento de las moscas en oscuridad ya que éstas no detectan luz de longitudes de onda entre 850 y 950 nm. Cada vez que una mosca interrumpe el haz de luz, este movimiento se registra en la computadora como

un "acto" o dato de actividad. La actividad se adquirió como la sumatoria de los registros obtenidos en intervalos de 30 minutos a lo largo del experimento. Dicha información se importó a un programa de análisis (Clocklab, Actimetrics, IL) en el cual se visualiza la actividad a lo largo de los días en forma de 'actograma' (gráficos de registro diario de la actividad locomotora individual). Los experimentos consistieron en un entrenamiento de 3-4 días, en incubadoras con condiciones controladas de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 25 °C (LD), y luego se transfirió a condiciones de oscuridad constante por 10 días (OO). Una vez adquiridos los datos de la actividad locomotora se calcularon los períodos en la fase de OO utilizando el programa ClockLab con una significancia de 0,05. Para cada individuo, según el periodograma obtenido, se determinó si presentaban un comportamiento rítmico, débilmente rítmico o arrítmico teniendo en cuenta los últimos 5 días de oscuridad constante. Posteriormente se calculó el número de individuos rítmicos sobre el total de cada genotipo calculando, de esta manera, el porcentaje de ritmicidad en actividad locomotora

RÍTMICO: Cuando los datos se ajustan a una función con un período de una sola frecuencia (entre 18 y 40 hs). El pico correspondiente al período asignado es el único que pasa la línea de significancia.

DÉBILMENTE RÍTMICO: El período encontrado apenas pasa la línea de significancia, o bien pasan varios picos.

ARRÍTMICO: cuando el programa no identifica periodicidad alguna, o lo hace en rangos fuera de lo esperado (<12hs, >40hs).

2.2.- Ensayo de olfacción

Este ensayo se realizó con modificaciones del método de Heimbeck ([Heimbeck et al. 1999](#)) . Se colectaron larvas sincronizadas del estadio a testear y se enjuagaron con agua destilada. Luego se seleccionaron a mano 50 individuos y se colocaron en el centro de una placa de Petri (85 mm de diámetro). Debajo de la placa se colocó una impresión de la figura 1 de tamaño 1:1. En cada zona (olor y control) se colocaron directamente sobre Parafilm o sobre tapas de eppendorfs de 1.5 ml papel Watman impregnado del olor o agua. Luego de colocar las larvas en el centro se sacó inmediatamente una foto. Pasados 5 minutos se sacó otra foto y se analizó el índice de respuesta IR.

$$IR = \frac{N_s - N_c}{N_s + N_c}$$

Donde N_s representa al número de animales a menos de 30 mm de la fuente de olor (dentro del área S de la figura 1) y N_c es el número de larvas en el área C. IR positivos indican atracción, negativos que el estímulo es evitado y cuando es cero indica que el comportamiento es indiferente.

Para cada estadio se realizaron por lo menos 3 mediciones.

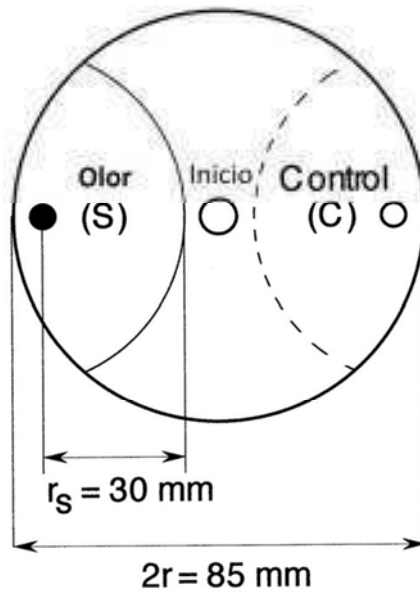


Figura 1. Arena de entrenamiento utilizada para el ensayo de olfacción.

2.3.- Ensayo de alimentación

La levadura en pasta fue coloreada de azul con colorante para comida Azul Brillante (Santana Ingredientes, Buenos Aires, Argentina). Se colocaron por lo menos 50 larvas de cada genotipo a analizar en placas con comida coloreada. A las 72 AEL se volvieron a colectar las larvas, se las enjuagó con agua y luego se las fotografió para determinar la presencia o no de comida coloreada en su intestino.

3.- Bioquímica y biología molecular

3.1.- Rescate plasmídico

El Protocolo de rescate de plasmídico se tomó de Drosophila Protocols ([Sullivan 2000](#)). Se juntaron 15 moscas anestesiadas en un eppendorf de 1,5 ml colocado en hielo (las moscas se pueden guardar indefinidamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el DNA se puede

preparar sin descongelar a las moscas). Luego se machacaron las moscas en 100 μ l de Buffer A, a los que se le agregaron otros 100 μ l más, y se continuó la ruptura del tejido hasta que sólo quedaron las cutículas. A continuación se incubaron las muestras a 65 $^{\circ}$ C por 30 minutos, y luego se agregaron 400 μ l de Buffer B, mezclando por inversión, y se incubó en hielo por lo menos durante 10 minutos (esta etapa puede prolongarse hasta varias horas). Luego se centrifugó a 12000 rpm a TA por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, al que se agregaron 600 μ l de isopropanol y se mezcló por inversión. Después se centrifugó a 12000 rpm a TA por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con EtOH 70%, se secó al aire y resuspendió in 150 μ l de H₂O. Finalmente se guardó el ADN a -20 $^{\circ}$ C.

SOLUCIONES:

TE: 10 mM Tris-Cl (pH 7,4 , 7,6 u 8,0 según corresponda)

1 mM EDTA (pH 8.0)

Buffer A:

100 mM Tris-Cl (7.5)

100 mM EDTA

100 mM NaCl

0,5% SDS

Buffer B:

200 ml de AcK 5 M

500 ml de LiCl

3.2.- Digestión por enzimas de restricción

Se realizaron las digestiones con cada enzima por separado. Para cada digestión se utilizó:

ADN genómico (equivalente a 2 moscas)	10.0 µl
Buffer	2.5 µl
ARNasa A 100 µg/ml	2.0 µl
Enzima de restricción	10 µl
H2O estéril	25 µl

Las digestiones se incubaron a 37 °C por entre 3 hs y ON. Luego se inactivó por calor las enzimas de restricción según la enzima utilizada. Se analizaron 10 µl de la digestión en un gel de agarosa 0,8 % en buffer TAE.

3.3.- Ligación

Para cada ligación se utilizó:

ADN genómico digerido (equivalente a 1 mosca)	10 µl
Buffer de ligación 10 X	40 µl
H2O estéril	350 µl

T4 ADN Ligasa

2 μ l

Las muestras se incubaron a 4 °C ON. Por cada reacción de ligación se agregó 40 μ l de NaAc y 1 ml de EtOH. Se mezcló bien e incubó a -20 °C ON. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a TA (temperatura ambiente). Se removió el sobrenadante, lavó el pellet con EtOH 70%, secó al aire. Finalmente, se resuspendió en 10 μ l de H₂O estéril. En este punto el ADN ligado puede ser almacenado indefinidamente a -20 °C.

SOLUCIONES

NaAc (3 M, pH 5.2)

Buffer de ligación 10 X

0,5 M Tris-Cl (7.5)

100 mM MgCl₂

100 mM DTT

10 mM ATP

0,25 mg/ml BSA

3.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El set de *primers* utilizado para amplificar el ORF completo de *orsai* en TOPOGateway fue:

GW6115FW: ATGTCACAGCTGCGCTCGAAAG

GW6115RV: GTCATTGTA ACTATAGCGCTGCTTG

El ciclo utilizado fue:

95°C	5 min		
95°C	1 min	}	40 veces
53°C	1 min		
72°C	1 min		
72°C	10 min		

Y para el clonado en vector TOPO TA:

6115Fw: GAATTCGTGATGTCACAGCTGCGC
 6115Rv: GCGGCCGCGTCATTGTA ACTATAG

95°C	5 min		
95°C	30 seg	}	40 veces
53°C	30 seg		
72°C	30 seg		
72°C	10 min		

3.5.- Minipreps

1. Cosechar 1,5 ml del cultivo de bacterias en un eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 6000 rpm 1 minuto. Al precipitado se le agrega otro 1.5 ml de cultivo y se repite la centrifugación. Se descarta el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 200 ul de P1 (NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8.0) y 6 ul de RNAsa 10 mg/ml.
3. Agregar 300 ul de P2 (SDS 1%, NaOH 0.2 N) e incubar a RT por 5 minutos a RT. A partir de este paso no se usó el vortex. El SDS se agrega último para evitar su precipitación.
4. Agregar 300 ul de P3 (KAc 3 M, ph 5) e incubar en hielo por 5 minutos.
5. Centrifugar a 12000 g por 15 minutos a 4°C.

6. Al sobrenadante agregarle 400 ul de cloroformo y mezclar hasta hacer una emulsión.
7. Centrifugar 5 minutos a 12000 g y recolectar la fase acuosa.
8. Agregar entre 0.7 y 1 volumen de isopropanol e incubar por lo menos por 20 minutos a -20°C.
9. Centrifugar a 12000 g por 5 minutos, descartar el sobrenadante, lavar con EtOH 70% y dejar evaporar el alcohol a RT.
10. Resuspender el DNA con 20 ul de H₂O.
11. Cuantificar 1 ul en gel de agarosa 1%.

3.6.- Preparación de bacterias electrocompetentes

1. Inocular 25 ml de LB con bacterias *E. coli* y crear toda la noche a 37°C con agitación media.
2. Inocular 5 ml del cultivo del paso 1 en 500 ml de medio 2XYT e incubar a 37°C con agitación media. Guardar 1 ml de medio para el blanco de la densidad óptica (DO).
3. Cuando la DO esté entre 0.5 y 0.6 vertir el cultivo en mamaderas de centrifuga preenfriadas e incubar en hielo por 30 minutos.
4. Centrifugar a 4000 × g por 20 minutos a 4°C en un rotor pre enfriado. Descartar el sobrenadante.
5. Resuspender con suavidad las células en 500 ml de glycerol 10% pre enfriado e incubar en hielo por 30 minutos.
6. Repetir los pasos 4 y 5 dos veces
7. Estimar el volumen del pellet y resuspender en ese voluemen de glycerol 10% frío.
8. Inmediatamente pipetear en alícuotas de 50 µl en eppendorfs preenfriados y congelar en un baño de hielo seco y etanol. Guardar a -70°C.

2XYT

por litro:

Triptona 16 g

Extracto de levadura 10 g

NaCl 5 g

3.6.- Secuenciación

Para la secuenciación se utilizó el servicio de secuenciación de la Fundación Instituto Leloir.

4.- Expresión y purificación de proteínas

4.1.- Inducción de la expresión

Realizar mini-inducciones (volumen final 5 ml para corroborar la inducción y expresión) e inducciones preparativas (de entre 250 y 500 ml de volumen, para obtener masa de la proteína), que consisten en partir de un cultivo de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysE conteniendo el plásmido de interés e incubar toda la noche en medio LB conteniendo ampicilina y cloranfenicol en agitación a 37°C. Posteriormente el cultivo es diluido 1/20 con el mismo medio llevando al volumen final indicado anteriormente según se trate de una mini inducción o de una inducción preparativa. Esta dilución es puesta a crecer a 37°C con agitación. Cuando llega hasta una densidad óptica de 0.4-0.6 medida a 600 nm, se toma 1 ml como control sin inducir y al resto se le agrega IPTG (0.1 mM) para inducir la expresión de la proteína de fusión GST-6115. Luego se incuba por 4 hs a 37 °C con agitación, se mide nuevamente la DO y luego se centrifuga por 10 minutos a 6000 rpm a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y el pellet se

resuspende en PBS 1/50 del volumen original conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM y EDTA 2 mM) evitando la formación de espuma. En este paso cuando se realizan inducciones preparativas al cultivo una vez resuspendido se le agrega lisozima (0.2 mg/ml) y se incuba por 30 minutos en hielo. Luego de esto se agrega DNAsa (50 µg/ml) + MgCl₂ (10 mM) y se lo incuba nuevamente en hielo por 60 minutos.

Para ambos tipos de inducciones las bacterias se lisan por sonicación (3 veces por 30 segundos con 1 minuto de pausa entre cada vez y 1 minuto de sonicación final a potencia 6 en modo continuo (SONIFIER 450, Branson). Luego se centrifugan a 11000 rpm por 20 minutos a 4 °C (las fases obtenidas en este paso para las mini inducciones se utilizan para determinar en qué fracción se encuentra mayoritariamente la proteína –fase soluble: sobrenadante, cuerpos de inclusión: precipitado). Para la inducción preparativa se le agrega una última centrifugación a 40000 rpm a 4°C y el filtrado por filtro de 0.2 µm.

Los lisados se corren en geles de poliacrilamida 10% junto a marcadores de peso molecular. El volumen de siembra se calcula para obtener masas similares para cada fase de la siguiente manera:

	Factor de concentración (FC)	DO en el momento de la cosecha	$Z = (FC \times DO)$	270 µl + Z µl
Muestra	1/50			X

Donde X es el volumen a sembrar de cada muestra.

4.2- Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras a resolver son hervidas por 5 minutos en presencia de SDS Sample Buffer (SDS 4 %, 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 200 mM DTT, bromofenol azul cf hasta azul oscuro, H₂O cf.) y centrifugadas 1 minuto a 6000 rpm. El sobrenadante se siembra en geles de poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 al 10%. La corrida se visualiza por tinción con Coomasie Blue R-250 (Sigma). Los geles son teñidos con Coomasie Blue y posteriormente desteñidos mediante su hervido para observar el patrón de bandas de la corrida electroforética. Alternativamente, los geles son transferidos a membranas de nitrocelulosa para detectar la/s proteína/s de interés por western blot.

4.3- Cuantificación por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realiza por la técnica de Bradford (1976), para la cual se utiliza la proteína BSA como patrón con la que se realizaron diluciones conocidas obteniéndose así una curva de calibración en el rango de 0 a 10 ug/ml. Se utilizan por lo general muestras de 10 µl de eluido de la muestra pasada por la columna de Sepharose - GSH, se las lleva a 800 ul con agua y se les agrega 200 ul del reactivo de Bradford (BioRad). Luego se las pasa a cubas plásticas para espectrofotómetro y se las incuba 5 minutos. Posteriormente se mide la absorbancia a 595 nm. Una vez obtenidos los datos se cargan en el programa Excel del paquete Microsoft Office y se calcula a partir de la curva de calibración la concentración de proteína en la muestra.

4.4.-Purificación de proteínas de fusión a GST

4.4.1.- Columna de afinidad GST-Sepharose

El lisado inducido se pasa por una columna de afinidad de Glutathione Sepharose (4 Fast Flow, Pharmacia Biotech) según el manual (separando previamente una alícuota como control de fracción total). Brevemente, al pasar el lisado del cultivo inducido en la columna quedan retenidas las proteínas fusionadas a GST y el resto eluye con el percolado. Las proteínas retenidas son eluidas con una solución de GSH reducido 5mM en Tris•HCl 50 mM pH 8, colectándose varias fracciones de entre 0,5 - 1 ml. Las distintas fracciones son corridas en geles de poliacrilamida 10% para visualizar el grado de pureza obtenido de las muestras.

4.5.- Generación de anticuerpos

La inmunización la llevó a cabo el personal del bioterio del Instituto Leloir. Para esto se inmunizaron 3 conejos por vía intraperitoneal con la proteína de fusión GST-6115 proveniente de la purificación por la columna. La primera dosis se administró empleando 50 µg de proteína emulsionada en adyuvante de Freund completo y las 2 dosis subsiguientes con 10 µg con adyuvante incompleto de Freund en un volumen final de 100 µl por conejo. Las inmunizaciones fueron realizadas cada 15 días. Antes de la primera inmunización se colectó una muestra de suero de los conejos (suero pre-inmune). Luego de la segunda inmunización se colectó una muestra de suero de los animales para determinar si levantaron título contra la proteína. Al finalizar las inmunizaciones, los conejos fueron sacrificados y se colectó el suero de los mismos.

4.6.- Depleción de anticuerpos inespecíficos

Para la depleción de anticuerpos anti GST o 6115 de los sueros se resuspendió resina Sepharose-GSH en una solución que contenía GST o 6115 en cantidades saturantes (más de 8 mg de proteína por ml de resina) lo que permite tener la proteína de interés adsorbida en la resina. Esta se incubaba con el suero a depletar (suero total o anti 6115, según corresponda) overnight a 4°C en rotación. Luego se coloca la resina en una columna y se eluye con TBS colectándose el percolado y varias alícuotas de 500 ul cada una que corresponden a suero depletado de anticuerpos anti GST o 6115 que quedaron unidos a la proteína que estaba adsorbida en la resina.

4.7.- Western Blot

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE son electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) durante 30 minutos a 0.6 mA/cm² de membrana en una cuba de transferencia semi-seca (Hoeffer, Pharmacia). Una vez finalizada la transferencia la misma es chequeada por tinción con Rojo Ponceau y las calles (cuando correspondía) son marcadas con lápiz. Las membranas posteriormente son bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con TBS Tween-20 0,5 % (T-TBS) y con leche descremada al 3% (T-TBSL). Se incuban luego con una dilución determinada de los anticuerpos primarios correspondientes en T-TBSL por 1,5 horas, luego se lavan 3 veces por 5 minutos en T-TBS y se las incuban en T-TBSL por 1 hora con la dilución adecuada de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (DAKO) (anti ratón 1/4000 y anti conejo 1/5000). Se realizan luego 3 lavados nuevamente con T-TBS de 5 minutos cada uno y un lavado final de 10 minutos con TBS. Todos los lavados e

incubaciones son realizados en agitación a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa es evaluada con el sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Pierce) y revelada en placas fotográficas (Kodak).

5.- INMUNOHISTOQUIMICA Y ANALISIS DE IMÁGENES

5.1.- INMUNOFLUORESCENCIA EN CEREBROS DE ADULTO Y LARVA

Las moscas fueron decapitadas en buffer de disección utilizando pinzas de disección nº5 (*Dumont*). Las cabezas se fijaron con paraformaldehído 4% en PB 0,1M durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. El tiempo de disección varió según el color de ojos de las moscas utilizadas y las particularidades de cada anticuerpo (las moscas de ojos blancos pueden fijarse por un período de hasta 3 hs en hielo, mientras que las moscas de ojos rojos por un máximo de 1,5 hs en hielo o 40 minutos a temperatura ambiente para evitar que los pigmentos del ojo afecten la preparación). Después de la fijación, las cabezas se enjuagaron en PT (PBS 0,1% Tritón X-100) y se disectaron en PT o buffer de disección mediante pinzas bajo una lupa Leica CLS 100X. La disección se realizó en placas de sylgard, bajo una fuente de luz fría. En el caso de la larva, se extrajeron los cerebros a partir de animales sin fijar, y fueron fijados por 1 hora a temperatura ambiente. El protocolo tanto para cerebros adultos como para cerebros de larva continuó igual. Se lavó el resto de fijador entre 3 y 7 veces, en PT, a temperatura ambiente y se bloqueó por 40 minutos con suero de cabra 7% en PT. Los cerebros se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C, generalmente ON, aunque el tiempo de incubación con el anticuerpo primario varía según cada caso.

A continuación se removió el anticuerpo primario y se hicieron numerosos lavados de aproximadamente 40 minutos cada uno con PT en agitación. Después se agregó el anticuerpo secundario diluido en PT (habitualmente 1:250) y se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente tratando de evitar la luz ambiental ya que los anticuerpos conjugados a compuestos fluorescentes son fotosensibles. Luego de remover el anticuerpo secundario los cerebros se lavaron exhaustivamente en tubos cubiertos por papel de aluminio, alrededor de 2 hs (a temperatura ambiente) en PT, cambiando la solución de lavado varias veces. En el caso de la tinción con faloidina-FITC (SIGMA P5282, dilución 1/100), ésta se incubó en simultáneo con el anticuerpo secundario. Finalmente, los cerebros se montaron en un portaobjetos de 3'' x 1'' x 1 mm (Fisher) en aproximadamente 20 µl de una solución conteniendo 80% de glicerol en PT, y se cubrieron con cubreobjetos de 18 mm de lado (Marienfeld GmbH). Los cerebros se colocaron en el centro de un cuadrado realizado con esmalte de uñas transparente y luego de cubrirse se sellaron con el mismo esmalte. Es recomendable guardar los portaobjetos a 4°C ya que se conserva mejor el tejido, evitando, además la exposición a la luz.

SOLUCIONES

PB (buffer fosfato) 10 x: 70mM Na₂HPO₄, 30mM Na₂HPO₄, pH 7,4

PBS 10x: PB 1x, 0,15 M NaCl, pH 7,4

Solución de bloqueo: 7% suero normal de cabra en PT

Stock de Paraformaldehído 8%: diluído en H₂O bidestilada, a 50°C, con 5gr de NaOH.

Mantenido a -20°C.

PT: PBS 1x, 0,1% Tritón X-100.

6.- Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Siempre que fue posible se realizó un ANOVA. La normalidad fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas se puso a prueba con el test de Levene. Un valor p de la prueba menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Luego de realizado el ANOVA, las comparaciones se hicieron con un test de mínima diferencia significativa de Tukey, con un α igual 0,05. Cuando en un ANOVA de dos factores la interacción entre factores fue significativa se realizaron evaluaciones de efectos simples y se informó el valor p. Cualquier consideración particular se explica en la figura correspondiente.

7.- Cultivo de células S2R+

7.1- Transfección

Las tranfecciones de células se realizaron utilizando el reactivo Effectene (Qiagen). Se utilizaron 0.5 ug de DNA + 60 ul fr buffer EC + 4 ul de enhancer. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó 5 ul de Effectene. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 350 ul de medio Schneider y se

sembró en placas MW24 donde en el fondo había un vidrio de cubre objetos. Luego se agregaron 250000 células (concentradas en 350 ul) y cada 24 horas se observó el estado de las mismas.

7.2.- Inmunohistoquímica

1. Sacar medio con la pipeta.
2. Lavar con PBS 1X (a 37°C el PBS).
3. Fijar con PARAFORMALDEHÍDO 4% (a 37°C el paraformaldehído) durante 15´a TA.
4. Lavar con PBS-T (Tween 0,05%) por 5 minutos.
5. Permeabilizar con TRITÓN X-100 0,1% en PBS por 30´a TA.
6. Lavar con PBS-T por 5´.
7. Bloquear SUERO NORMAL DE CABRA 1/10 en PBS-T por 1 h. A TA u ON a 4°C.
8. Incubar con el Ac 1° por 1 h a TA u ON a 4°C.
9. 3 lavados con PBS-T20, 0,05% por 10´ c/u.
10. Incubar con el Ac 2° dilución en SN de bloqueo por 1 h a TA.
11. 1 o 2 lavados con PBS-T por 10´c/u.
12. Incubar con el Ac 2
13. 2 lavados con PBS-T por 10´c/u
14. Pasar por H₂O (para lavar las sales del PBS)
15. Montar en glicerol 80% (3 µl), dejar secar, sellar con esmalte y guardar a 4°C

8.- Consumo de O₂ tisular

La determinación de la velocidad de consumo de O₂ se llevó a cabo mediante una técnica polarográfica, utilizando un oxígrafo desarrollado para respirometría de alta resolución (Hansatech Oxygraph, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, Reino Unido). El mismo consta de un electrodo de O₂ tipo Clark y una cámara de medida termostaticada.

Como muestra se utilizaron larvas enteras de estadio 2, a una edad cercana a su muerte. Debido a que su tamaño es menor a 1 mm³, que es la distancia a la cual el O₂ puede acceder libremente a todas las células por difusión, no existen zonas anaerobias ([Boveris and Boveris 2007](#)). Es importante destacar que como muestras se utilizaron larvas vivas. Las medidas se realizaron en una cámara de reacción termostaticada a 30 °C en un medio de reacción conteniendo 1 mL de solución reguladora Krebs compuesta por NaCl 118,5 mM; KCl 4,7 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 2,5 mM; NaHCO₃ 24,8 mM y glucosa 5,5 mM (pH 7,4), con agitación continua a 350 rpm. La velocidad de consumo de O₂ se determinó por la medida de la concentración de O₂ en la cámara de reacción durante 3 a 5 min ([Poderoso et al. 1994](#)). Los resultados se expresaron en ng-at O/min. g tejido.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial se agregó KCN 4 mM a la cámara de reacción ([Villani and Attardi 2007](#)). El KCN es un inhibidor de la citocromo oxidasa (complejo IV), ya que reacciona específicamente con el citocromo a₃, el aceptor final de la cadena de transferencia de electrones. Por lo tanto, el consumo de oxígeno remanente luego del agregado de KCN 4mM corresponde a fuentes no mitocondriales de consumo de O₂.

9.- Montado de cabezas en parafina para cortes

-Cortar y fijar cabezas en solución de Carnoy (Etanol, cloroformo, Ac.Acético; 6:3:1) ON a 4°C.

-Deshidratar con etanol (10min cada uno) en agitación:

2x ETOH 70%

2X ETOH 96%

2X ETOH 100%

-Hacer pasajes por:

ETOH 100% - Butílico 1:1 30 min.

Butílico puro 30 min.

Butílico- Tolueno 1:1 30 min.

Tolueno puro 30 min.

En estufa a 65°C

Tolueno- parafina 1:1 30 min.

2 x parafina 1 hora c/u

-Armar el taco bajo lupa.

10.- Análisis de los cortes de cerebros

Los cortes fueron fotografiados y cada imagen recibió un nombre en código al azar. De esta forma se categorizó de forma ciega cada imagen de 1 (buen estado general del cerebro) hasta 5 (mal estado general del cerebro, esto es subjetivamente menor densidad de células y mayor número de vacuolas). Estas categorías son subjetivas. La categorización se realizó 2 veces para asegurarse de que siempre se usó el mismo criterio para la asignación. En total se analizaron 212 fotos y hubo menos de 10 discrepancias entre cada asignación que fueron resueltas una vez terminado el análisis. Una vez categorizadas las imágenes sus nombres fueron decodificados y se construyó un gráfico de frecuencias de cada categoría para cada tratamiento (envejecido/joven y vehículo/droga).

11.- Búsqueda de compañeros genéticos de *orsai*

10.1.- *Screen* de deficiencias

El *screen* fue realizado utilizando las líneas de moscas del Bloomington Deficiency Kit (<http://flystocks.bio.indiana.edu>, Cook et al. 2012) para los tres cromosomas autosomales y los cromosomas X e Y.

Cada línea fue cruzada con GMR>osiRNAi a 25°C en ciclos de luz:oscuridad de 12 horas. Ambos ojos de por lo menos 50 líneas por cruce fueron analizados. Un *hit* positivo fue definido como que por lo menos un ojo de la mosca presentara decoloración y/o por lo menos una omatidia negra. Los genes de cada línea de deficiencia que dio un *hit* positivo (tanto mapeado a la secuencia como no mapeado a la secuencia, de acuerdo a www.flybase.org) fueron seleccionados para seguir siendo

investigados si aparecían en por lo menos otra lista de genes delecionados de otro *hit* positivo.

Los genes que se seleccionaron fueron analizados utilizando la Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>, (Huang da et al. 2009; Huang da et al. 2009)).

Se utilizó la herramienta Functional Annotation Tool con los identificadores de Flybase_Gene_ID como el tipo de lista. Luego se corrió la herramienta Functional Annotation Clustering previo ajuste de sus opciones. Estas fueron:

Functional Categories: COG_ONTOLOGY, SP_PIR_KEYWORDS, UP_SEQ_FEATURE.

Gene Ontology: GOTERM_BP_FAT, GOTERM_CC_FAT, GOTERM_MF_FAT

Pathways: BBID, KEGG_PATHWAY

Protein Domains: INTERPRO, PIR_SUPERFAMILY, SMART

Y se ajustó el umbral de enriquecimiento a 0.05.

Los genes obtenidos de estos agrupamientos se utilizaron para el subsiguiente *screen* de RNAi. Para cada gen seleccionado se eligieron dos líneas de RNAi del centro repositor Bloomington Drosophila Stock Center o de Vienna Drosophila RNAi Center (<http://stockcenter.vdrc.at/>). Ambas fueron sujetas por separado a un *screen* similar al realizado con las deficiencias.

12.- Hibridización *in situ*

Disección y fijado

Disecar la larva en PBS 1X. Transferir inmediatamente a 960 ul de PBS en hielo. Una vez obtenida la cantidad de muestras deseadas agregar 40 ul de FA (queda 4% FA en PBS). Fijar por 15' (tubo acostado con agitación media).

La disección puede hacerse tirando de los ganchos mandibulares de la larva y dejando todos los órganos unidos a ellos. La disección fina se puede realizar al terminar el protocolo.

Fijar en 4% FA/PBS 0.6% tritón X-100 (PT 0.6%) por 15-20'.

Lavar 3x 5' en PT 0.3% con agitación.

Para guardar el tejido lavar los cerebros con PBS y deshidratar en series de etanol (1x 5' en etoh 25%, 50%, 75%, y 2x 5' en 100%). Guardar a -20 °C en EtOH 100%. Para retomar el protocolo lavar 1x 10' en PT 0,3%.

Digerir el tejido con 1000 ul de proteinasa K 10 ug/ml en PTW 0,1% por 10', invertir los tubos ocasionalmente durante la digestión.

Remover la solución de proteinasa K y lavar dos veces con glicina 2 mg/ml en PTW 0,1% (2 minutos cada lavado).

Lavar 2x 5' con PTW 0,1% a TA con agitación.

Fijar en 4% FA/PTW 0,1% por 20' con agitación (108ul FA + 892ul PTW).

Lavar 5x 5' en PTW 0,1% a TA con agitación.

Lavar con SndH/s:PBS 1:1 y luego con SndH/s al 100% (10' cada lavado).

2-3 hs a 50-55 °C con SNdH/c 700 rpm.

Desnaturalizar la sonda: 5' en agua hirviendo con el salvavidas (o Thermomixer 95 °C).

Pasar a hielo rápido. Darle un spin para bajar lo que hay en las paredes.

Hibridización: 150 ul de dilución de sonda desnaturalizada en SNdH/c ON (+12 hs) a 50° C 700 rpm.

Dilución óptima de la sonda determinada por Dot-Blot y el volumen final siempre es 150 ul

La solución agregada debe estar a la misma T° en la que la muestra se estaba prehibridizando, 50°C

1x 30' a 55 °C en 750 ul de SNdH/s con agitación media acostado.

1x 15' a TA en 1000ul de SNdH/s:PTW (1:1) con agitación media acostado.

3x 5' a TA en 750 ul de PTW con agitación media acostado.

Agregar 150 ul de Rvodb (comercial). Incubar 1 hora a TA con 700 rpm vertical.

Incubar con 100ul AC antiDIG durante 2 hs a TA 700 rpm vertical.

AC 1/3000 (hacer dilución 1/100 y después 1/30) en 1000ul de PTW

10' antes de que termine preparar SNdT

Lavar 2 x 10' con 1000ul de SNdT.

Solución de Tinción	
NaCl 4M	25 ul
MgCl ₂ 1M	50 ul
Tris	9,5 100 ul
	1M
Tween 20	1 ul
H ₂ O mq	825 ul

Prepararla 10 min antes de usar. Volúmenes por muestra.

A partir de este paso, hacer todo en oscuridad.

Agregar NBT +BCIP (guardado a 4º, manipular con guantes) con SNdT.

SNdT	250 ul
NBT	1,2 ul
BCIP	0,9 ul

Por muestra.

Incubar en wells quietos (MW96/tapa de aluminio)

Chequear cada 20', hasta que se vea tinción específica (azulado). El tiempo de tinción depende de la sonda, del nivel de RNAm, etc (3 h o más). Exponer lo menos posible a la luz intensa.

Lavar 2 x 10' en PTW 0,1% (stop).

Agregar 70% glicerol en PTW 0,1%. Dejar a 4°C hasta que los embriones u órganos caigan al fondo.

Montar en glicerol 80%.

Resultados

Capítulo 1

To strive, to seek, to find, and not to yield.

Ulysses, Lord Tennyson

Identificación de un locus mutante

1) Selección del mutante

Para identificar genes nuevos involucrados en procesos neurodegenerativos se partió de un *screen* de actividad locomotora donde se comparó el patrón de actividad de individuos jóvenes vs envejecidos (ver introducción). Aquellas líneas que mostraban comportamientos alterados (particularmente, la pérdida de la ritmicidad comportamental) en edades avanzadas y no así cuando jóvenes fueron consideradas portadoras de alteraciones en genes que confieren susceptibilidad a neurodegeneración y por lo tanto se seleccionaron como mutantes interesantes para estudiar sus genes afectados en relación con la neurodegeneración (Rezaval et al. 2008).

Una vez seleccionado el mutante se procedió a identificar el gen afectado por la inserción. Para esto en el laboratorio se realizó previamente un rescate de plásmido y posteriormente se secuenció la región genómica contigua, localizando así a la inserción. Esta se encuentra entre dos genes del cromosoma 2L, hasta el comienzo de esta tesis, desconocidos: CG6115 y CG15133 (figura 1.1). Durante el transcurso de la tesis, este último CG fue caracterizado y su anotación corregida para incluir al CG15134 y CG4841, por lo que se lo pasó a anotar como CG42555 y fue nombrado *tweek* (Verstreken et al. 2009). *tweek* codifica para una proteína involucrada en el reciclado vesicular sináptico, por lo cual es de esperar que su desregulación dispare disfunción neuronal.

La localización exacta de la inserción fue determinada mediante PCR. De esta forma se pudo ubicar el transposón a 218 pb del ATG del CG6115 y a 1323 pb del de *tweek*.

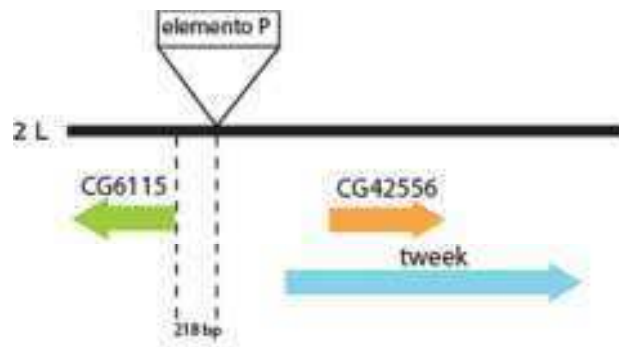


Figura 1.1 – Diagrama del locus mutante. El mutante 100B se generó por la inserción al azar de un elemento P en el cromosoma 2, brazo L. Un extremo del elemento P se encuentra a 218 pb del +1 del CG6115 y el otro extremo a 1323 pb de *tweek*. Dentro de la secuencia de *tweek* está el CG42556, un gen aún no caracterizado.

Localización y estructura

2.1) Análisis bioinformático

2.1.1) Estructura general de la proteína codificada por el CG6115

Para poder determinar cuál de los genes potencialmente afectados por la inserción del transposón era el responsable de los fenotipos observados en los ensayos de actividad locomotora nos propusimos investigar a CG6115 (ver más adelante), que aún seguía no caracterizado. Este gen codifica para una proteína de 85 aminoácidos,

en la cual, al realizar un BLAST con su secuencia, se identifica un dominio Complejo 1 LYR, perteneciente a la superfamilia de proteínas Complejo 1 LYR 1 (figura 1.2).



Figura 1.2 – Diagrama de la estructura primaria de la proteína predicha para el CG6115. De los 85 aminoácidos que componen la proteína de CG6115, del residuo 6 al 59 (un 62% del total) son detectados como pertenecientes al dominio LYR Complejo 1, que pertenece a la superfamilia LYR 1 Complejo 1.

Esta familia se encuentra representada en plantas, hongos y animales (figura 1.3). En *Saccharomyces cerevisiae* hay evidencia de que está involucrada en la biogénesis del grupo Fe-S en mitocondria (Atkinson et al. 2011). En tripanosomátidos se describió en *Phytomonas serpens* como componente de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Cermakova et al. 2007) y en mamíferos, uno de los ortólogos más estudiados es la proteína LYRM1. Esta proteína está involucrada en la promoción de la proliferación y en la inhibición de la apoptosis durante el desarrollo del corazón (Zhu et al. 2010) y específicamente en humanos está involucrada en la promoción de la proliferación y en la inhibición de la apoptosis de preadipositos (Qiu et al. 2009).



Figura 1.3 – Alineamiento del CG6115 con proteínas de otras especies. El CG6115 tiene una alta identidad con proteínas de varias especies de animales e incluso de plantas y hongos. Las secuencias en este alineamiento son las de mayor valor E de cada especie elegida. Estas secuencias se corresponden con: LYR motif-containing protein 4 isoform 2 (*Homo sapiens*) identidad 27%, LYR family of Fe/S cluster biogenesis protein (*Arabidopsis thaliana*) identidad 28%, iron-sulfur cluster biosynthesis protein Isd11 (*Neurospora crassa*) identidad 28%, Iron-sulfur protein biogenesis, desulfurase-interacting protein 11 (Isd11p) (*Saccharomyces cerevisiae*) identidad 24%, LYR motif-containing protein 5 isoform X1 (*Rattus norvegicus*) identidad 48% y growth hormone-inducible soluble protein (*Mus musculus*) identidad 49%.

2.1.2) Predicción de la localización

Con el fin de determinar la localización subcelular del CG6115 se utilizaron distintos servicios de predicción bioinformáticos. Los resultados fueron variados: 5 de los 6 servidores que pudieron asignar una localización predijeron la localización del CG6115 en mitocondria, aunque uno de ellos con baja probabilidad. En 4 la localización fue predicha en el citoplasma, aunque solo en 2 de esos servidores esta localización fue la principal o única. También fueron predichas otras organelas, pero nunca como principales (tabla 1.1).

Servidor	Localización predicha
Wolfpsort	mitocondria: 14.0 núcleo: 13.5 citoplasma nuclear: 9.0 citoplasma: 3.5
BaCellO	Mitocondria
Yloc	Mitocondria
subCellProt	Citoplasma
SherLoc2	mitocondria: 0.48 citoplasma: 0.38 núcleo: 0.12 peroxisoma: 0.01
MultiLoc2	citoplasma: 0.54 núcleo: 0.32 vía secretoria: 0.09 mitocondria: 0.05

Tabla 1.1 – Localización predicha del CG6115. La mayoría de programas de análisis predicen que la proteína codificada por el CG6115 se localizaría en la mitocondria, y en menor medida como nuclear y citoplasmática entre otras localizaciones de menor frecuencia.

2.2) Localización del CG6115

Una aproximación *in vivo* que utilizamos para dilucidar la localización del CG6115 fue clonar el marco abierto de lectura del gen en un vector de expresión para

células embrionarias de *Drosophila* llamadas S2 R+. El vector empleado poseía un promotor constitutivo de *actina* y generaba una proteína de fusión con GFP. Al transfectar las células pudimos detectar la expresión de la proteína de fusión en el citoplasma, pero sin poder asignar una estructura o región subcelular más específica a la localización del CG6115. En unas pocas células fue posible observar una marca más intensa de forma punteada cercana al núcleo (figura 1.4).

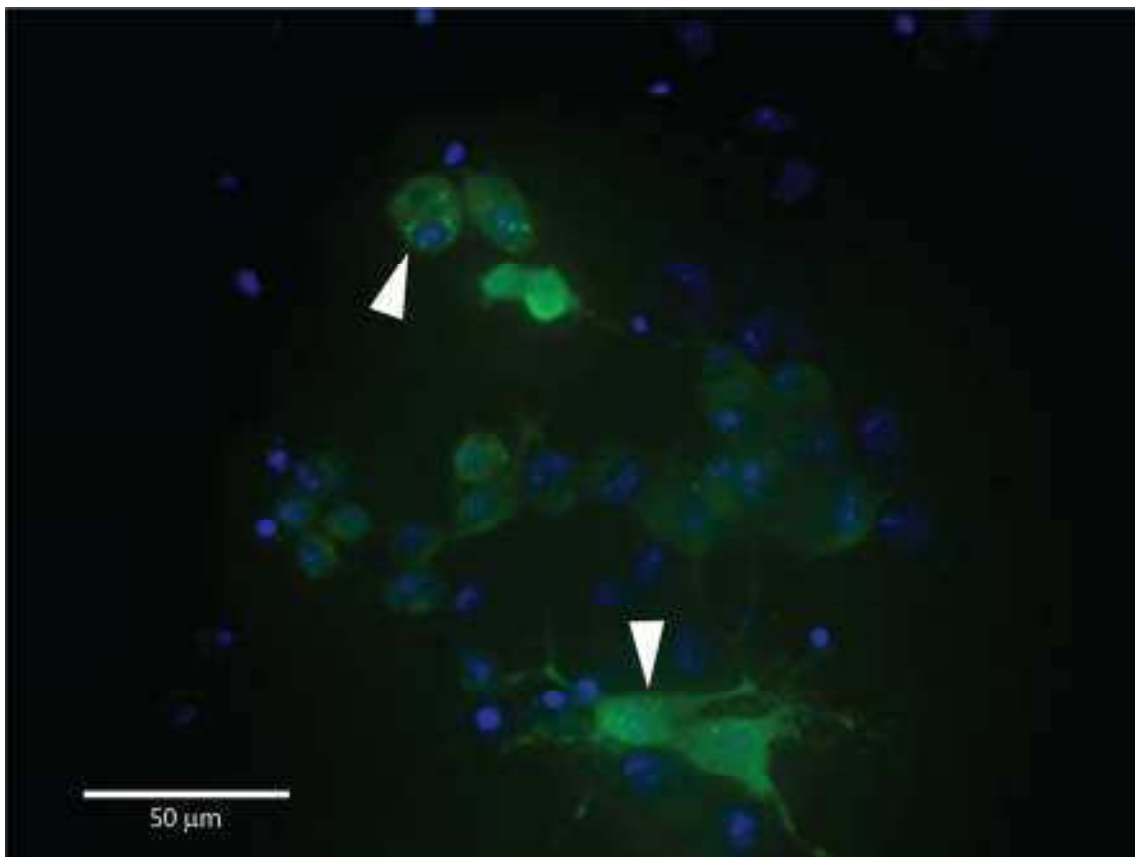


Figura 1.4 – Transfección de células S2R+. La imagen muestra células S2R+ que expresan transitoriamente la proteína de fusión, de localización ubicua. Un porcentaje de las células transfectadas muestran agregados, derivados de la expresión constitutiva bajo un promotor fuerte (cabeza de flechas).

2.3) Localización del ARNm del CG6115

Posteriormente utilizamos la técnica de hibridización *in situ* para detectar la presencia de ARNm del CG6115. Analizamos cerebros de moscas adultas y todos los órganos de larvas 3. No pudimos observar diferencias entre las sondas sentido (que no deben dar marca) y la marca de la sonda antisentido en ningún órgano ni estadio (figura 1.5) mientras que la marca del control positivo (DILPs) fue fácilmente identificable, indicando que la técnica funcionaba. Dado el tamaño del gen (258 pares de bases) no pudimos sintetizar una sonda con otra secuencia para repetir este experimento ya que la sonda original ya abarcaba casi la totalidad del gen y reducir su tamaño no era funcional para el esta técnica.

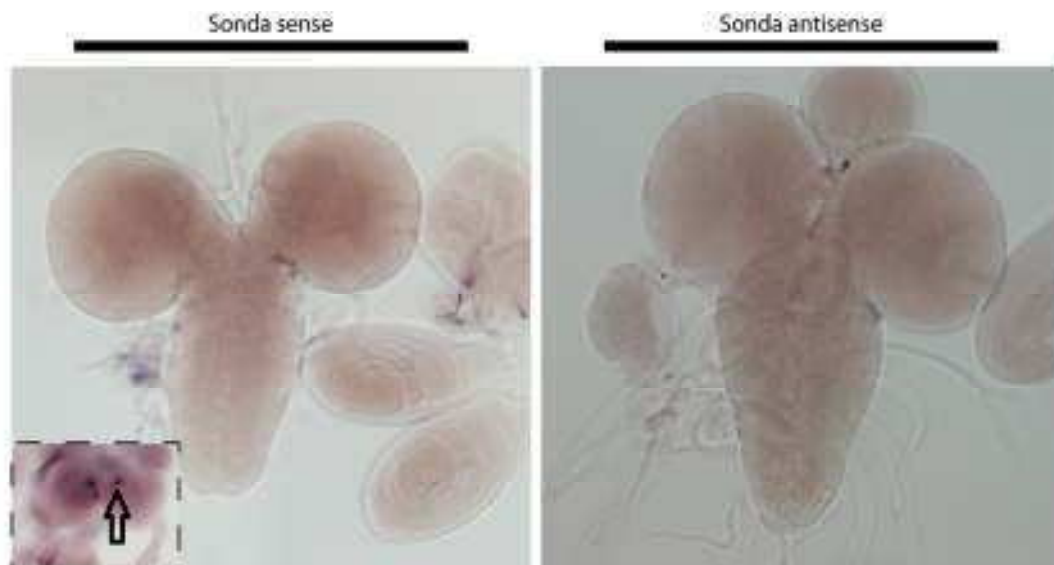


Figura 1.5 – Hibridización *in situ* de cerebros de larva white en el estadio 3. Ejemplos de órganos dónde se intentó localizar al CG6115. La figura control de la izquierda incluye al cerebro de una larva 3 y sus discos imaginales. El cerebro de la derecha no presenta una marca distintiva respecto de su control. En el recuadro de la figura de la izquierda se muestra el control positivo con una sonda contra DILPs donde la marca positiva se señala con una flecha.

Capítulo 2

“Eran larvas, pero larva quiere decir máscara y también fantasma.”

Axolotl - Julio Cortázar

Descripción del fenotipo en la larva

1) La mutante homocigota presenta arresto en el desarrollo

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo por lo que su ciclo de vida se puede dividir en cuatro fases morfológicas: el huevo, la larva, que consta a su vez de 3 estadios principales, la pupa y finalmente el adulto.

Inicialmente se observó que los mutantes 100B homocigotas ($100B^{-/-}$) nunca llegaban a adulto. Al mirar más en detalle este fenotipo se vio que las larvas homocigotas eran capaces de eclosionar del huevo y mudar de larva I a larva II, pero luego quedaban arrestadas en este estadio. A las 76 horas post ovipuesta mientras que los mutantes heterocigotas ($100^{+/-}$) se encontraban activamente comiendo dentro de la comida, los $100^{-/-}$ la abandonaban y empezaban a mostrar un comportamiento similar al *wandering* de las larvas III, pero con la salvedad que en lugar de reptar por las paredes hasta llegar a la tapa de la placa donde se las mantiene, quedaban reptando por el sustrato. Finalmente las $100^{-/-}$ morían alrededor de las 80 horas AEL (figura 2.1).

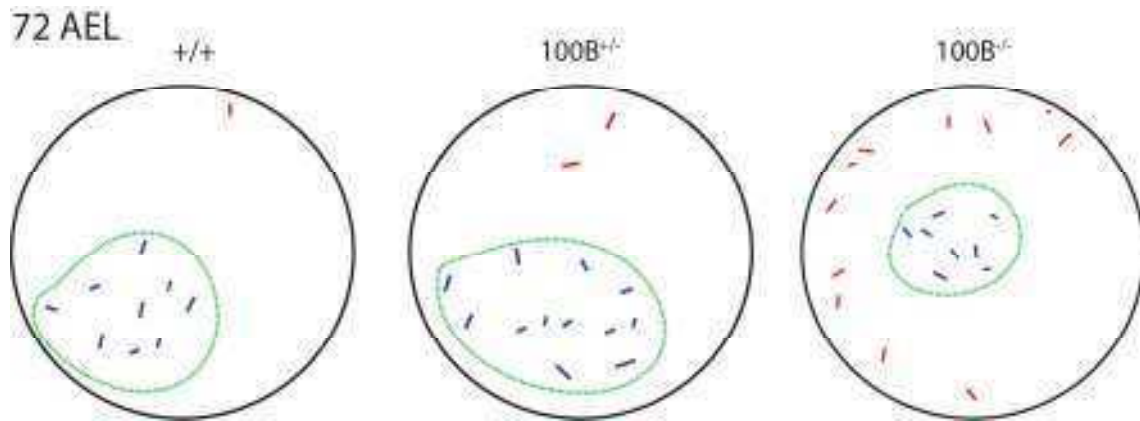


Figura 2.1 – Diagrama representativo de larvas alimentándose. En negro se denota el borde de la placa, en verde el borde de la comida (pasta de levadura). Para cada genotipo se muestra la representación de larvas de 72 hs AEL; en azul, las que están dentro de la comida (comiendo activamente o no) y en rojo aquellas que se encuentran fuera de la misma. Las larvas $100B^{-/-}$ en proporción tienen más larvas fuera de la comida. Para las 80 hs AEL la gran mayoría estará fuera de la comida y muerta. La mayoría de las larvas $100B^{+/-}$ permanecerán dentro de la comida y continúan su desarrollo normal hasta la adultez, como las moscas silvestres (*w*-).

Existen distintas causas que pueden provocar un arresto en el desarrollo, las principales son:

- La imposibilidad de ingerir comida y llegar al peso crítico, como en el caso de la mutación de *pumpless* (Zinke et al. 1999).
- La desregulación del gen *npf*, análogo al péptido NPY de mamíferos (Nassel and Homberg 2006).
- La desregulación a algún nivel de la señalización por ecdisona (Gates et al. 2004).
- La insuficiencia de disponibilidad de O_2 (Wingrove and O'Farrell 1999).

La progresión a través del ciclo del vida de la mosca depende de pulsos de la hormona esteroidea ecdisona. Esta hormona dirige las transiciones más importantes

del desarrollo, incluyendo a la muda y la formación del pupario (figura 2.2). Los efectos de la ecdisona son mediados por un heterodímero compuesto por el receptor de ecdisona (EcR) y *ultraspiracle* (USP), el ortólogo en moscas de RXR (Riddiford et al. 2000). Al unirse con ecdisona este dímero induce la expresión génica de genes tempranos que, a su vez, coordinan la expresión de genes tardíos que son responsables de las respuestas estadio y tejido-específicas durante el desarrollo. Mutaciones en EcR y USP llevan a defectos y retrasos en la muda de las larvas. Muchas de estas mutaciones provocan individuos que mantienen la cutícula y los ganchos bucales característicos del estadio anterior.

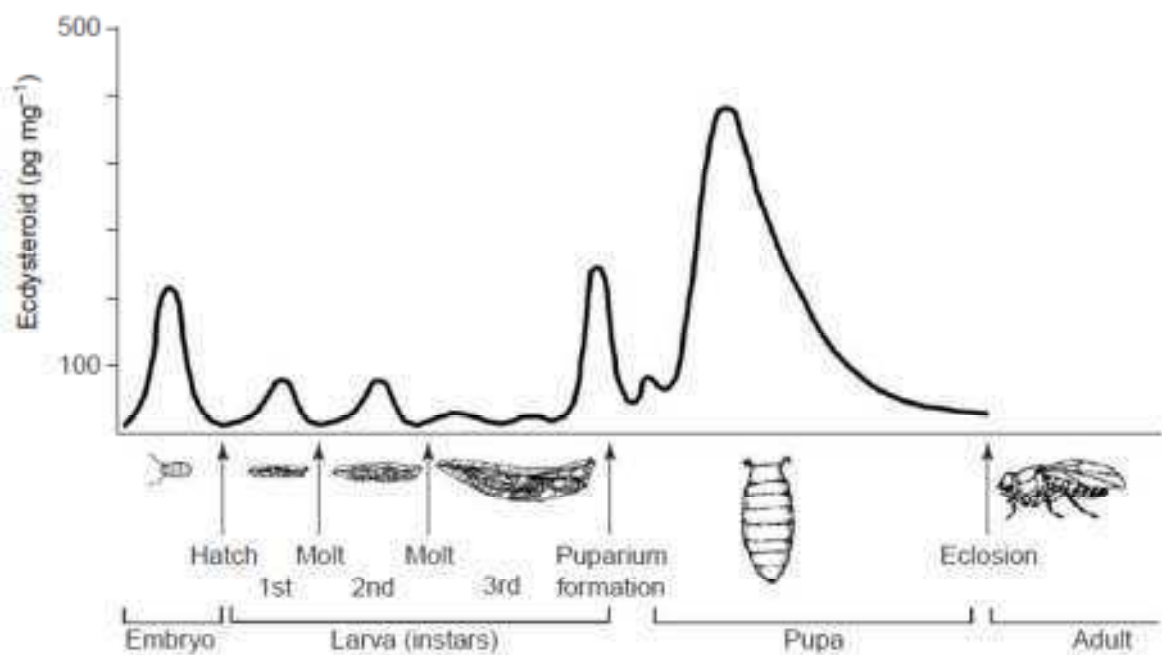


Figura 2.2 – Diagrama de los niveles de 20E a lo largo del desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

Antes de cada cambio crítico en el ciclo de vida de la mosca hay un aumento de la 20E. El primero ocurre antes de la eclosión, luego dos pequeños antes de cada muda larval y luego uno mayor antes de la formación de la pupa. El mayor aumento de 20E ocurre en la pupa, antes de la emergencia del pupario del adulto (imagen tomada de (Kozlova and Thummel 2000)).

Al morir, las larvas mutantes homocigotas son fenotípicamente idénticas a las larvas II silvestres, aunque de menor tamaño (figura 2.3). Esto nos llevó a descartar problemas en la muda por un defecto en la vía de señalización de ecdisona, ya que si este fuera el caso se deberían ver superpuestas las estructuras de los ganchos bucales de la larva II y de la larva III y de las cutículas de estas.

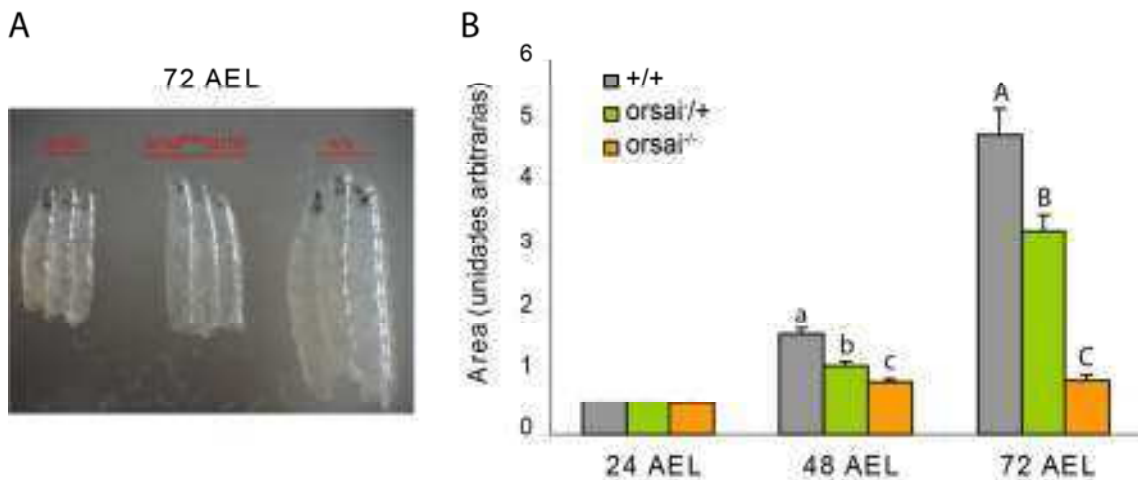


Figura 2.3 – Diferencia de tamaño entre los distintos genotipos. A. Al eclosionar no hay diferencias entre el tamaño de las larvas. Ya para las 48 hs AEL el mutante homocigota presenta diferencias significativas y se va quedando atrás en el crecimiento. A las 72 hs AEL el homocigota muestra un marcado retraso en el crecimiento y presenta un área total similar a la que poseía a las 48 hs AEL. El mutante heterocigota también presenta un menor tamaño a 48 y 72 hs AEL comparado con el control, pero puede continuar su desarrollo y llegar a adulto. **B.** Cuantificación del tamaño de larvas. Distintas letras indican diferencias significativas. Las barras son SEM y $\alpha=0.05$.

Debido a este comportamiento de evitar la comida (o sea, por el hecho de encontrar a las larvas mutantes en un lugar donde no les corresponde estar) decidimos llamar a este gen *orsai* que, en la jerga argentina, se corresponde con la regla del *off side* en el fútbol.

2) Las larvas $100^{-/-}$ se alimentan normalmente

Para examinar si las larvas $100^{-/-}$ se alimentaban, se coloreó la pasta de levadura con la que se las alimenta con colorante para comida. De esta forma pudimos observar que el contenido de comida en el intestino era despreciable frente a la de los controles (figura 2.4), sugiriendo que eran capaces de comer, ya que un defecto mecánico en las estructuras requeridas durante la alimentación impedirían ver alguna coloración en el interior, tal como ocurre por ejemplo en el caso del gen *pumpless* (Zinke et al. 1999). Por lo tanto la disminución en la ingesta de estas larvas es debido a otro defecto distinto al mecánico.



Figura 2.4 Tinción de intestino de larvas. Larvas de 72 AEL presentan alimento teñido de azul en su intestino, aunque en una proporción menor en las larvas mutantes homocigotas.

3) La disminución de la función de *orsai* no afecta la detección de estímulos quimiotácticos

Una posibilidad alternativa para explicar el fenotipo frente a la comida era que las larvas no pudiesen detectarla; para evaluar dicha posibilidad se realizó un ensayo de olfacción. Larvas $100^{-/-}$ y sus controles fueron colocados en una arena con un estímulo positivo de un lado y otro neutro del otro (Heimbeck et al. 1999). Las larvas

mutantes no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles. De esta forma se pudo descartar un problema quimiotáctico (figura 2.5).

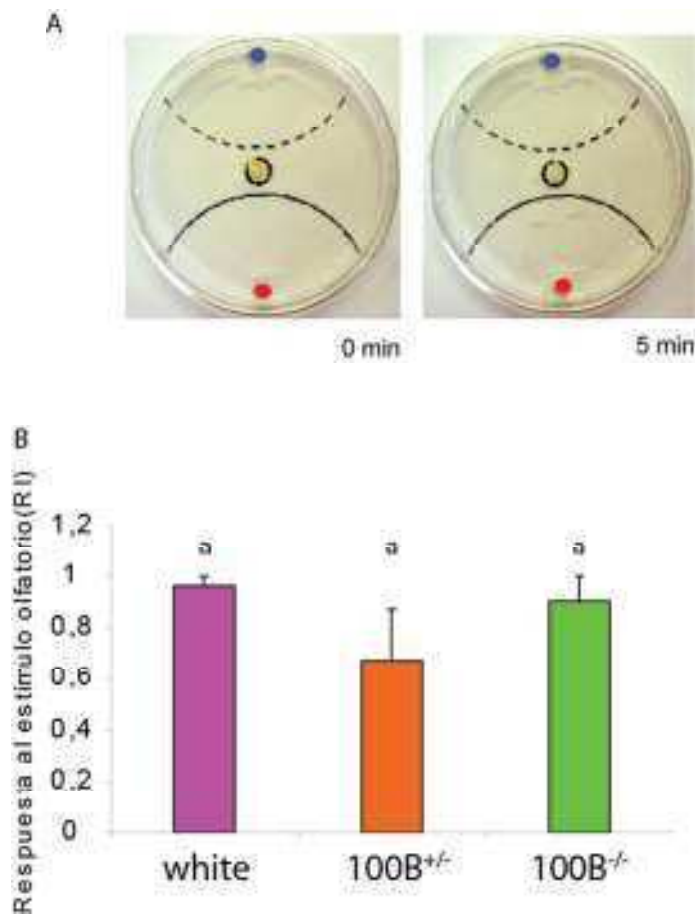


Figura 2.5 – Ensayo de olfacción de larvas mutantes. En A se muestra la arena experimental donde se ensayó la capacidad de atracción por un estímulo olfatorio positivo frente a uno neutro. El punto rojo en las placas representa el papel embebido en el estímulo positivo (ácido propiónico) y el punto azul al estímulo neutro (agua). A los 0 minutos todas las larvas se disponen en el centro y luego de 5 minutos se contaron cuántas están dentro del área perteneciente a cada estímulo (área punteada agua, área continua ácido propiónico). En B se cuantifica la respuesta de acuerdo al estímulo positivo. Todos los genotipos responden, sin diferencias significativas, prefiriendo el estímulo positivo. Para cada ensayo se utilizaron 50 larvas l; la evaluación se repitió 3 veces para cada genotipo. Mismas letras indican diferencias no significativas. Las barras son SEM y $\alpha=0.05$.

4) Requerimiento espacial de la función de *orsai*

Teniendo en cuenta que la inserción del transposón podría estar afectando varios genes decidimos utilizar ARNis específicos para definir al gen responsable del fenotipo observado. Evaluamos dos ARNis para el CG42555 y dos para *orsai*. Solo uno de dichos ARNis logró fenocopiar la letalidad del mutante. Este corresponde a la línea 29711 de la colección GD del VDRC (ver materiales y métodos). A lo largo de esta tesis dicha línea será identificada como *orsai*^{ARNi}. Al cruzar esta línea por el promotor ubicuo de *actina* se logró copiar el fenotipo mutante. De esta forma confirmamos que el fenotipo de evitar la comida es producido por la falta de función de *orsai* y que este ARNi reduce lo suficiente la expresión de este gen como para lograr reproducir el comportamiento mutante cuando se lo expresa junto a *dicer II*, una proteína de la maquinaria de interferencia de ARN, que potencia la acción de los ARNi.

En la tabla 2.1 presentamos una lista de líneas GAL4 evaluadas en contexto de *orsai*^{ARNi} para determinar en qué tejidos la reducción de la expresión de este gen fenocopia la letalidad. En esta lista *actina*, *heat shock* y *8185-Gal4* (que se expresa en todos los tejidos salvo en el SNC) recapitularon el fenotipo mutante. En cambio, en el caso de *elav* -que se expresa en todas las neuronas del sistema nervioso central-, *npf* en un subgrupo de neuronas relacionadas con la motivación para alimentarse, *8816-Gal4* en motoneuronas, *8764-Gal4* en motoneuronas y músculos en un patrón segmento específico, y *loco* y *repo* en glía, no lograron recapitular el fenotipo mutante. Por otro lado, *mef2* y *24B* que se expresan en todos los músculos (estriado, visceral y cardíaco) (Talsma et al. 2012) así como en las neuronas laterales ventrales pequeñas

(únicamente en el caso de *mef2*) lo recapitulaban, mientras que *8182-Gal4* que se expresa en el sistema nervioso, en músculo estriado y en músculo cardíaco en el adulto, *twist* que se expresa en todos los músculos en el embrión, *6450-Gal4* en el mesodermo embrional, músculo estriado larval y discos imaginales de alas y MHC que se expresa únicamente en el músculo estriado, no mostraron diferencias con los controles. El caso de *pumpless*, *larval serum protein* y *take out* -que se expresan principalmente en el cuerpo graso- tampoco mostraron diferencias.

Expresión ubicua	Cuerpo graso	Sistema Nervioso	Músculo	Otros
<i>actina</i>	<i>pumpless</i>	<i>elav</i>	<i>mef2</i>	<i>breathless</i>
heat shock	<i>larval serum protein</i>	<i>npf</i>	8182	
8185	<i>take out</i>	<i>loco</i>	<i>twist</i>	
		<i>repo</i>	6450	
		8816	24b	
		8764	MHC	

Tabla 2.1 – Promotores empleados para identificar el sustrato anatómico del requerimiento de *orsai*.

Cada línea fue cruzada por *dicer II*; *orsai*^{ARNi} y la respuesta de su descendencia frente a la comida registrada. Las cruces cuyas larvas presentaban un fenotipo similar al del mutante eran registradas como positivas (en negrita). Las líneas cuyo nombre son solo números son *enhancer traps* (líneas que promueven la expresión de Gal4 en un patrón espacial específico pero que se desconoce que gen representan) y el número es el de identificación del repositorio BDSC.

5) Rol de *orsai* en la motivación para alimentación

A pesar de no haber observado un fenotipo letal al expresar *orsai*^{ARNi} mediante el promotor panneural *elav* decidimos investigar de todas formas si alguna población

en particular de neuronas era sensible a la desregulación de *orsai*, por considerar que la falta de fenotipo podría deberse a un bajo nivel de expresión del ARNi causado por los limitados niveles de expresión soportados por dicho promotor. Por esto expresamos *dicer II; orsai^{ARNi}* bajo el control del promotor del neuropéptido *npf*. Este neuropéptido está emparentado con el péptido NPY de mamíferos y, como este, está involucrado en la regulación de la alimentación. *npf*, más específicamente, está relacionado con la motivación para la ingesta (Nassel and Homberg 2006). La expresión de este gen es alta en el cerebro de la larva durante la fase de ingesta y cae en las fases más tardías en las cuales la larva deja de alimentarse. Si se reduce la expresión de *npf* tempranamente, la larva empieza a comportarse como una larva más tardía. Estos fenotipos nos llevaron a pensar que si *orsai* era desregulado en las neuronas que producían *npf* y estas eran sensibles a esta injuria, tal como lo son las neuronas *pdf*, entonces deberíamos ver el mismo fenotipo que las larvas mutantes. Sin embargo, no se pudo observar ninguna diferencia frente a los controles al expresar esta combinación genética, lo que llevó a postular que la señal que provoca el cambio comportamental no se genere en el cerebro de la larva sino que provenga de algún otro tejido.

6) Niveles de expresión de *orsai* en distintos tejidos

El cuerpo graso en las moscas es una estructura esencial para el almacenamiento y utilización de energía. Pero también está involucrado en la síntesis de la mayoría de las proteínas de la hemolinfa e incluso en gran parte del metabolismo intermediario, como el metabolismo de lípidos y carbohidratos, síntesis proteica y metabolismo de aminoácidos y nitrógeno. Entre las proteínas que sintetiza se

encuentran varios transportadores de aminoácidos que funcionan como sensores de nutrientes. De esta forma, y gracias a las reservas nutricionales que acumula, el cuerpo graso es capaz de modular la tasa de crecimiento, el momento de la metamorfosis y el desarrollo de los oocitos ([Arrese and Soulages 2010](#)).

Tejido	Señal de ARNm	Enriquecimiento
Cuerpo graso	3179 ± 366	2.8
Carcasa	1577 ± 111	1.39
Tráquea	1381 ± 56	1.22
Intestino posterior	1336 ± 51	1.18
Glándula salival	1187 ± 43	1.05
SNC	1094 ± 50	0.97
Túbulos	1091 ± 14	1
Intestino medio	804 ± 25	0.71

Tabla 2.2 – Niveles de expresión del CG6115 en distintos tejidos larvales. Los tejidos fueron ordenados de mayor a menor señal de ARNm, siendo el cuerpo graso el tejido con mayor expresión de toda la larva, con valores cercanos al doble de la estructura que le sigue en cantidad de señal, la carcasa. Esta estructura se refiere a los restos del cuerpo de la larva que no se corresponden con ninguno de los otros tejidos nombrados en la tabla. El enriquecimiento es la comparación de la señal del ARNm contra la señal de la mosca entera. Fuente: Fly Atlas.

Utilizando Fly Atlas (flyatlas.org), obtuvimos información sobre los niveles de expresión de *orsai* en distintos tejidos de la mosca. Como se ve en la tabla 2.2, es en el cuerpo graso donde el nivel de expresión de *orsai* es mucho mayor que el promedio del resto de los tejidos. Por esto, y por su gran importancia para el metabolismo de la mosca, evaluamos las consecuencias de reducir la expresión de *orsai* en este tejido. Para

lograrlo utilizamos *drivers* específicos del cuerpo graso: *ppl*-GAL4, *lsp*-GAL4 y *to*-GAL4 ([Xu et al. 2008](#)). La reducción de la expresión de *orsai* en este tejido no fenocopió al mutante, por lo que descartamos que sea la disfunción de este gen en el cuerpo graso el causante de la letalidad observada.

7) Evaluación de la potencial contribución de ORSAI al funcionamiento del complejo I de mitocondria

De acuerdo a los resultados obtenidos por análisis bioinformáticos (figura 5), se procedió a investigar si la letalidad provocada por la falta de *orsai* podría deberse a una disfunción del Complejo I NADH:ubiquinona oxidoreductasa. Para esto utilizamos una proteína de levaduras, *ndi1*, previamente caracterizada como capaz por sí misma de rescatar la falta de función del Complejo I ([Sanz et al. 2010](#)) al ser sobreexpresada. Para examinar dicha posibilidad coexpresamos la línea *dicer II; orsai^{ARNi}* junto con *ndi1* bajo el control del promotor muscular *mef2*. De esta forma se esperaba que, al recrear el fenotipo letal, este fuera rescatado por la proteína de la levadura. Lamentablemente no se observó un rescate del fenotipo letal, pero de todas formas esto no descarta la posible disfunción del complejo I mitocondrial producida por el *orsai^{ARNi}*. Una posible explicación es que los niveles de expresión logrados con *mef2* no sean suficientes para remedar la disfunción ocasionada por este ARNi. Otra posibilidad es que dicha disfunción no afecte a las células a nivel energético, sino que podría provocar especies reactivas de oxígeno (ROS) que, independientemente del rescate de la función de la cadena respiratoria por *ndi1*, conlleven al fenotipo letal observado.

Curiosamente, al realizar una IHC utilizando el promotor *mef2* para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) con señal de localización de mitocondrias

observamos marca de GFP no solo en el músculo, sino también en las tráqueas (figura 2.6). Teniendo en cuenta esto y el resultado del *screen* en ojo adulto (ver más adelante) donde se encontró un gen que posiblemente interactúa con *orsai* que está involucrado en tubulogénesis, y por ende, en la generación de tráqueas entre otras estructuras, decidimos evaluar qué ocurría al utilizar *orsai*^{ARNi} bajo el control del promotor de *breathless*, que dirige la expresión hacia las tráqueas (tabla 2.1). Esta combinación logró fenocopiar a la larva mutante. De esta forma pudimos determinar el menor patrón de expresión necesario para recrear el fenotipo mutante.

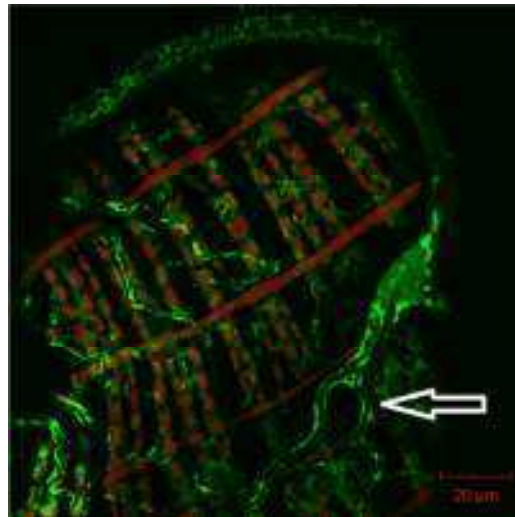


Figura 2.6 – Expresión de mitoGFP dirigida por *merf2*. En verde se observa la expresión de mitoGFP y en rojo faloidina para marcar las estructuras con actina. La flecha marca la presencia de marca no solo en el músculo sino también en tráqueas.

8) Consumo de oxígeno

Se analizó el consumo de oxígeno de larvas en estadio 2 (a una edad cercana a la muerte) de mutantes de *orsai*, *actina* > *orsai*^{ARNi} y larvas control (*w*), mediante un oxígrafo.

Los resultados muestran que los mutantes presentan basalmente una respiración disminuida tanto frente a los controles como con el ARNi. Este último resultado puede deberse a que la mutación afecta de forma más severa los niveles de expresión de *orsai* que el ARNi (figura 2.6).

Al tratar con KCN a las larvas para medir el consumo no mitocondrial de oxígeno se observó que tanto los controles como el ARNi presentan una caída en el nivel de consumo de oxígeno, mientras que en las larvas mutantes el nivel basal de consumo se mantiene constante, sugiriendo que estas larvas presentaban una disfunción mitocondrial desde el inicio. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas.

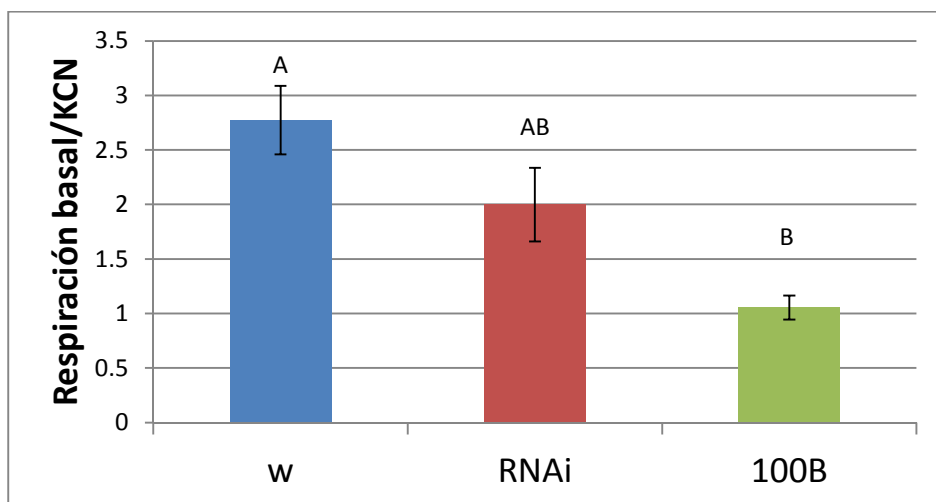


Figura 2.6 – Respiración mitocondrial en larvas. Tanto en el control w como en las larvas con la expresión de *orsai* disminuida de forma ubicua se observa que la respiración basal es entre una y una vez y media mayor que la respiración sin mitocondrias. Para el mutante 100B, en cambio, la respiración basal y la que ocurre en ausencia de mitocondrias es similar. Letras distintas indican diferencias significativas. $\alpha = 0.05$, las barras son SEM, $n = 3$.

9) Generación de suero anti *orsai*

Teniendo en cuenta el resultado anterior decidimos generar anticuerpos para localizar exactamente qué tejidos y estructuras subcelulares se expresa *orsai*. Para esto se clonó y expresó el ORF del gen fusionado a GST. Luego de purificarlo mediante una columna de afinidad e inmunizar conejos se evaluó mediante Western Blot la especificidad de este suero. Tanto la fracción pura como la pre-adsorbida con la proteína recombinante no mostraron diferencias. Por esto se contrató un servicio para la generación de dos sueros anti *orsai*, uno para el extremo amino y otro para el carboxi terminal (GeneScript).

10) Localización de *orsai* mediante inmunohistoquímica

Para las IHC usamos larvas III *wandering* enteras. Buscamos señal específica en todos los tejidos, pero solo pudimos localizar señal en el músculo visceral cercano al proventrículo en una estructura semejante a las bandas Z del músculo (figura 2.7). El músculo visceral de *Drosophila* presenta una organización más similar al músculo esquelético de, por ejemplo, los mamíferos que al músculo liso de los mismos. Por esto las bandas que se observan no están perfectamente organizadas (como sería el caso del músculo esquelético) ni completamente desorganizadas, como en el caso del músculo liso.

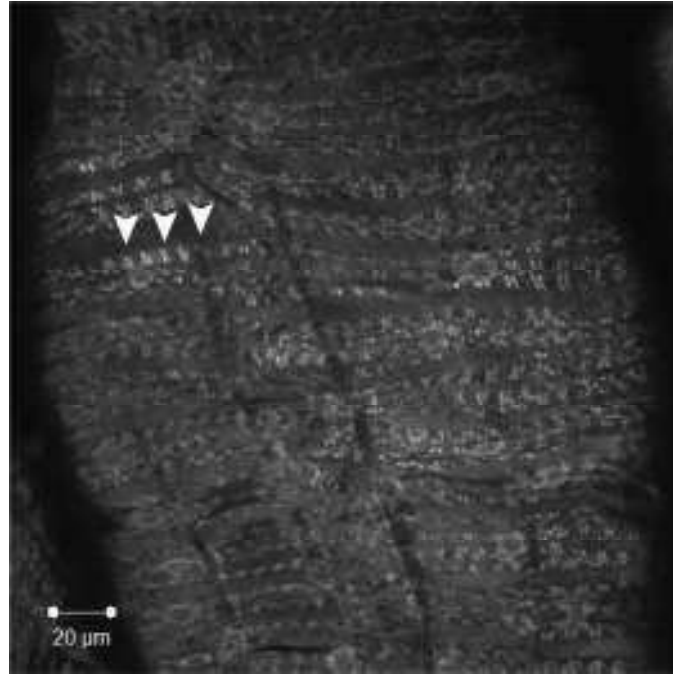


Figura 2.7 – Inmunohistoquímica de intestino de larva utilizando anticuerpos anti *orsai*. En blanco se observa la marca de *orsai*, organizada en bandas similares a las bandas Z musculares (cabezas de flecha).

Con el fin de identificar si realmente se trataba de bandas Z del músculo, utilizamos un anticuerpo comercial anti ACTININ α 3 (Aviva System Biology) (figura 2.8).

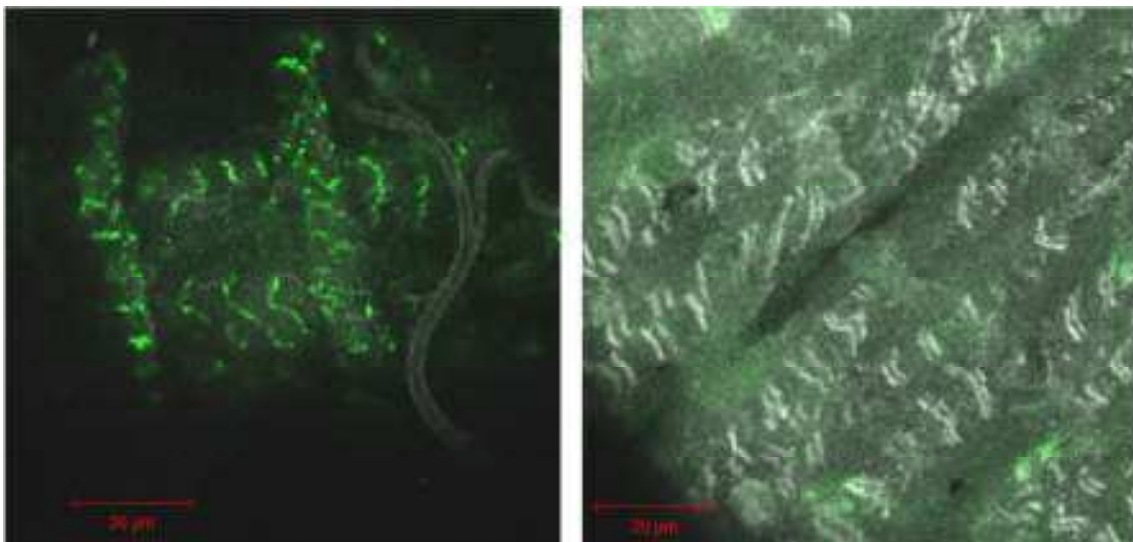


Figura 2.8 – ORSAI no colocaliza con ACTN3. En el intestino de larvas estadio 3 la marca de ACTN3 (verde) no está presente en la misma región que la marca anti ORSAI (blanca), que se encuentra en la región más anterior del intestino.

Elegimos este anticuerpo ya que marca las bandas Z y otras estructuras densas en el músculo. También tuvimos en cuenta que era el único anticuerpo comercial disponible contra estas estructuras que era reactivo en *Drosophila*. Lamentablemente este anticuerpo solo marcó estructuras en zonas más distales al proventrículo, donde la señal de ORSAI ya no es detectable.

Capítulo 3

**"La marca de la mosca inmadura es que quiere morir noblemente
por una causa, mientras que la marca de la mosca madura es
que quiere vivir humildemente por una"**

Paráfrasis de Wilhem Sketel

Rol de ORSAI en estructuras de la mosca adulta

1) Actividad locomotora

Para evitar el efecto de la posible sobreexpresión de *tweek* por la inserción del transposón realizamos los experimentos de actividad locomotora con la línea *orsai*^{ARNi}. De esta forma se evaluaron individuos jóvenes (0 a 3 días) y envejecidos (19 a 21 días) con la expresión de *orsai* reducida específicamente en las neuronas *pdf* (figura 3.1).

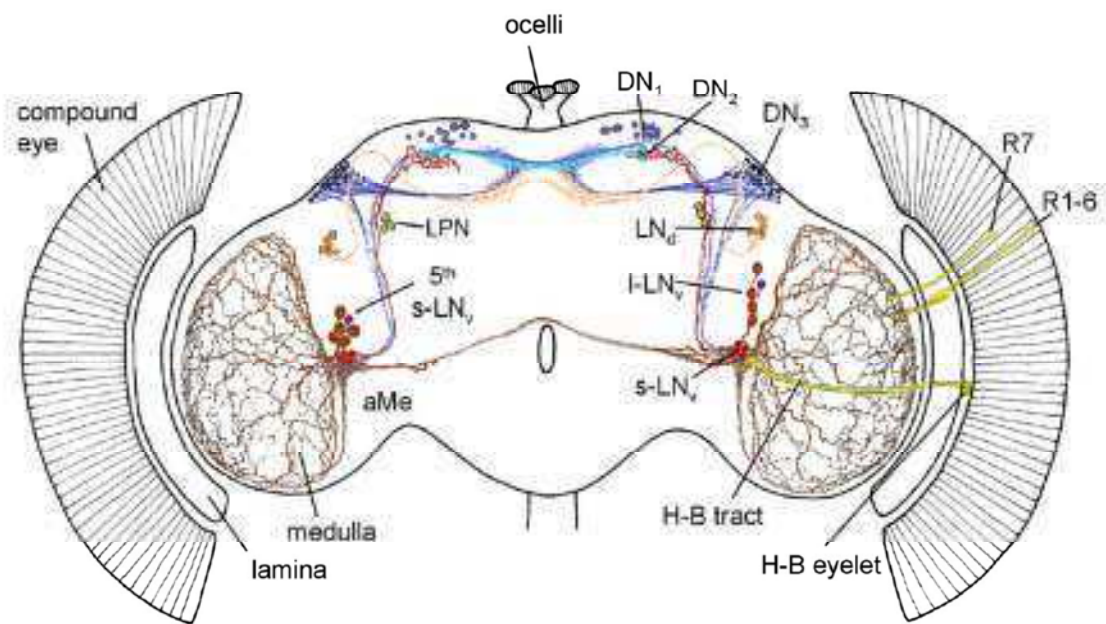


Figura 3.1 – Diagrama de las neuronas del sistema circadiano. Los distintos colores muestran distintos grupos de neuronas que componen el sistema circadiano de la mosca. En rojo se marcan las neuronas *pdf*. Imagen de (Helfrich-Forster 2003)

Así pudimos evaluar el efecto exclusivo de la bajada de *orsai* sobre el comportamiento rítmico de las moscas. Las moscas macho salvajes presentan una actividad de tipo crepuscular, y una baja actividad durante el día (llamada siesta), así

como una actividad que anticipa el fin de la noche y el fin del día. Al ser sometidas a oscuridad constante este patrón de actividad se mantiene. Las moscas envejecidas no presentan la anticipación al fin de la noche, pero sí al fin del día (figura 3.2).



Figura 3.2 – Impacto de la desregulación de *orsai* en las neuronas *pdf* sobre la actividad locomotora. Actogramas representativos de *pdf> orsai^{ARNi}* junto con cruza controles de individuos jóvenes (0 a 2 días post emergencia del pupario) y envejecidos (de 19 a 21 días luego de la emergencia del pupario). Mientras que los controles genéticos y etarios muestran una actividad normal, los individuos envejecidos *pdf> orsai^{ARNi}* presentan una marcada arritmicidad. DICER II es coexpresada para mejorar la función de la maquinaria de procesamiento de los ARNi. La zona sombreada representa oscuridad constante.

En el actograma representativo de la figura 3.2 (y su cuantificación en la figura 3.3) se ve que para las moscas *pdf-GAL4/UAS-dicer II;UAS-orsai^{ARNi}* envejecidas es

imposible encontrar un patrón rítmico cuando las moscas son sometidas a oscuridad constante. Por esto presentan una ritmicidad significativamente menor a sus controles etarios y genéticos.

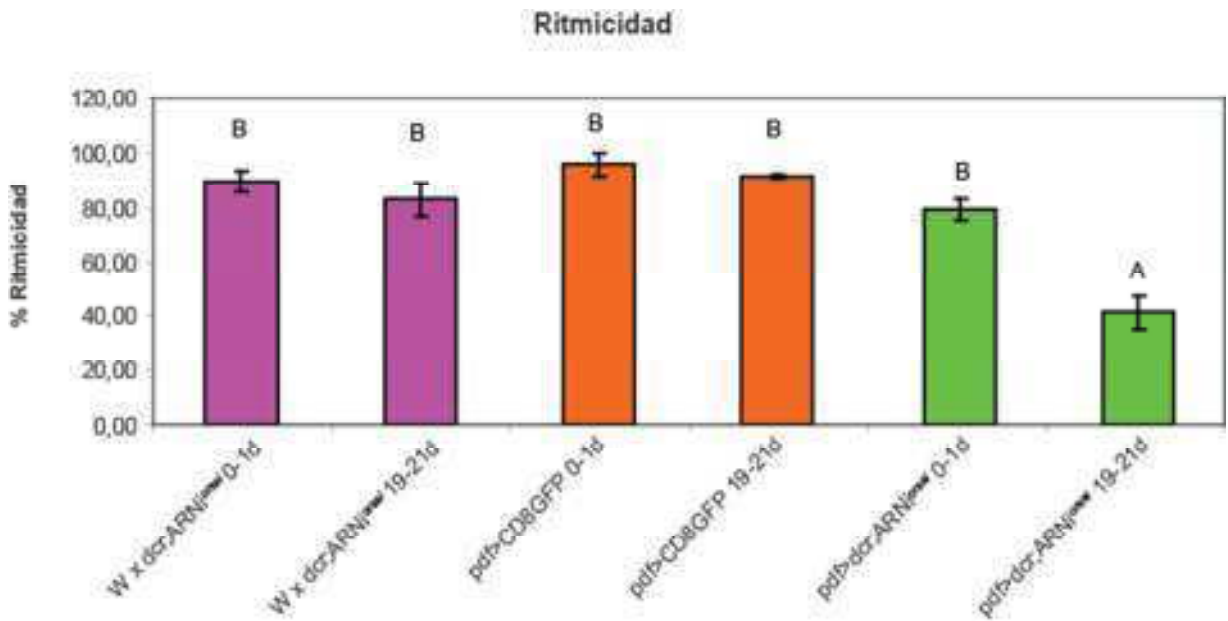


Figura 3.3– Impacto en la ritmicidad debida a la disminución de ORSAI en las neuronas *pdf*. Las moscas *pdf> orsaI^{ARNi}* muestran un comportamiento arrítmico comparado con el control, solo en individuos envejecidos. Letras distintas indican diferencias significativas. Las barras son SEM, $\alpha=0.05$

Al analizar los actogramas de los pocos individuos envejecidos ($\approx 40\%$) que expresaban *orsaI^{ARNi}* en las neuronas PDF y no eran arrítmicos, pudimos detectar que su período era significativamente más largo que los controles. En la figura 3.4 se muestran actogramas representativos y su cuantificación.

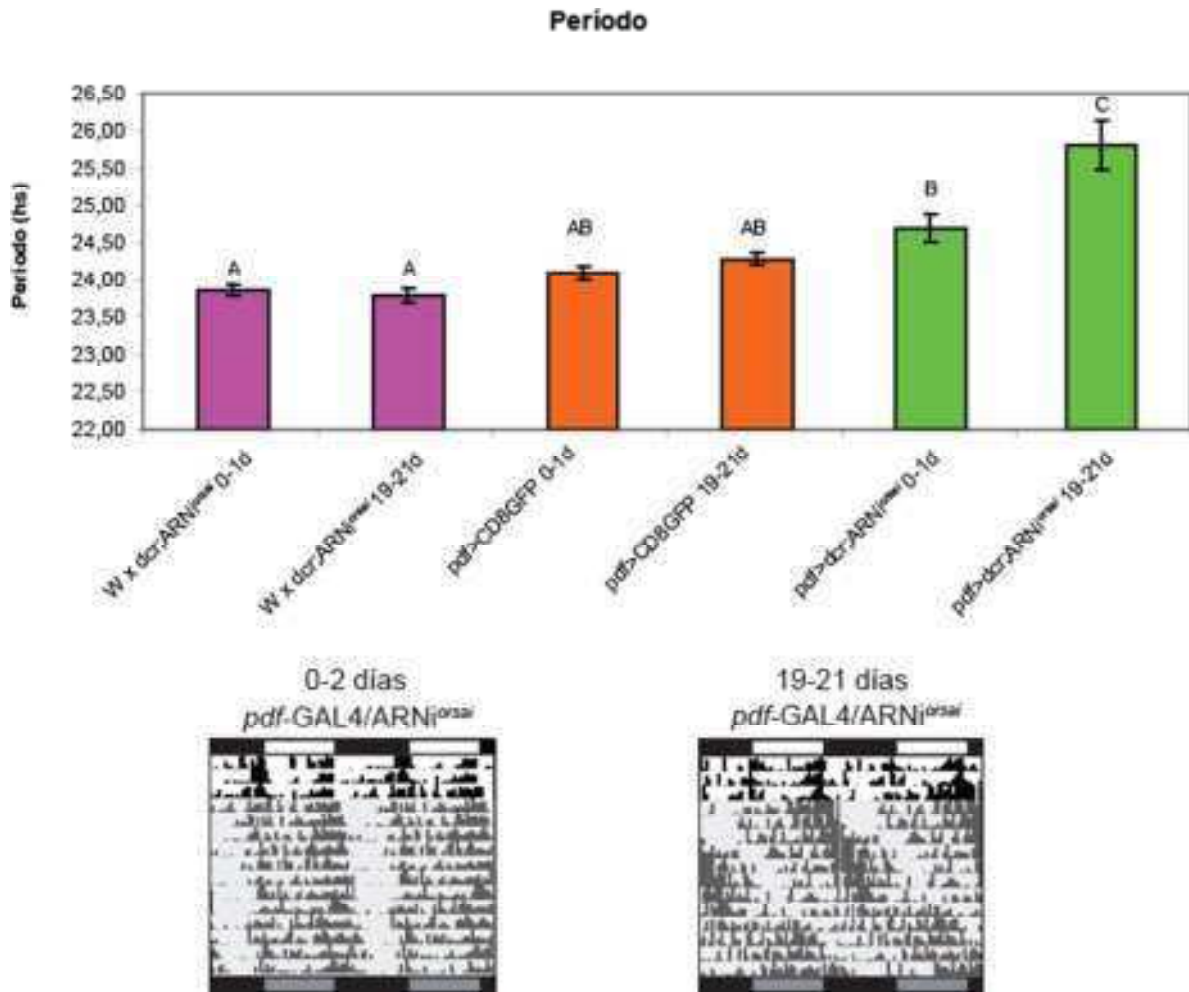


Figura 3.4 – Efecto de la expresión de *orsai*^{ARNi} en las neuronas *pdf* sobre el período. Aquellas moscas *pdf*> *orsai*^{ARNi} envejecidas que sí son rítmicas muestran un alargamiento del período comparado con moscas control. Se incluye un ejemplo de un individuo envejecido que muestra un fenotipo de período largo. Letras distintas indican diferencias significativas. Las barras son SEM, $\alpha=0.05$

2) Desregulación estadio específica de la expresión de *orsai* en el cerebro

La característica principal de la neurodegeneración es la pérdida de neuronas (Lu and Vogel 2009). Esto puede ser evaluado mediante ensayos funcionales como los descritos en la sección anterior o, más comúnmente, mediante cortes de cerebro, donde la pérdida de neuronas puede ser observada como vacuolización. Para determinar si la falta de *orsai* producía vacuolización decidimos utilizar el sistema

GeneSwitch para expresar mediante el promotor panneural *elav* el ARNi de *orsai*. Este sistema permite la activación del factor de transcripción GAL4 solo en presencia del inductor RU486, el cual puede ser administrado en la comida. De esta forma se consiguió disminuir los niveles de *orsai* en el cerebro de la mosca (en presencia de *dicer II*, para maximizar la eficiencia de la maquinaria de silenciamiento) solo durante la etapa adulta, para evitar acumular efectos de la desregulación del mismo durante el desarrollo. Usando este sistema evaluamos entre 10 y 15 cerebros de moscas jóvenes, de 0 a 3 días y envejecidas, de 30 días, con y sin RU486 tanto en presencia como ausencia del ARNi de *orsai*; el control genético contenía *dicer II* (figura 3.5).

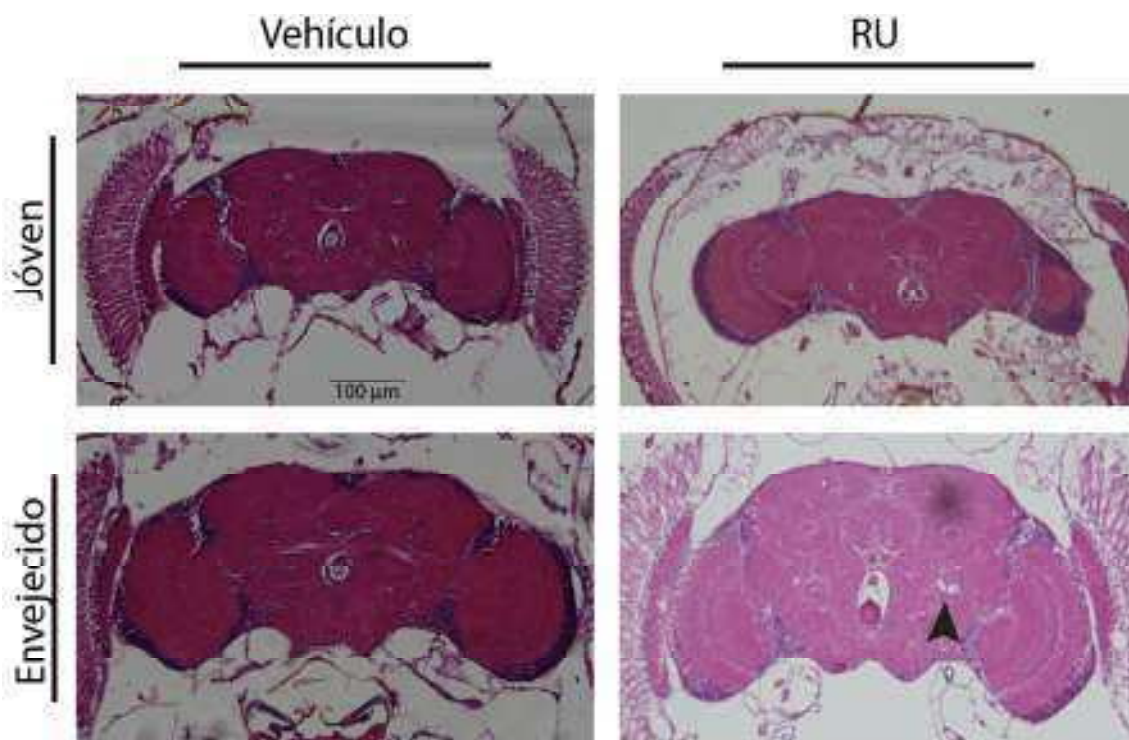


Figura 3.5 – Vacuolización de cerebros de moscas adultas al reducir la expresión de *orsai* de forma adulto específica. Los adultos envejecidos presentan mayor número de vacuolas (cabeza de flecha) neuronas. Se eligieron imágenes representativas correspondientes a la moda de las categorías asignadas. La barra son 100 μm.

Así encontramos que las moscas viejas con la función de ORSAI comprometida (en presencia de inductor) presentaban un peor estado general del cerebro, observable en la mayor presencia de vacuolas, mientras que los controles presentaban cerebros sin signos degenerativos.

Se asignaron categorías de forma ciega a cada foto de los cortes realizados (categorías de 1 a 5: de buen estado del cerebro a mal estado, ver materiales y métodos). Con esta categorización se intentó cuantificar de forma analítica el estado del cerebro, pero lamentablemente los supuestos estadísticos para realizar un análisis correcto no se cumplieron. En la figura 3.6 se presenta un gráfico de frecuencias de cada categoría para cada tratamiento. Esta figura es meramente descriptiva por lo mencionado anteriormente, pero sirve para mostrar que los individuos envejecidos tienen una tendencia a pertenecer a las categorías 4 y 5 (peor estado del cerebro).

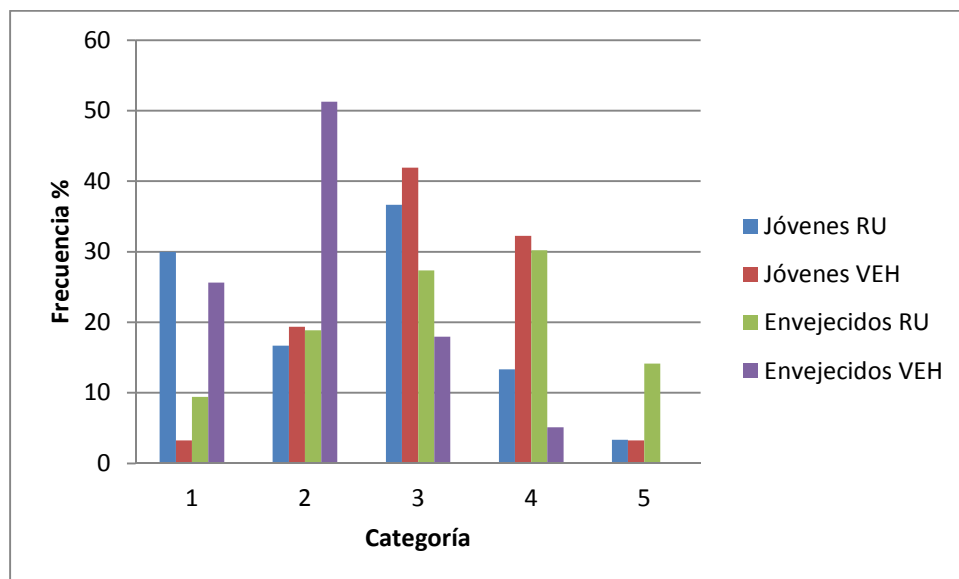


Figura 3.6 – Categorización de los cortes de cerebro. Mientras que los controles aparecen agrupados principalmente en las primeras categorías (mejor estado del cerebro), los cortes pertenecientes a adultos envejecidos con la droga inductora (RU) se agrupan en las últimas categorías (peor estado del cerebro).

Consideramos que si se aumentara el número de cerebros el análisis estadístico sería realizable y se obtendrían resultados con poder predictivo de este tratamiento.

Capítulo 4

–Adiós –dijo el zorro–. He aquí mi secreto. Es muy simple: no se ve bien sino con el corazón. Lo esencial es invisible a los ojos.

El Principito, Antoine de Saint-Exupéry

Búsqueda de modificadores del fenotipo de *orsai*

1) Expresión en el ojo

El ojo de *Drosophila* es una estructura altamente regular, formado por aproximadamente 800 omatidias, compuestas, a su vez, por 8 fotorreceptores de origen neuronal y 11 células accesorias. Cada omatidia está asociada a una queta mecanosensorial. Dado su origen común, y su notable nivel de organización, este arreglo hexagonal que forman las omatidias ha sido ampliamente utilizado para evaluar el impacto de la desregulación de genes que provocan neurodegeneración. Esto es debido a que cualquier perturbación a este arreglo, por pequeña que sea, se vuelve muy visible ([Fernandez-Funez et al. 2000](#); [Ghosh and Feany 2004](#))

2) Características de la desregulación de OSI

Al utilizar el *driver* GMR-GAL4, que dirige la expresión al ojo, junto con *orsai*^{ARNi}, este pierde su estructura regular y se desorganizan las omatidias dando un ojo con un fenotipo llamado rugoso (figura 4.1). Al combinar la línea *orsai*^{ARNi} con UAS-*dicer II* y expresarlas bajo el control de GMR-GAL4, el fenotipo de ojos rugosos se exagera en un 23% de los ojos, dando un fenotipo que llamamos rugoso severo. Este fenotipo implica en algunos casos sobrecrecimiento de las omatidias, pasando por una decoloración hasta llegar a tener omatidias necróticas. La cantidad de omatidias negras varía desde una sola hasta más de la mitad de las mismas, llegando incluso a verse la córnea despegada de los fotorreceptores (figura 4.1).

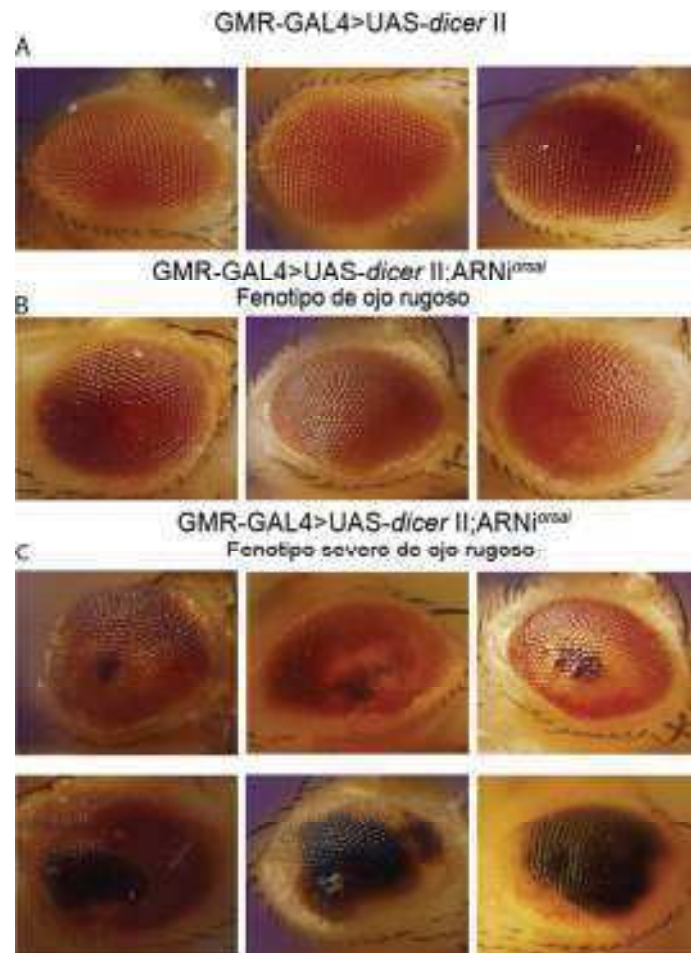


Figura 4.1 – Fenotipos de ojos al reducir la expresión de *orsai*. **A** Ojos control. La expresión de *dicer II* en el ojo no provoca un fenotipo anómalo. **B** Ejemplos de ojos de $GMR>dicer II; orsai^{ARNi}$ donde se ven ojos con las omatidias desorganizadas (FOR) e incluso un sobrecrecimiento en la foto central. **C** En el 23% de los casos de $GMR>dicer II; orsai^{ARNi}$ produce FORS, en el cual las omatidias no solo están desorganizadas sino que se las ve decoloradas alrededor de una zona con omatidias negras (posiblemente necróticas). Este fenotipo puede ir desde una única omatidia negra hasta casi la totalidad del ojo negro, con la córnea despegada de la retina (como se observa en el ejemplo incluido en el panel inferior).

3) Búsqueda de genes que interactúen con *orsai*

Teniendo en cuenta el fenotipo basal que resulta de la sobreexpresión de *orsai* en el ojo compuesto ($GMR> orsai^{ARNi}$) decidimos hacer un *screen* de potenciadores y

supresores para identificar los posibles genes que interactúan con *orsai*. Para esto se usó la colección de deleciones del Bloomington Drosophila Stock Center. Esta colección de 468 líneas está compuesta por pequeñas deleciones cromosómicas (31 genes en promedio por deleción) que cubren un 98.4% de la eucromatina del genoma de *D. melanogaster* (tabla 1 y anexo tabla 1).

Brazo	# de genes eucromáticos	# de genes eucromáticos no borrados	% de cobertura eucromática	# de líneas
1	2288	43	98.1	92
2L	2765	30	98.9	100
2R	3089	54	98.3	90
3L	2845	71	97.5	76
3R	3535	40	98.9	104
4	88	5	94.3	7
Total	14610	243	98.3	468

Tabla 1 – Resumen de la composición del kit de deficientes de BDSC. En esta tabla se detalla la composición de la colección en el momento de la adquisición del kit de deficientes. Para el momento de la escritura de esta tesis el número total de líneas ha aumentado a 474 pues se agregaron líneas con menor superposición de la zona delecionada.

La idea detrás de este *screen* consiste que en el contexto del ojo sensibilizado de moscas $GMR > orsai^{ARNi}$ se espera ver un empeoramiento o mejoramiento del fenotipo del ojo de acuerdo a la falta del gen en hemigosis aportada por la línea deficiente (figura 4.2). Debido a que el mejoramiento del fenotipo es muy complejo de

observar, el *screen* presenta un sesgo hacia genes cuya falta empeoran el fenotipo original.



Figura 4.2 – *Screen* en el ojo de líneas con deficiencias cromosómicas. Este *screen* consistió en cruzar moscas GMR> *orsai*^{ARNi}, una línea que dirige la expresión al ojo, en combinación con el ARNi de *orsai* por una colección de líneas con deficiencias cromosómicas. Ejemplos de ojos de líneas deficientes anotadas como positivas cruzadas por GMR> *orsai*^{ARNi}.

Empezamos un *screen* piloto con 10 líneas al azar del cromosoma 2L. Como prueba de concepto, de aquellas líneas que dieron positivas en este *screen* se probaron otras líneas que tenían deleciones más pequeñas y que a su vez estaban incluidas en las detectadas como positivas anteriormente. Estas volvieron a dar positivas, corroborando que el empeoramiento del fenotipo observado en el ojo era producido por la deleción de por lo menos un gen de la línea deficiente original.

Del análisis de todas las líneas de la colección de deficiencias encontramos 61 líneas que empeoran el fenotipo. Para cada brazo de cada cromosoma las líneas que dieron positivas se agruparon de acuerdo a los genes en común que les faltaban. No se encontraron líneas de deficientes positivas en los cromosomas X, Y ni 4. Para controlar

la especificidad de los hits positivos analizamos los ojos de estas líneas sin la coexpresión de *orsai*^{ARNi}. Ninguna de ellas presentó un fenotipo de ojo rugoso severo.

Para el análisis posterior, de estas líneas positivas solo se tuvieron en cuenta aquellos genes que aparecían repetidos en por lo menos otra línea. De esta forma se obtuvieron 710 genes.

Debido a la forma en que se analizó el *screen*, esperábamos que hubiera muchos falsos positivos dentro de esa lista de genes, debido a que simplemente por azar podrían haber sido considerados genes por ser parte de una delección que contenía un gen de interés real. Para poder diferenciar los genes que interactuaban potencialmente con *orsai* de los que estaban presentes por azar utilizamos el programa DAVID (**D**atabase for **A**nnotation, **V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery) ([Huang da et al. 2009](#); [Huang da et al. 2009](#)). Este programa permite identificar motivos biológicos enriquecidos, en particular términos de Gene Ontology (GO), así como también descubrir grupos de genes relacionados funcionalmente y agrupar términos de anotaciones redundantes en grupos funcionales.

Mediante DAVID analizamos 610 genes (ver anexo, tabla 2), que eran los que poseían una identificación utilizable, específicamente descriptores de Gene Ontology, que es la base de datos utilizada por DAVID para generar los agrupamientos funcionales de genes. Así se obtuvo una lista de 93 genes agrupados en 10 clases; pero descartando los genes que aparecían incluidos en distintas clases, esta lista se redujo a 79 genes (anexo tabla 3).

Hasta el momento 40 de estos genes ya fueron testeados individualmente utilizando por lo menos dos ARNis específicos para cada uno, expresándolos en el

contexto GMR> *orsai*^{ARNi} y por si mismos (GMR>*gen*^{RNAi}) como control de especificidad del fenotipo.

Aparte de los genes obtenidos a través del análisis bioinformático se analizaron separadamente los genes IP3K e *hippo*, ya que el primero aparecía representado en 5 de 7 líneas de deficiencias identificadas como hits en el *screen* que formaban un agrupamiento de genes, a pesar de no ser sido seleccionado por DAVID; el segundo fue elegido debido a que era potencialmente interesante según datos bibliográficos.

Agrupamiento	Enriquecimiento	Descripción
1	2.60	Homeostasis de acyl-CoA celular
2	2.45	Transporte de aniones
3	2.13	Homología K
4	2.06	Gliogénesis
5	1.94	Cutícula, constitución cuticular
6	1.90	Crotonasa, actividad dodecenoyl-CoA delta-isomerasa
7	1.85	Respuesta a ROS
8	1.73	Reproducción
9	1.50	Miristilación
10	1.47	Fosfatasa alcalina / unión a magnesio

Tabla 2 – Agrupamientos de genes. De los 610 genes analizados por DAVID 79 fueron seleccionados como sobrerrepresentados y agrupados en 10 conjuntos. Los agrupamientos se presentan en orden descendente de enriquecimiento. A mayor enriquecimiento, menor p-valor de que estén incluidos al azar dichos genes en ese grupo. En el anexo tabla 3 se detallan los genes que componen estos agrupamientos.

Este relevamiento parcial de ARNis permitió identificar 15 genes cuya desregulación, en contexto de la falta de función de *orsai*, recreaba los fenotipos de

ojo rugoso (tabla 2). Estos genes están siendo evaluados en actividad locomotora como parte de la tesina de grado de M. Fernández. Resultados preliminares muestran que los ARNis de *knk* y *Cpr30B* revierten el fenotipo de pérdida de ritmicidad de *orsai*^{ARNi} y a estos se les suma *Roughened* entre los ARNis de genes que revierten el período largo provocado por *orsai*^{ARNi}.

De los 14610 genes de *Drosophila* analizados mediante las deficiencias logramos reducir esta lista a 610 mediante el *screen* en el ojo y estos a su vez mediante el uso de DAVID se pudo reducir a 79 genes. Esta última lista está en proceso de ser curada y su resultado analizado subsiguientemente en ensayos de actividad locomotora.

Discusión

El objetivo de esta tesis fue encontrar genes desconocidos que provoquen neurodegeneración utilizando como organismo modelo a *Drosophila melanogaster*. Para lograrlo se partió de un *screen* de actividad locomotora de mutantes al azar donde se desregulaba específicamente el circuito neuronal que comanda dicho comportamiento (Rezaval et al. 2008). De esta forma se seleccionó un mutante que llamamos 100B. El gen afectado por la inserción del elemento P con que se realizó la mutagénesis al azar era el CG6115, un gen hasta el momento no caracterizado, que nosotros bautizamos *orsai*.

Existen muchísimos ejemplos de *screens* de distintos tipos a partir de los cuales se encuentran genes que producen un fenotipo anómalo en la mosca. Estos genes pueden estar previamente caracterizados y el fenotipo observado ser comprendido a partir de su función previamente descrita o asignarle una nueva función. También pueden tratarse de genes desconocidos hasta el momento para los cuales comprender su mecanismo de acción es más dificultoso (Carvalho et al. 2001; Lim et al. 2011) y otros. A medida que las técnicas de biología molecular y de análisis genético mejoran y el conocimiento de los genomas se incrementa, la caracterización se simplifica. Esto permite acelerar este proceso; pero cuando se trabaja con un gen cuya secuencia no brinda información sobre su función o estructura la posibilidad de encontrar de forma veloz su función se reduce drásticamente.

En el transcurso de esta tesis nos enfrentamos a este problema. Nuestra primera aproximación para dilucidar la función de *orsai* fue mediante un análisis bioinformático. *orsai* posee identidad de secuencia con un dominio conocido como LYR. Este representa el 62% de la secuencia del gen y se lo encuentra en una gran variedad de organismos, desde levaduras, pasando por insectos hasta mamíferos,

donde miembros de esta familia incluso han sido caracterizados en humanos (Cermakova et al. 2007; Qiu et al. 2009; Zhu et al. 2010; Atkinson et al. 2011). Su papel en distintas especies es muy variable y teniendo en cuenta que los *clusters* Fe-S en los que están involucradas la mayoría de las proteínas de la familia LYR son cofactores aún no reconocidos de muchas proteínas, la predicción de su función resulta dificultosa (Rouault 2014).

La falta de *orsai* en la larva y sus fenotipos

La falta de función parcial de *orsai* provoca, en larvas, el arresto del desarrollo en larva 2 tardía y un fenotipo similar al forrajeo, donde las larvas despliegan un comportamiento de búsqueda de comida a pesar de tener alimento a disposición. Finalmente mueren alrededor de las 80 horas post eclosión.

El arresto del desarrollo en estadios larvales es generalmente consecuencia de una disfunción en las vías hormonales que regulan la muda. Este tipo de arresto se caracteriza por la presencia de estructuras de distintos estadios en el mismo individuo. Sin embargo, ni en el mutante 100B ni en individuos en los que su función estaba disminuida por expresión de un ARNi específico del CG6115 se observaron estructuras correspondientes a una mezcla de estadios, lo cual en principio sugiere que el arresto en el desarrollo es independiente del programa hormonal.

Disfunción mitocondrial y neurodegeneración

Utilizando un ARNi dirigido hacia *orsai* fue posible fenocopiar al mutante cuando aquel era expresado de forma ubicua. Este dato nos permitió buscar en qué tejido(s) la desregulación de la expresión de *orsai* provocaba el arresto en el desarrollo y la muerte temprana característica del mutante. Fue así que encontramos que la expresión del ARNi dirigida con el promotor del gen *breathless*, que se corresponde con el sistema traqueal de las larvas, es el patrón más acotado que permite fenocopiar al mutante. Esto nos permite proponer que si la desregulación de *orsai* afecta el desarrollo de las tráqueas el fenotipo observado podría deberse a que la larva presenta problemas de disponibilidad de oxígeno ([Wingrove and O'Farrell 1999](#)).

Recientemente se ha reportado que al alimentar larvas con comida con bajo contenido de levaduras (el principal contribuyente de lípidos y aminoácidos a su dieta) se produce una reducción en la ramificación de las tráqueas en todos los tejidos (con excepción del SCN) además del típico retraso en el desarrollo ([Linneweber et al. 2014](#)). La falta de defectos en la arquitectura del sistema traqueal en el SNC en estas circunstancias es una explicación posible frente a la falta de fenotipos observados al utilizar líneas que dirigían la expresión de *orsai*^{ARNi} tanto a neuronas como a células gliales. Tal como se mencionó previamente, la disminución de la función de *orsai* en las tráqueas dispara un cambio comportamental que resulta en la muerte prematura de las larvas. Una posible explicación a esta observación es que la disfunción de *orsai* - directa (por alterar la función mitocondrial en una etapa de activo crecimiento) o indirectamente (por alterar una vía de señalización que sensa el estado ambiental)-

afecte el desarrollo traqueal, y esto traiga como consecuencia el arresto en el desarrollo.

Teniendo en cuenta este resultado y el indicio bioinformático de que *orsai* podría ser parte del complejo I mitocondrial, analizamos el consumo de oxígeno de las larvas. Pudimos observar que las larvas mutantes presentaban una respiración basal reducida con respecto a las control, pero no mostraban cambios al bloquear la actividad mitocondrial con KCN, mientras que las control reducían drásticamente su consumo de oxígeno en presencia de este veneno metabólico. Esto nos indicó que los mutantes tienen comprometida basalmente su respiración, sumando evidencia a la hipótesis de que es esta reducción la que causa el fenotipo larval.

Al buscar fenocopiar al mutante utilizando distintos GAL4s encontramos que al expresar *orsai*^{ARNi} con promotores ubicuos como *actina*, o más específicos, como musculares, las larvas detenían su desarrollo en el segundo estadio y morían alrededor de las 80 hs AEL, al igual que las mutantes. Pero al utilizar el promotor de *breathless* observamos que aunque dichas larvas también morían cerca de las 80 hs AEL, éstas presentaban esclerotización de los espiráculos posteriores, lo cual es un indicador del tercer estadio larval. Estas observaciones corroboran la importancia de alcanzar ciertos niveles de ORSAI en tejidos u órganos específicos, para evitar la letalidad de la larva, desacoplándola del arresto del desarrollo observado con promotores más restringidos. Este resultado permite proponer que es la desregulación de *orsai* en las tráqueas la principal responsable de los fenotipos observados, con excepción del mencionado arresto en el desarrollo.

Fenotipos en la mosca adulta y procesos neurodegenerativos

En adultos, por otro lado, la desregulación de *orsai* en las neuronas *pdf* positivas mediante el ARNi específico provoca que los individuos envejecidos presenten una arritmicidad más acentuada que los controles genéticos y etarios, así como un alargamiento significativo del período endógeno. Esto implica que estas neuronas se encuentran sensibilizadas por la desregulación de *orsai* y que esta se manifiesta progresivamente con el paso del tiempo.

Otro hito de la neurodegeneración es la presencia de vacuolización en regiones específicas o generalizadas del cerebro. Al provocar la desregulación de *orsai* de forma adulta específica en todas las neuronas del SNC de la mosca, el "estado general" del cerebro de los individuos envejecidos era significativamente peor que el de sus controles. Estos resultados sustentan nuestra hipótesis original de que es posible (a través de un *screen* comportamental) identificar genes hasta el momento desconocidos involucrados en procesos neurodegenerativos.

Búsqueda de la función de *orsai*

Los experimentos en larvas y en adultos de desregulación de la expresión génica de *orsai* revelaron la importancia de este gen para la correcta función de distintos tejidos y supervivencia de la mosca en general. Por esto nos resultó esencial determinar cuál es la función que cumple *orsai* en la célula.

Una aproximación que consideramos adecuada dadas las características de este gen (falta de función conocida, ausencia de proteínas caracterizadas similares, etc.) fue

la de intentar identificar los posibles genes que interactúan con él. Para esto realizamos un *screen* con una colección de moscas con deficiencias cromosómicas que abarcaban, en conjunto, cerca de la totalidad de los genes de *Drosophila*. Mediante la expresión de *orsai*^{ARNi} dirigida al ojo en transheterocigosis con cada línea de la colección de deficientes logramos construir una lista de diez agrupamientos funcionales de los genes que faltaban en cada línea identificada como un *hit* positivo en el *screen*.

En un análisis piloto del *screen* pudimos identificar a *knickkopf* (*knk*), un gen que está involucrado en tubulogénesis y deposición de la cutícula (Moussian et al. 2006). Este resultado fue particularmente alentador ya que abonaba una posible función de ORSAI en las tráqueas. Llamativamente al realizar el análisis completo de los genes involucrados putativamente con *orsai* este gen quedó fuera de la línea de corte debido a la sensibilidad del algoritmo utilizado para descartar los genes que aparecían al azar de aquellos que su representación era significativamente distinta. De todas formas consideramos a *knk* como un potencial compañero genético de *orsai* debido a la fuerza con que la coexpresión de los ARNis de ambos genes afecta el fenotipo del ojo y por lo tanto será estudiado en mayor profundidad en el futuro.

Con los datos obtenidos hasta ahora no es posible adjudicarle una función a *orsai*, pero los genes encontrados que posiblemente interactúan con él son una excelente herramienta para abordar este objetivo. Asimismo, los fenotipos observados tanto en la larva como en el adulto demuestran el carácter esencial de este gen, ya que es posible observar defectos en la gran mayoría de las estructuras donde es desregulado.

En particular la observación que la disminución de función de ORSAI trae aparejada una caída en el consumo de oxígeno nos resulta de particular interés, debido a que podría estar poniendo de manifiesto un defecto en la fosforilación oxidativa en las mitocondrias que no es rescatable mediante la expresión de *ndi* (Sanz et al. 2010), lo que implica que el defecto no radica en el complejo I mitocondrial sino que podría estar río abajo de este. Hasta el momento no fue posible analizar por separado los distintos complejos que componen la cadena respiratoria debido a la sensibilidad en relación a la masa de tejido que requiere el oxígrafo utilizado para medir el consumo de oxígeno. En el futuro se considerará iniciar nuevas colaboraciones para medir cada complejo por separado con cantidades muy pequeñas de tejido. Poder ubicar dónde se encuentra el defecto mitocondrial permitirá avanzar enormemente en la búsqueda y el entendimiento de la función de *orsai*.

Anexo

# Stock	Símbolo	Segmento borrado	Coordenadas
1546	Df(1)sc-J4	1Lt;3A3	
27887	Df(1)BSC843	1A1;1A3	X:149001--149310;228718
901	Df(1)svr	1A1;1B9--10	
25058	Df(1)BSC530	1A5;1B12	X:258383;517511--517610
9053	Df(1)ED6443	1B14;1E1	X:550056;920740
25062	Df(1)BSC534	1D1;2A3	X:735138;1347763
26571	Df(1)BSC719	2A3;2B13	X:1347763;1759742
9299	Df(1)ED6565	2B14;2F5	X:1788145;2211664
26569	Df(1)BSC717	2F2;3A4	X:2145613;2439696
8031	Df(1)ED411	3A3;3A8	X:2363892;2536719
9348	Df(1)ED6584	3A8;3B1	X:2530246;2579468
8948	Df(1)ED6630	3B1;3C5	X:2579573;2930943
25059	Df(1)BSC531	3C3;3E2	X:2807716--2807815;3566715
27886	Df(1)BSC834	3C11;3F3	X:3182989;3739760
9169	Df(1)ED6712	3D3;3F1	X:3326568;3683648
24145	Df(1)ED6716	3F3;4B4	X:3693229;4098617
25414	Df(1)BSC580	4A5;4C13	X:3995265--3995646;4582113
8956	Df(1)ED6727	4B6;4D5	X:4219207;4805094
944	Df(1)JC70	4C15--16;5A1--2	
25061	Df(1)BSC533	4F4;4F10	X:5176614--5176617;5322576
7708	Df(1)Exel6234	4F10;5A2	X:5322576;5410644
7709	Df(1)Exel6235	5A2;5A6	X:5410644;5487999
25114	Df(1)BSC571	5A4;5A10	X:5439592;5556820
8949	Df(1)ED6802	5A12;5D1	X:5574013;5859913
5281	Df(1)dx81	5C3--10;6C3--12	
8947	Df(1)ED6829	5C7;5F3	X:5796009;6247128
7713	Df(1)Exel6239	5F2;6B1--2	X:6238366;6410985--6432046
7714	Df(1)Exel6240	6B2;6C4	X:6437996;6563890--6563891
25063	Df(1)BSC535	6C2;6C8	X:6519483;6601052
24375	Df(1)BSC351	6C11;6D7	X:6642420--6642436;6754786
30587	Df(1)BSC882	6D3;6E4	X:6718207;6909441
3196	Df(1)Sxl-bt	6E2;7A6	
29990	Df(1)BSC867	6E4;6F1	X:6875892;6935548
8955	Df(1)ED6906	7A3;7B2	X:7089117;7299839
25064	Df(1)BSC536	7B2;7C1	X:7232686;7785646
6698	Df(1)hl-a	7B7;7E2	
25697	Df(1)BSC622	7C2;7D1	X:7802580;7850011
949	Df(1)C128	7D1;7D5--6	
29989	Df(1)BSC866	7D5;7D16	X:7981026;8051355
26514	Df(1)BSC662	7D6;7F1	X:8010281;8383646
27586	Df(1)BSC825	7E1;8C4	X:8165447;8932262
5706	Df(1)M38-C5	8B;8E	
8033	Df(1)ED6957	8B6;8C13	X:8785828;9029070
25065	Df(1)BSC537	8C4;8E4	X:8975033;9394287
26564	Df(1)BSC712	8F1;9B1	X:9500628;9980459
9153	Df(1)ED7005	9B1;9D3	X:9965955;10479464
26853	Df(1)BSC755	9C4;9F5	X:10349012;10742506
25068	Df(1)BSC540	9E8;10A3	X:10666578;10959043
25391	Df(1)BSC572	9F8;10A3	X:10784973;10986286
6219	Df(1)v-L1	9F13;10A5	
930	Df(1)v65b	10A1;11A7-8	

23672	Df(1)BSC287	10A10;10B11	X:11076154;11320274
26574	Df(1)BSC722	10B3;10E1	X:11244499;11648284
9171	Df(1)ED7147	10D6;11A1	X:11608416;11898833
9217	Df(1)ED7161	11A1;11B14	X:11901120;12644899
8898	Df(1)ED7170	11B15;11E8	X:12646635;13171359
26864	Df(1)BSC767	11E8;12A7	X:13172843;13485587
8952	Df(1)ED7217	12A9;12C6	X:13536116;13716354
24146	Df(1)ED7225	12C4;12E8	X:13678439;14216239
9352	Df(1)ED7229	12E5;12F2	X:14116267;14547977
9218	Df(1)ED7261	12F2;12F5	X:14547842;14733445
24336	Df(1)BSC310	12F5;13A10	X:14736446;14983589
29732	Df(1)ED7289	13A5;13A12	X:14918810;15019783
8035	Df(1)ED7294	13B1;13C3	X:15069448;15344331
9219	Df(1)ED7331	13C3;13F1	X:15344288;15707556
26566	Df(1)BSC714	13E14;14A8	X:15652384;15980061
26855	Df(1)BSC758	14A6;14C1	X:15899293;16261145
26869	Df(1)BSC772	14B9;14C4	X:16197009;16317138
23295	Df(1)FDD-0024486	14C4;14D1	X:16317138;16357189
26858	Df(1)BSC761	14D1;14F1	X:16357189;16487738
26857	Df(1)BSC760	14E1;14F2	X:16420365;16526135
27405	Df(1)FDD-0331226	14F2;15A11	X:16526135;16730272
25416	Df(1)BSC582	15A1;15E2	X:16574754;16985866
1158	Df(1)rif	15A1--2;15A4--5	
8954	Df(1)ED7374	15A1;15E3	X:16589220;17001665
33829	Df(1)815-6	15E1-2;15E6-7	
25417	Df(1)BSC583	15F1;16B10	X:17056914;17525354
25733	Df(1)BSC643	15F9;16F1	X:17185780;17801269
24429	Df(1)BSC405	16D5;16F6	X:17724792--17724879;17986865
29733	Df(1)ED13478	16F6;16F7	X:17979439;17996044
24376	Df(1)BSC352	16F7;17A8	X:18011500;18268918
26568	Df(1)BSC716	17A3;17D6	X:18137765;18694300
9350	Df(1)ED7424	17D1;18C1	X:18551286;19192806
7768	Df(1)Exel7468	18B7;18C8	X:19158545;19403670
23171	Df(1)BSC275	18C8;18D3	X:19390722;19474112
29994	Df(1)BSC871	18D7;18F2	X:19511634;19682746
25420	Df(1)BSC586	18F2;19D1	X:19682746;20300955
25734	Df(1)BSC644	19C1;19E7	X:20114476;20932028
26560	Df(1)BSC708	19E7;20A4	X:20899323;21494893
977	Df(1)DCB1-35b	19F1--2;20E--F	
7723	Df(1)Exel6255	20A1;20C1	X:21390230;21919501
27585	Df(1)BSC824	20C1;20F3	X:21941920;22381239
24626	Df(2L)ED50001	21A1;21B1	2L:-204333;72671
9353	Df(2L)ED5878	21B1;21B3	2L:67365;161120
8901	Df(2L)ED19	21B3;21B7	2L:159063;285763
24958	Df(2L)BSC454	21B7;21B8	2L:271351;307085
8672	Df(2L)BSC106	21B7;21C2	2L:291728--291846;417947
3548	Df(2L)al	21B8--C1;21C8--D1	
8673	Df(2L)BSC107	21C2;21E2	2L:431096;574741
3084	Df(2L)ast2	21D1--2;22B2--3	
24118	Df(2L)ED105	21E2;22A1	2L:852854;1420528
8908	Df(2L)ED94	21E2;21E3	2L:568095;1036969
7492	Df(2L)Exel6005	22A3;22B1	2L:1555098;1737249

26540	Df(2L)BSC688	22B1;22D6	2L:1736964;2273384--2273572
24959	Df(2L)BSC455	22D5;22E1	2L:2242285;2374023
7783	Df(2L)Exel7011	22E1;22F3	2L:2362917;2492447
90	Df(2L)C144	22F4;23C3	2L:2517598--2551864;2955279-- 2961962
9176	Df(2L)ED136	22F4;23A3	2L:2492935;2753125
7744	Df(2L)Exel6277	23A2;23B1	2L:2677694;2808100
26544	Df(2L)BSC692	23B3;23B7	2L:2830265--2830267;2868633
9610	Df(2L)BSC180	23B7;23C3	2L:2868633;2958118
8904	Df(2L)ED4651	23B8;23F3	2L:2873954;3478331
6507	Df(2L)drm-P2	23F3--4;24A1--2	
23677	Df(2L)BSC292	23F6;24A2	2L:3515462;3632008
24123	Df(2L)ED247	24A2;24C3	2L:3632218;3771177
5330	Df(2L)ed1	24A2;24D4	
7495	Df(2L)Exel6009	24C3;24C8	2L:3771368;3888977
9600	Df(2L)BSC165	24D4;24D8	2L:4031318;4195308
23680	Df(2L)BSC295	24D4;24F3	2L:4031318;4455780
744	Df(2L)M24F-B	24E1--2;24F6--7	
9270	Df(2L)ED250	24F4;25A7	2L:4477085;4821294
24124	Df(2L)ED7853	25A3;25B10	2L:4701129;5000402
1164	Df(2L)tkv3	25A4--5;25D5	
9605	Df(2L)BSC172	25B10;25C1	2L:5000838;5037253
8835	Df(2L)BSC110	25C1;25C4	2L:5029595;5064620
8674	Df(2L)BSC109	25C4;25C8	2L:5073453;5145500
7497	Df(2L)Exel6011	25C8;25D5	2L:5147258;5305646
7498	Df(2L)Exel6012	25D5;25E6	2L:5305646;5555049
9560	Df(2L)BSC169	25E5;25F3	2L:5524375--5524385;5716224
9343	Df(2L)ED334	25F2;26B2	2L:5658629;5999667
9341	Df(2L)ED385	26B1;26D7	2L:5980272;6465772
6338	Df(2L)BSC6	26D3--E1;26F4--7	
24378	Df(2L)BSC354	26D7;26E3	2L:6465706;6557463
9615	Df(2L)BSC188	26F1;27A2	2L:6612189;6742726
23676	Df(2L)BSC291	27D6;27F2	2L:7042642;7366119
9708	Df(2L)BSC233	27F3;28D2	2L:7388188--7388190;7887564
9502	Df(2L)BSC142	28C3;28D3	2L:7774037;8012787
7807	Df(2L)Exel7034	28E1;28F1	2L:8071311;8205166
9704	Df(2L)BSC227	28E8;29B1	2L:8155863;8346414
8836	Df(2L)BSC111	28F5;29B1	2L:8240266;8362842
24132	Df(2L)ED629	29B4;29E4	2L:8382851;8700124
9631	Df(2L)BSC204	29D5;29F8	2L:8529124;9025734
8906	Df(2L)ED678	29F5;30B12	2L:8958155;9581740
24133	Df(2L)ED690	30B3;30E4	2L:9437469;9918174
6478	Df(2L)BSC17	30C3--5;30F1	
9715	Df(2L)BSC240	30C7;30F2	2L:9744077;9960577--9960586
8469	Df(2L)BSC50	30F4--5;31B1--4	
26541	Df(2L)BSC689	30F5;31B1	2L:9984563;10198946--10198992
9503	Df(2L)BSC143	31B1;31D9	2L:10209408;10333704
1469	Df(2L)J39	31C--D;32D--E	
9635	Df(2L)BSC208	31D7;31D11	2L:10321809;10381214
9637	Df(2L)BSC209	31D7;31E1	2L:10321809;10421268
24135	Df(2L)ED8142	31E1;32A4	2L:10413461;10684679
9642	Df(2L)BSC214	31F5;32B4	2L:10516675;10913342

9641	Df(2L)BSC213	32B1;32C1	2L:10809118;11001451
9505	Df(2L)BSC145	32C1;32C1	2L:10967405;11001945--11001966
9716	Df(2L)BSC241	32C1;32F2	2L:11006679;11445740
9718	Df(2L)BSC244	32F2;33B6	2L:11445733;12002748
24109	Df(2L)ED761	33A2;33E5	2L:11808835;12436439
8907	Df(2L)ED775	33B8;34A3	2L:12010010;12975028
23662	Df(2L)BSC277	34A1;34B2	2L:12832803;13257491
32256	Df(2L)BSC892	34A5;34B9	2L:13060152;13382714
9594	Df(2L)BSC159	34B4;34C4	2L:13290762;13536086
27383	Df(2L)BSC812	34B11;34E1	2L:13421556;13878659
23152	Df(2L)BSC252	34D1;34F1	2L:13819589;14013641
9061	Df(2L)ED793	34E4;35B4	2L:13934848;14689337
6963	Df(2L)ED3	35B2;35D1	2L:14490575;15333760
8946	Df(2L)ED1050	35B8;35D4	2L:14997553;15762784
1491	Df(2L)r10	35D1;36A6--7	
26542	Df(2L)BSC690	35D4;35D4	2L:15745455;15821840
7521	Df(2L)Exel6038	35D6;35E2	2L:15912343;16042754
23663	Df(2L)BSC278	35E1;35F1	2L:16025369;16289284
27353	Df(2L)BSC781	35F1;36A1	2L:16325113;16417726
24113	Df(2L)ED1102	35F12;36A10	2L:16350236;16684883
3180	Df(2L)H20	36A8--9;36E1--2	
24114	Df(2L)ED1161	36A10;36C9	2L:16685279;17473293
9507	Df(2L)BSC148	36C8;36E3	2L:17428248;17965422
7839	Df(2L)Exel7070	36E2;36E6	2L:17903087--17903187;18161791
23156	Df(2L)BSC256	36E3;36F2	2L:18061946;18320008
7840	Df(2L)Exel8038	36E5;36F5	2L:18123514;18455586
9508	Df(2L)BSC149	36F5;36F10	2L:18444727;18673286
8935	Df(2L)ED1203	36F7;37C5	2L:18617225;19158447
24116	Df(2L)ED1272	37C5;38A2	2L:19158440;19753324
8679	Df(2L)ED1303	37E5;38C6	2L:19517610;20382385
9269	Df(2L)ED1315	38B4;38F5	2L:20085397;20917519
9682	Df(2L)ED1378	38F1;39D2	2L:20823195;21397328
9266	Df(2L)ED1473	39B4;40A5	2L:21250892;21828548
9510	Df(2L)BSC151	40A5;40E5	2L:21828581;22139023
26782	Df(2L)lt109	h35;h35	2L:22817519;22885080
4959	Df(2L)C'	h35;h38L	
741	Df(2R)M41A10	41A;41A	
25705	Df(2R)BSC630	41D3;41F11	2R:1015322;1669918
32253	Df(2R)BSC889	41F11;42A13	2R:1669744--1669934;2069250
9683	Df(2R)ED1484	42A2;42A14	2R:1781142;2132933
8045	Df(2R)ED1612	42A13;42E6	2R:2108037;2937177
9062	Df(2R)ED1673	42E1;43D3	2R:2873307;3421058
8931	Df(2R)ED1715	43A4;43F1	2R:3214456;3804428
8941	Df(2R)ED1725	43E4;44B5	2R:3501429;4043550
24335	Df(2R)BSC267	44A4;44C4	2R:3970399;4281766
9276	Df(2R)ED1742	44B8;44E3	2R:4061673;4611634
9157	Df(2R)ED1770	44D5;45B4	2R:4543134;5095046
9063	Df(2R)ED1791	44F7;45F1	2R:4810235;5440757
23665	Df(2R)BSC280	45C4;45F4	2R:5180164;5466121
9410	Df(2R)BSC132	45F6;46B4	2R:5482319--5482429;5748332
23682	Df(2R)BSC298	46B2;46C7	2R:5621779;5845625
1702	Df(2R)X1	46C;47A1	

9539	Df(2R)BSC152	46C1;46D6	2R:5762817;5918044
23686	Df(2R)BSC303	46E1;46F3	2R:5965798;6035409
23666	Df(2R)BSC281	46F1;47A9	2R:6012734;6350379
25428	Df(2R)BSC595	47A3;47F1	2R:6273472;7176083
8910	Df(2R)ED2219	47D6;48B6	2R:7084917;7552896
8912	Df(2R)ED2247	48A3;48D5	2R:7487611;7876225
9626	Df(2R)BSC199	48C5;48E4	2R:7779605;8059989
26551	Df(2R)BSC699	48D7;48E6	2R:7907386;8070095
24929	Df(2R)BSC425	48F1;49A1	2R:8146790;8268309
7543	Df(2R)Exel6061	48F1;49A6	2R:8149005;8324950
23688	Df(2R)BSC305	49A4;49A10	2R:8313105;8392638
30585	Df(2R)BSC880	49A9;49E1	2R:8384335;8781611--8781621
24989	Df(2R)BSC485	49B10;49E6	2R:8520257;8868687
442	Df(2R)CX1	49C1;50D3-5	2R:8587926--8622457;9950134--9978645
7544	Df(2R)Exel6062	49E6;49F1	2R:8868689;8922684
7871	Df(2R)Exel8057	49F1;49F10	2R:8922352;9106852--9106854
23169	Df(2R)BSC273	49F4;50A13	2R:9047084;9389655
23170	Df(2R)BSC274	50A7;50B4	2R:9317969;9480777
23690	Df(2R)BSC307	50B6;50C18	2R:9510513;9849106
24385	Df(2R)BSC361	50C3;50F1	2R:9648768--9648817;10179666
24407	Df(2R)BSC383	50C6;50D2	2R:9726984;9912384
7875	Df(2R)Exel7130	50D4;50E4	2R:9960585;10100288
7876	Df(2R)Exel7131	50E4;50F6	2R:10118170--10118172;10247930
8913	Df(2R)ED2354	50E6;51B1	2R:10146550;10462062
7749	Df(2R)Exel6284	51B1;51C2	2R:10462255;10653073--10653275
24933	Df(2R)BSC429	51C2;51D1	2R:10657714;10761429
25741	Df(2R)BSC651	51C5;51E2	2R:10740461;11022806
9064	Df(2R)ED2426	51E2;52B1	2R:11016313;11498329
8915	Df(2R)ED2457	52D11;52E7	2R:11887814;12017662
29661	Df(2R)ED2487	52E6;53C4	2R:12012439;12273917
25078	Df(2R)BSC550	53C1;53C6	2R:12224286;12382237
7888	Df(2R)Exel7144	53C8;53D2	2R:12459438;12578579
7546	Df(2R)Exel6064	53C11;53D11	2R:12499138;12716579
9278	Df(2R)ED2747	53D11;53F8	2R:12716578;12984808
24356	Df(2R)BSC331	53D14;54A1	2R:12756835;13027428
7548	Df(2R)Exel6066	53F8;54B6	2R:12985074;13282147
9596	Df(2R)BSC161	54B2;54B17	2R:13192288;13372333
24379	Df(2R)BSC355	54B16;54C3	2R:13349852;13424178
7890	Df(2R)Exel7149	54C10;54D5	2R:13469001;13579292
24371	Df(2R)BSC347	54D2;54E9	2R:13522004;13680154
6780	Df(2R)14H10W-35	54E5--7;55B5--7	
9066	Df(2R)ED3610	54F1;55C8	2R:13738410;14299538
8918	Df(2R)ED3683	55C2;56C4	2R:14176374;15116496
7551	Df(2R)Exel6069	56B5;56C11	2R:15029454;15213128
9423	Df(2R)BSC135	56C11;56D5	2R:15215243;15311082
27354	Df(2R)BSC782	56D8;56D14	2R:15338532;15389309
9067	Df(2R)ED3728	56D10;56E2	2R:15349955;15614252
30588	Df(2R)BSC883	56E1;56F11	2R:15519525;16130288
7896	Df(2R)Exel7162	56F11;56F16	2R:16132691--16132995;16201140
6609	Df(2R)BSC19	56F12--14;57A4	
26553	Df(2R)BSC701	56F15;57A9	2R:16166339;16554778

26554	Df(2R)BSC702	57A2;57B3	2R:16311622;16758360
30590	Df(2R)BSC885	57D2;57D10	2R:17102728;17189303
27582	Df(2R)BSC821	57D10;57E6	2R:17189303;17384714
26516	Df(2R)BSC664	57D12;58A3	2R:17229152;17759533
25430	Df(2R)BSC597	58A2;58F1	2R:17693855;18480501
282	Df(2R)X58-12	58D1--2;59A	
25431	Df(2R)BSC598	58F3;59A1	2R:18529284;18566186
27359	Df(2R)BSC787	58F4;59B1	2R:18549332;18685826
29988	Df(2R)BSC865	59A4;59B7	2R:18652440;18828551
25432	Df(2R)BSC599	59B1;59B3	2R:18685826;18741702
27356	Df(2R)BSC784	59B4;59B6	2R:18774154;18824283
26866	Df(2R)BSC769	59B7;59D9	2R:18828454;19272990
26513	Df(2R)BSC661	59D8;59F5	2R:19241797;19546662
9424	Df(2R)BSC136	59F5;60B6	2R:19554482;19944987
24380	Df(2R)BSC356	60B8;60C4	2R:19955762;20145427
27352	Df(2R)BSC780	60C2;60D14	2R:20090739;20572714
25437	Df(2R)BSC604	60D4;60E11	2R:20419696;20855955
2471	Df(2R)M60E	60E2--3;60E11--12	
25441	Df(2R)BSC608	60E11;60F2	2R:20864281;20939897
4961	Df(2R)Kr10	60F1;60F5	
24758	Df(2R)ED50004	60F5;60F5	2R:21113351;21148708
24627	Df(3L)ED50002	61A1;61B1	3L:-301458;128631
8047	Df(3L)ED201	61B1;61C1	3L:123924;347941
24386	Df(3L)BSC362	61C1;61C7	3L:306169;628171
23674	Df(3L)BSC289	61F6;62A9	3L:1332329;1628101
27372	Df(3L)BSC800	62A9;62A9	3L:1628101;1647451
9693	Df(3L)BSC181	62A11;62B7	3L:1688724;1841694
5411	Df(3L)Aprt-32	62B1;62E3	
8096	Df(3L)ED4287	62B4;62E5	3L:1795442;2551761
8976	Df(3L)BSC119	62E7;62F5	3L:2600282;2823614
6755	Df(3L)BSC23	62E8;63B5--6	
3650	Df(3L)M21	62F;63D	
7571	Df(3L)Exel6092	62F5;63A3	3L:2821245;3047162
26523	Df(3L)BSC671	63A2;63B11	3L:2982129;3193143
26524	Df(3L)BSC672	63A7;63B12	3L:3081311;3206906
8058	Df(3L)ED4293	63C1;63C1	3L:3226338;3250564
8059	Df(3L)ED208	63C1;63F5	3L:3249148;3893148
24392	Df(3L)BSC368	63F1;64A4	3L:3759821;4040636
8060	Df(3L)ED4341	63F6;64B9	3L:3905091;4542236
8061	Df(3L)ED210	64B9;64C13	3L:4544234;5348442
3096	Df(3L)ZN47	64C;65C	
24395	Df(3L)BSC371	64C1;64E1	3L:4868210;5627606
30589	Df(3L)BSC884	64D6;64E7	3L:5601375;5770185
24914	Df(3L)BSC410	64E7;65B3	3L:5763773;6483285
24915	Df(3L)BSC411	65A2;65C1	3L:5969060;6618726--6618729
7588	Df(3L)Exel6109	65C3;65D3	3L:6736213;6936639
6867	Df(3L)BSC27	65D4--5;65E4--6	
9701	Df(3L)BSC224	65D5;65E6	3L:6957557;7150109
8974	Df(3L)BSC117	65E9;65F5	3L:7242575;7328086
6964	Df(3L)BSC33	65E10--F1;65F2--6	
7929	Df(3L)Exel8104	65F7;66A4	3L:7353086;7522363
24399	Df(3L)BSC375	66A3;66A19	3L:7510880;7904180

24412	Df(3L)BSC388	66A8;66B11	3L:7643514;8184287
7591	Df(3L)Exel6112	66B5;66C8	3L:8089573;8351924
27576	Df(3L)BSC815	66C3;66D4	3L:8256164;8499740
24413	Df(3L)BSC389	66C12;66D8	3L:8415285;8582697
27577	Df(3L)BSC816	66D9;66D12	3L:8632181;8738462
8066	Df(3L)ED4421	66D12;67B3	3L:8738426;9377175
997	Df(3L)AC1	67A2;67D11--13	
8970	Df(3L)BSC113	67B1;67B5	3L:9342609;9416591
24415	Df(3L)BSC391	67B7;67C5	3L:9439870;9690291
8975	Df(3L)BSC118	67B11;67C5	3L:9508772;9690291
24416	Df(3L)BSC392	67C4;67D1	3L:9671803;9892355
26525	Df(3L)BSC673	67C7;67D10	3L:9756714;10174058
9355	Df(3L)ED4457	67E2;68A7	3L:10357051;11118909
8068	Df(3L)ED4470	68A6;68E1	3L:11090089;11826330
8069	Df(3L)ED4475	68C13;69B4	3L:11580140;12401701
26828	Df(3L)BSC730	68F7;69E6	3L:12156077;12836424
8072	Df(3L)ED4486	69C4;69F6	3L:12507519;13025585
6457	Df(3L)BSC12	69F6--70A1;70A1--2	
8097	Df(3L)ED4502	70A3;70C10	3L:13220865;13986651
8073	Df(3L)ED4543	70C6;70F4	3L:13928325;14751140
8074	Df(3L)ED217	70F4;71E1	3L:14751170;15582196
27888	Df(3L)BSC845	71D3;72A1	3L:15504128;15819023
27346	Df(3L)BSC774	71F1;72D10	3L:15693003;16233373--16233380
8078	Df(3L)ED4606	72D4;73C4	3L:16080584;16773223
8098	Df(3L)ED4674	73B5;73E5	3L:16654384;17042518
8099	Df(3L)ED4685	73D5;74E2	3L:16884176;17605270
8100	Df(3L)ED4710	74D1;75B11	3L:17480563;18132399
27347	Df(3L)BSC775	75A2;75E4	3L:17788244;18891426
9697	Df(3L)BSC220	75F1;76A1	3L:18965662--18965925;19164368
8087	Df(3L)ED229	76A1;76E1	3L:19163806;19995811
6646	Df(3L)BSC20	76A7--B1;76B4--5	
8088	Df(3L)ED4858	76D3;77C1	3L:19888473;20394920
27917	Df(3L)BSC839	77B4;77C6	3L:20313247;20486308
27369	Df(3L)BSC797	77C3;78A1	3L:20445923;20942833
24953	Df(3L)BSC449	77F2;78C2	3L:20850015--20850088;21196030
25116	Df(3L)BSC553	78A2;78C2	3L:20984731--20985064;21219092
24923	Df(3L)BSC419	78C2;78D8	3L:21218032;21597878
8101	Df(3L)ED4978	78D5;79A2	3L:21526907;21873785
9700	Df(3L)BSC223	79A3;79B3	3L:21909520--21909525;22078536
24955	Df(3L)BSC451	79B2;79F5	3L:22069195;22684788--22684831
8089	Df(3L)ED230	79C2;80A4	3L:22127751;22827471
8102	Df(3L)ED5017	80A4;80C2	3L:22828597;22991401
7002	Df(3L)1-16	80F;80F	
2596	Df(3L)6B-29+Df(3R)6B-29	80Fd;80Fj	
2596	Df(3L)6B-29+Df(3R)6B-29	81Fa;81Fa	
2597	Df(3R)10-65	81Fa;81Fa	
9226	Df(3R)ED5100	81F6;82E7	3R:22995;912807
8967	Df(3R)ED5147	82E7;83A1	3R:912842;1193526
8965	Df(3R)ED5156	82F8;83A4	3R:1090655;1284574
25077	Df(3R)BSC549	83A6;83B6	3R:1328526;1442413
8103	Df(3R)ED5177	83B4;83B6	3R:1426351;1449817
24968	Df(3R)BSC464	83B7;83E1	3R:1474083;2037668

7443	Df(3R)BSC47	83B7--C1;83C6--D1	
1990	Df(3R)Tpl10	83C1--2;84B1--2	
26533	Df(3R)BSC681	83E2;83E5	3R:2111067;2206257
26836	Df(3R)BSC738	83E5;84A1	3R:2206257;2510873
24971	Df(3R)BSC467	83F1;84B2	3R:2365827;2824771
1842	Df(3R)Antp17	84A5;84D9	
25724	Df(3R)BSC633	84B2;84C3	3R:2906110;2949098
8685	Df(3R)ED7665	84B4;84E11	3R:2916249;3919805
24970	Df(3R)BSC466	84E1;85A10	3R:3657392;4573406
9077	Df(3R)ED5330	85A5;85D1	3R:4495308;5055517
9204	Df(3R)ED5339	85D1;85D11	3R:5052798;5178097
25011	Df(3R)BSC507	85D6;85D15	3R:5084968;5220302
24980	Df(3R)BSC476	85D16;85D24	3R:5243395;5380704
7731	Df(3R)Exel6264	85D24;85E5	3R:5376427;5530672
9227	Df(3R)ED5428	85E1;85F8	3R:5456513;5874333
7633	Df(3R)Exel6154	85E9;85F1	3R:5619087;5754513
7634	Df(3R)Exel6155	85F1;85F10	3R:5754513;5915180
25696	Df(3R)BSC621	85F5;85F14	3R:5826632--5826961;5970476
9082	Df(3R)ED5474	85F11;86B1	3R:5935134;6176446
9215	Df(3R)ED5495	85F16;86C7	3R:5996223;6712482
25126	Df(3R)BSC568	86C7;86D7	3R:6688695;7026002
8957	Df(3R)ED5514	86C7;86E11	3R:6710720;7394975
24973	Df(3R)BSC469	86D8;87A2	3R:7056417;7774771
8029	Df(3R)ED5577	86F9;87B13	3R:7654463;8303300
24990	Df(3R)BSC486	87B10;87E9	3R:8255846;9227596
9090	Df(3R)ED5644	88A4;88C9	3R:9843625;10451431
23714	Df(3R)ED10555	88C9;88D8	3R:10451095;10812133
24137	Df(3R)ED5664	88D1;88E3	3R:10523031;11054571
26848	Df(3R)BSC750	88E2;88E5	3R:10960881;11075682
26839	Df(3R)BSC741	88E8;88F1	3R:11090909--11090913;11166385
9152	Df(3R)ED5705	88E12;89A5	3R:11117380;11619518
25019	Df(3R)BSC515	88F6;89A8	3R:11302334;11789831
26580	Df(3R)BSC728	89A8;89B2	3R:11746607;11902483
7983	Df(3R)Exel7328	89A12;89B6	3R:11835140;11983178
30592	Df(3R)BSC887	89B6;89B16	3R:11983756;12268648
1467	Df(3R)P115	89B7--8;89E7	
9481	Df(3R)ED10639	89B7;89B18	3R:12038635;12306942
9482	Df(3R)ED10642	89B17;89D5	3R:12279479;12450993
7737	Df(3R)Exel6270	89B18;89D8	3R:12328454;12528621
3486	Df(3R)Ubx109	89D1--2;89E1--2	
26846	Df(3R)BSC748	89E5;89E11	3R:12803446;12890724
8104	Df(3R)ED5780	89E11;90C1	3R:12882199;13507523
27362	Df(3R)BSC790	90B6;90E2	3R:13432489;13875093--13875130
25740	Df(3R)BSC650	90C6;91A2	3R:13632566;14124122
9208	Df(3R)ED5815	90F4;91B8	3R:13993596;14484708
6962	Df(3R)ED2	91A5;91F1	3R:14224953;14922493
24139	Df(3R)ED5938	91D4;92A11	3R:14732356;15467758
8964	Df(3R)ED6025	92A11;92E2	3R:15468450;16135241
25021	Df(3R)BSC517	92C1;92F13	3R:15856989;16609520
9501	Df(3R)BSC141	92F2;93A1	3R:16420602;16632118
7413	Df(3R)BSC43	92F7--93A1;93B3--6	
27580	Df(3R)BSC819	93A2;93B8	3R:16677299;16886325

7739	Df(3R)Exel6272	93A4;93B13	3R:16783425;16938056
9487	Df(3R)ED10845	93B9;93D4	3R:16890893;17122221
26529	Df(3R)BSC677	93D1;93F14	3R:17067939;17797873
8923	Df(3R)ED6085	93F14;94B5	3R:17706717;18413461
8684	Df(3R)ED6096	94B5;94E7	3R:18413403;19047691
6367	Df(3R)slo3	94D4--10;96A18	
25694	Df(3R)BSC619	94D10;94E13	3R:18887281;19172138
9497	Df(3R)BSC137	94F1;95A4	3R:19195438;19431394
24993	Df(3R)BSC489	94F3;95D1	3R:19273602;19768726
7675	Df(3R)Exel6196	95C12;95D8	3R:19747854--19747855;19857149
7676	Df(3R)Exel6197	95D8;95E1	3R:19857149;19967091
9347	Df(3R)ED6187	95D10;96A7	3R:19877370;20369665
9211	Df(3R)ED6220	96A7;96C3	3R:20369520;21009495
24965	Df(3R)BSC461	96B15;96D1	3R:20829131;21118634--21118719
7680	Df(3R)Exel6201	96C2;96C4	3R:20963561;21022720
27404	Df(3R)FDD-0317950	96C8;96D1	3R:21092436;21118719
7681	Df(3R)Exel6202	96D1;96D1	3R:21118719;21341395
7682	Df(3R)Exel6203	96E2;96E6	3R:21341620;21463598
24909	Df(3R)BSC321	96E6;96E9	3R:21463549;21506241
9500	Df(3R)BSC140	96F1;96F10	3R:21561372;21881594--21881606
8105	Df(3R)ED6232	96F10;97D2	3R:21862598;22624704
9210	Df(3R)ED6255	97D2;97F1	3R:22624758;23107623
25001	Df(3R)BSC497	97E6;98B5	3R:22991339;23731307
29667	Df(3R)ED6280	98B6;98B6	3R:23750857;23774482
25390	Df(3R)BSC567	98B6;98E5	3R:23763552;24627253
29997	Df(3R)BSC874	98E1;99A1	3R:24500751;25017393
25005	Df(3R)BSC501	98F10;99B9	3R:24938249;25550407
25075	Df(3R)BSC547	99B5;99C2	3R:25447025;25647121
3547	Df(3R)L127	99B5--6;99F1	
25695	Df(3R)BSC620	99C5;99D3	3R:25702740;25860612
2352	Df(3R)X3F	99D1--2;99E1	
25006	Df(3R)BSC502	99D3;99D8	3R:25886597;25960481
7692	Df(3R)Exel6214	99D5;99E2	3R:25925104;26028690
2234	Df(3R)R133	99E1--5;3Rt	
25007	Df(3R)BSC503	99E3;99F6	3R:26076673;26318532--26318548
25008	Df(3R)BSC504	99F4;100A2	3R:26253789;26512985
7997	Df(3R)Exel7378	99F8;100A5	3R:26388946;26620677
2155	Df(3R)A113	100A;3Rt	
24142	Df(3R)ED6346	100A5;100B1	3R:26609284;26874606
26847	Df(3R)BSC749	100B1;100C1	3R:26837657;27136770
27365	Df(3R)BSC793	100B5;100C4	3R:27025841;27283862
24143	Df(3R)ED6361	100C7;100E3	3R:27434853;27904166
24516	Df(3R)ED50003	100E1;100F5	3R:27811479;27907053
4055	T(1;4)sc[H]	101--102D6;4Rt	
9433	Df(4)M101-62f	101E;102B	
9421	Df(4)ED6364	101F1;102A6	4:79870;214111
9422	Df(4)ED6369	102A1;102C1	4:90336;474767
9579	Df(4)ED6380	102B7;102D5	4:431776;735029
7084	Df(4)O2	?+102D4--5;102F4--5+?	4:718315;1026929
759	Df(4)G	102E2--7;102E--F2	

Tabla 1 - Lista de deficiencias usadas en el screen de ojo. Se utilizaron 468 líneas de deficiencias de la colección de Bloomington Stock Center, cubriendo el 98.3% de la eucromatina del genoma ([Cook et al. 2012](#)).

Gen	Nombre	Símbolo
FBgn0000229	basket	bsk
FBgn0000273	cAMP-dependent protein kinase 1	Pka-C1
FBgn0000431	denervated	den
FBgn0000448	Hormone receptor-like in 46	Hr46
FBgn0000512	divergent	dv
FBgn0000583	equatorial-less	eql
FBgn0000606	even skipped	eve
FBgn0000640	Fat body protein 2	Fbp2
FBgn0000987	Female sterile (2) Kompolt	Fs(2)Kom
FBgn0001104	G protein alpha i subunit	Galpai
FBgn0001122	G protein alpha o subunit	Galphao
FBgn0001238	heavy vein	hv
FBgn0001241	humpy	hy
FBgn0001278	Jammed	J
FBgn0001291	Jun-related antigen	Jra
FBgn0001321	knickkopf	knk
FBgn0002072	lethal (2) 49Fa	l(2)49Fa
FBgn0002073	lethal (2) 49Fb	l(2)49Fb
FBgn0002078	lethal (2) 49Fg	l(2)49Fg
FBgn0002079	lethal (2) 49Fh	l(2)49Fh
FBgn0002080	lethal (2) 49Fi	l(2)49Fi
FBgn0002081	lethal (2) 49Fj	l(2)49Fj
FBgn0002173	lethal (2) Su(H)	l(2)Su(H)
FBgn0002179	lethal (3) 62Bc	l(3)62Bc
FBgn0002183	dre4	dre4
FBgn0002188	lethal (3) 63Aa	l(3)63Aa
FBgn0002189	lethal (3) 63Ab	l(3)63Ab
FBgn0002597	Minute (2) 31A	M(2)31A
FBgn0002600	Minute (2) 40c	M(2)40c
FBgn0002606	Minute (2) 58F	M(2)58F
FBgn0002610	Minute (3) 62A	M(3)62A
FBgn0002657	maternal effect cellularisation defect F	mat(2)cell-F
FBgn0002662	maternal effect cellularisation defect K	mat(2)cell-K
FBgn0002704	Moire	Me
FBgn0002775	male-specific lethal 3	msl-3
FBgn0002857	Male-specific RNA 47A	Mst47A
FBgn0002973	numb	numb
FBgn0003030	patulous	pa
FBgn0003033	paternal loss inducer	pal

FBgn0003047	posterior crossvein	pcv
FBgn0003071	Phosphofructokinase	Pfk
FBgn0003144	pratfall	prat
FBgn0003175	plexus	px
FBgn0003188	quit	qui
FBgn0003265	Ribonuclease 2	Rnase2
FBgn0003406	sichel	sic
FBgn0003407	sieve	sie
FBgn0003541	Stabilizer of Segregation Distorter	St-SD
FBgn0003550	Sucrase	Suc
FBgn0003660	Synaptobrevin	Syb
FBgn0003688	tufts	tft
FBgn0003751	trunk	trk
FBgn0003977	virilizer	vir
FBgn0003985	Vein	Vn
FBgn0004372	always early	aly
FBgn0004419	maternal expression at 31B	me31B
FBgn0004636	Roughened	R
FBgn0004651	Female sterile of Meyer	Fs(2)M
FBgn0004675	Enhancer of abnormal abdomen-53g	E(A[53g])
FBgn0004686	meiotic I1	mei-I1
FBgn0004734	lethal (3) 85Da	l(3)85Da
FBgn0004735	lethal (3) 85Db	l(3)85Db
FBgn0004737	lethal (3) 85Dd	l(3)85Dd
FBgn0004738	lethal (3) 85De	l(3)85De
FBgn0004739	lethal (3) 85Df	l(3)85Df
FBgn0004740	lethal (3) 85Dg	l(3)85Dg
FBgn0004741	lethal (3) 85Dh	l(3)85Dh
FBgn0004742	lethal (3) 85Di	l(3)85Di
FBgn0004743	lethal (3) 85Dj	l(3)85Dj
FBgn0004813	female sterile (2) ltoHM11	fs(2)ltoHM11
FBgn0004816	female sterile (2) ltoRU26	fs(2)ltoRU26
FBgn0004817	female sterile (2) ltoAHK35	fs(2)ltoAHK35
FBgn0004818	female sterile (2) ltoDC37	fs(2)ltoDC37
FBgn0004821	female sterile (2) ltoRM7	fs(2)ltoRM7
FBgn0004823	female sterile (2) ltoAPV63	fs(2)ltoAPV63
FBgn0004850	Suppressor of variegation 204	Su(var)204
FBgn0004867	Ribosomal protein S2	RpS2
FBgn0004868	GDP dissociation inhibitor	Gdi
FBgn0004907	14-3-3zeta	14-3-3zeta
FBgn0005000	cru sterile	crs
FBgn0005144	lethal (2) DTS6	l(2)DTS6
FBgn0005311	male sterile (2) 73d	ms(2)73d
FBgn0005395	gate	gat
FBgn0005572	lethal (3) 85Eh	l(3)85Eh

FBgn0005573	lethal (3) 85Ei	l(3)85Ei
FBgn0005574	lethal (3) 85Ej	l(3)85Ej
FBgn0005593	Ribosomal protein L7	RpL7
FBgn0005651	Male-specific transcript 59Da	Mst59Da
FBgn0005654	latheo	lat
FBgn0010135	maternal lethal (2) Notchlike	mat(2)N
FBgn0010238	Lachesin	Lac
FBgn0010314	Cyclin-dependent kinase subunit 30A	Cks30A
FBgn0010387	Diazepam-binding inhibitor	Dbi
FBgn0010407	Ror	Ror
FBgn0010520	Bekka	Bka
FBgn0010531	Copper chaperone for superoxide dismutase	Ccs
FBgn0010617	lethal (2) 06320	l(2)06320
FBgn0010645	lethal (2) 08014	l(2)08014
FBgn0010659	lethal (2) 10425	l(2)10425
FBgn0010902	lethal (3) 06803	l(3)06803
FBgn0011207	pelota	pelo
FBgn0011232	scattered	scat
FBgn0011245	male sterile (2) 29F	ms(2)29F
FBgn0011252	ms(3)04202	ms(3)04202
FBgn0011256	male sterile (2) 30C	ms(2)30C
FBgn0011291	TBP-associated factor 11	Taf11
FBgn0011305	Repressor splicing factor 1	Rsf1
FBgn0011448	lethal (3) neo4	l(3)neo4
FBgn0011450	lethal (3) neo6	l(3)neo6
FBgn0011452	lethal (3) neo8	l(3)neo8
FBgn0011573	Cdc37	Cdc37
FBgn0011637	lethal(3)Laker	l(3)Lak
FBgn0011656	Myocyte enhancer factor 2	Mef2
FBgn0011703	Ribonucleoside diphosphate reductase large subunit	RnrL
FBgn0011705	rolling stone	rost
FBgn0011763	DP transcription factor	Dp
FBgn0011781	lethal (2) rG270	l(2)rG270
FBgn0011823	Pendulin	Pen
FBgn0011839		
FBgn0011898		
FBgn0012036	Aldehyde dehydrogenase	Aldh
FBgn0013272	Gp150	Gp150
FBgn0013281	Inverse-regulator-Adh	Inr-A
FBgn0013530	lethal (2) ry28	l(2)ry28
FBgn0013536	lethal (2) ry36	l(2)ry36
FBgn0013539	lethal (2) ry50	l(2)ry50
FBgn0013653	ms(2)LY1	ms(2)LY1

FBgn0013668	ms(3)neo4	ms(3)neo4
FBgn0013746	alien	alien
FBgn0013811	Dynein heavy chain at 62B	Dhc62B
FBgn0014145	degarni	deg
FBgn0014179	glial cells missing	gcm
FBgn0014211	lethal (2) 31Aa	l(2)31Aa
FBgn0014212	lethal (2) 31Ab	l(2)31Ab
FBgn0014213	lethal (2) 31Ba	l(2)31Ba
FBgn0014214	lethal (2) 31Bb	l(2)31Bb
FBgn0014215	lethal (2) 31Bc	l(2)31Bc
FBgn0014216	lethal (2) 31Ca	l(2)31Ca
FBgn0014217	lethal (2) 31Cb	l(2)31Cb
FBgn0014218	lethal (2) 31Da	l(2)31Da
FBgn0014219	lethal (2) 31Db	l(2)31Db
FBgn0014253	lethal (2) DA2	l(2)DA2
FBgn0014254	lethal (2) DB1	l(2)DB1
FBgn0014255	lethal (2) DB2	l(2)DB2
FBgn0014256	lethal (2) DB4	l(2)DB4
FBgn0014257	lethal (2) FE3	l(2)FE3
FBgn0014260	lethal (2) N7-6	l(2)N7-6
FBgn0014261	lethal (2) N7-8	l(2)N7-8
FBgn0014262	lethal (2) X	l(2)X
FBgn0014272	lethal (2) tumorous antennal, labial, clypeo-labral imaginal discs	l(2)talc
FBgn0014375	popeye	popeye
FBgn0014381	ripcord	rip
FBgn0014985	lethal (2) 46Da	l(2)46Da
FBgn0014986	lethal (2) 46Db	l(2)46Db
FBgn0014987	lethal (2) 46Dc	l(2)46Dc
FBgn0014988	lethal (2) 46Dd	l(2)46Dd
FBgn0014989	lethal (2) 46De	l(2)46De
FBgn0014990	lethal (2) 46Df	l(2)46Df
FBgn0014991	lethal (2) 46Dg	l(2)46Dg
FBgn0014992	lethal (2) 47Aa	l(2)47Aa
FBgn0015035	Cytochrome P450-4e3	Cyp4e3
FBgn0015316	Trypsin 29F	Try29F
FBgn0015341	anon-65Ea	anon-65Ea
FBgn0015368	bumper-to-bumper	btb
FBgn0015393	hoi-polloi	hoip
FBgn0015485	lethal (2) 46Ci	l(2)46Ci
FBgn0015486	lethal (2) 46Cj	l(2)46Cj
FBgn0015488	lethal (2) 46Cl	l(2)46Cl
FBgn0015489	lethal (2) 46Cm	l(2)46Cm
FBgn0015490	lethal (2) 46Cn	l(2)46Cn
FBgn0015497	lethal (3) 65CEa	l(3)65CEa

FBgn0015498	lethal (3) 65CEb	l(3)65CEb
FBgn0015499	lethal (3) 65CEc	l(3)65CEc
FBgn0015502	lethal (3) 65CEf	l(3)65CEf
FBgn0015536	rosario	ros
FBgn0015559	unchained	unch
FBgn0015695	Enhancer of cactus[E10], number 11	E(cact[E10])11
FBgn0015931	ds-RNA binding protein 5	dsRNABP5
FBgn0015963	lethal (2) 46DEa	l(2)46DEa
FBgn0015964	lethal (2) 46DEb	l(2)46DEb
FBgn0015965	lethal (2) 46DEc	l(2)46DEc
FBgn0015966	lethal (2) 46DEd	l(2)46DEd
FBgn0016053	polar granule component	pgc
FBgn0016755	Toki	Toki
FBgn0016771	anon-59Da	anon-59Da
FBgn0016973	toto	toto
FBgn0017404	dorsal deviant	dode
FBgn0017482	Type III alcohol dehydrogenase	T3dh
FBgn0017625	Eig58C	Eig58C
FBgn0019714	lethal (2) 46CFn	l(2)46CFn
FBgn0019726	lethal (2) 46CFb	l(2)46CFb
FBgn0019809	gcm2	gcm2
FBgn0019850	anon-XIV	anon-XIV
FBgn0019932	S-adenosylmethionine decarboxylase	SamDC
FBgn0020307	defective proventriculus	dve
FBgn0020338	anon-62DEa	anon-62DEa
FBgn0020348	anon-46Fa	anon-46Fa
FBgn0020370	tripeptidyl-peptidase II	TppII
FBgn0020391	Neurospecific receptor kinase	Nrk
FBgn0020777	takahe	tak
FBgn0021793	lethal (2) k17026	l(2)k17026
FBgn0021863	lethal (2) k14204	l(2)k14204
FBgn0021891	lethal (2) k13211	l(2)k13211
FBgn0021901	lethal (2) k12408	l(2)k12408
FBgn0021986	lethal (2) k09801	l(2)k09801
FBgn0022040	lethal (2) k08320	l(2)k08320
FBgn0022120	lethal (2) k06617	l(2)k06617
FBgn0022128	lethal (2) k06416	l(2)k06416
FBgn0022192	lethal (2) k05104	l(2)k05104
FBgn0022205	lethal (2) k04308	l(2)k04308
FBgn0022216	lethal (2) k03610	l(2)k03610
FBgn0022257	lethal (2) k01006	l(2)k01006
FBgn0022336	dosach	dc
FBgn0022702	Chitinase 2	Cht2
FBgn0022720	Zinc finger protein 30C	zf30C

FBgn0022728	lethal (3) GPMG-30	l(3)GPMG-30
FBgn0022732	lethal (2) GPMG-18	l(2)GPMG-18
FBgn0022984	quaking related 58E-3	qkr58E-3
FBgn0022985	quaking related 58E-2	qkr58E-2
FBgn0022986	quaking related 58E-1	qkr58E-1
FBgn0022995	no endurance	ned
FBgn0023001	melted	melt
FBgn0023033	lethal (2) 46Ej	l(2)46Ej
FBgn0023034	lethal (2) 46Ei	l(2)46Ei
FBgn0023035	lethal (2) 46Eh	l(2)46Eh
FBgn0023036	lethal (2) 46Eg	l(2)46Eg
FBgn0023039	lethal (2) 46Ed	l(2)46Ed
FBgn0023040	lethal (2) 46Ec	l(2)46Ec
FBgn0023041	lethal (2) 46Eb	l(2)46Eb
FBgn0023042	lethal (2) 46Ea	l(2)46Ea
FBgn0023092	dh62	dh62
FBgn0023221	E(lz)15	E(lz)15
FBgn0023470	anon-30Fd	anon-30Fd
FBgn0023471	anon-30Fc	anon-30Fc
FBgn0023472	anon-30Fb	anon-30Fb
FBgn0023473	anon-30Fa	anon-30Fa
FBgn0024248	chico	chico
FBgn0024281	Truncated actin binding protein	Tabp
FBgn0024285	Srp54	Srp54
FBgn0024320	Niemann-Pick type C-1a	Npc1a
FBgn0024510	discs lost	dlt
FBgn0024547	lethal (3) L3659	l(3)L3659
FBgn0024552	lethal (3) L4060	l(3)L4060
FBgn0024722	Su(var)57D58D	Su(var)57D58D
FBgn0024752	Fs(2)1	Fs(2)1
FBgn0024921	Transportin	Trn
FBgn0025117	uninitiated	und
FBgn0025162	lethal (2) 49Fp	l(2)49Fp
FBgn0025186	ariadne 2	ari-2
FBgn0025481	male sterile (3) 85E	ms(3)85E
FBgn0025700	-	CG5885
FBgn0025820	JTBR	JTBR
FBgn0025878	wrapper	wrapper
FBgn0025881	-	snoRNA:Me18S-A1576
FBgn0026165	schmalspur	sur
FBgn0026379	Pten	Pten
FBgn0026388	Odorant receptor 46a	Or46a
FBgn0026653	lethal (2) 3A2	l(2)3A2
FBgn0026659	lethal (2) 17E1	l(2)17E1
FBgn0026880	E(Ubx)3L	E(Ubx)3L

FBgn0027079	Valyl-tRNA synthetase	Aats-val
FBgn0027197	lethal (2) 30Ca	l(2)30Ca
FBgn0027594	draper	drpr
FBgn0027619	Adam	Adam
FBgn0027790	GV1	GV1
FBgn0027903	-	CG12018
FBgn0028020	lethal (3) S104103	l(3)S104103
FBgn0028059	lethal (3) S093909	l(3)S093909
FBgn0028128	lethal (3) S056113	l(3)S056113
FBgn0028218	lethal (3) S007934	l(3)S007934
FBgn0028264	lethal (2) 46Ck	l(2)46Ck
FBgn0028384	condensed figures	cof
FBgn0028479	Mitochondrial trifunctional protein alpha subunit	Mtpalpha
FBgn0028597	lethal (2) k05113a	l(2)k05113a
FBgn0028638	indirect flight muscle (2) RU4	ifm(2)RU4
FBgn0028675	Sulfonylurea receptor	Sur
FBgn0028704	Nckx30C	Nckx30C
FBgn0028991	sequoia	seq
FBgn0029174	FK506-binding protein FKBP59	FKBP59
FBgn0032075	Tetraspanin 29Fb	Tsp29Fb
FBgn0032076	-	CG9510
FBgn0032077	-	CG9515
FBgn0032078	Core 1 Galactosyltransferase A	C1GalTA
FBgn0032079	-	CG31886
FBgn0032080	-	CG9525
FBgn0032082	-	CG18088
FBgn0032083	-	CG9541
FBgn0032084	-	CG13101
FBgn0032085	-	CG9555
FBgn0032086	-	CG17906
FBgn0032087	-	CG9568
FBgn0032088	-	CG13102
FBgn0032089	Rcd-1 related	Rcd-1r
FBgn0032090	-	CG9582
FBgn0032116	Multicopper oxidase-1	Mco1
FBgn0032117	FucTB	FucTB
FBgn0032119	-	CG3769
FBgn0032120	-	CG33298
FBgn0032122	-	CG31883
FBgn0032123	Organic anion transporting polypeptide 30B	Oatp30B
FBgn0032124	-	CG17855
FBgn0032125	Cuticular protein 30B	Cpr30B
FBgn0032126	-	CG13113

FBgn0032127	-	CG13114
FBgn0032129	junctophilin	jp
FBgn0032130	-	CG3838
FBgn0032131	-	CG3841
FBgn0032138	-	CG4364
FBgn0032139	-	CG13116
FBgn0032140	-	CG13117
FBgn0032143	-	CG4017
FBgn0032144	-	CG17633
FBgn0032147	Inositol 1,4,5-triphosphate kinase 1	IP3K1
FBgn0032149	-	CG4036
FBgn0032150	-	CG13123
FBgn0032151	nicotinic Acetylcholine Receptor alpha6	nAChRalpha6
FBgn0032153	-	CG4537
FBgn0032154	mitochondrial DNA helicase	mtDNA-helicase
FBgn0032156	-	CG13124
FBgn0032157	Etl1 homologue	Etl1
FBgn0032160	-	CG4598
FBgn0032161	-	CG4594
FBgn0032162	-	CG4592
FBgn0032163	TbCMF46	TbCMF46
FBgn0032166	-	CG4619
FBgn0032167	-	CG5853
FBgn0032188	-	CG13137
FBgn0032189	RPA-interacting protein alpha	Ripalpha
FBgn0032191	-	CG5734
FBgn0032192	-	CG5731
FBgn0032193	-	CG5727
FBgn0032194	-	CG4901
FBgn0032195	-	CG4908
FBgn0032196	-	CG5708
FBgn0032197	-	CG5694
FBgn0032198	eEF1delta	eEF1delta
FBgn0032200	-	CG5676
FBgn0032202	-	CG18619
FBgn0032204	-	CG4953
FBgn0032205	-	CG4957
FBgn0032218	-	CG5381
FBgn0032219	-	CG4995
FBgn0032221	-	CG5375
FBgn0032222	-	CG5037
FBgn0032223	GATAd	GATAd
FBgn0032224	Selenophosphate synthetase 2	Sps2

FBgn0032225	-	CG5022
FBgn0033486	-	CG11866
FBgn0033490	-	CG12917
FBgn0033491	-	CG18011
FBgn0033494	KCNQ potassium channel	KCNQ
FBgn0033516	-	CG12898
FBgn0033518	Peroxiredoxin 2540-2	Prx2540-2
FBgn0033519	-	CG11825
FBgn0033520	Peroxiredoxin 2540-1	Prx2540-1
FBgn0033521	-	CG12896
FBgn0033523	-	CG12895
FBgn0033524	Cyp49a1	Cyp49a1
FBgn0033526	Caf1-105	Caf1-105
FBgn0033527	-	CG11777
FBgn0033788	-	CG13323
FBgn0033789	-	CG13324
FBgn0033791	Derailed 2	Drl-2
FBgn0033798	-	CG15870
FBgn0033799	Glial Lazarillo	GLaz
FBgn0033802	-	CG17724
FBgn0033806	FLASH ortholog	FLASH
FBgn0033807	aquaporin	AQP
FBgn0033808	-	CG4627
FBgn0033809	-	CG4630
FBgn0033810	-	CG4646
FBgn0034709	Secreted Wg-interacting molecule	Swim
FBgn0034710	-	CG3292
FBgn0034711	-	CG3290
FBgn0034712	-	CG3264
FBgn0034713	-	CG11291
FBgn0034715	Organic anion transporting polypeptide 58Db	Oatp58Db
FBgn0034716	Organic anion transporting polypeptide 58Dc	Oatp58Dc
FBgn0034717	-	CG5819
FBgn0034718	windpipe	wdp
FBgn0034720	Liprin-gamma	Liprin-gamma
FBgn0034721	-	CG11298
FBgn0034722	Rtf1	Rtf1
FBgn0034723	-	CG13506
FBgn0034724	babos	babos
FBgn0034725	-	CG6044
FBgn0034726	Mesoderm-expressed 4	Mes4
FBgn0034727	mitochondrial ribosomal protein S29	mRpS29

FBgn0034728	rad50	rad50
FBgn0034729	-	CG10344
FBgn0034730	pickpocket 12	ppk12
FBgn0034731	-	CG10384
FBgn0034733	-	CG4752
FBgn0034734	-	CG4554
FBgn0034735	-	CG4610
FBgn0034736	-	CG6018
FBgn0034737	-	CG11362
FBgn0034739	-	CG3927
FBgn0034741	-	CG4269
FBgn0034742	-	CG4294
FBgn0034743	Ribosomal protein S16	RpS16
FBgn0034744	Vacuolar protein sorting 20	Vps20
FBgn0034849	-	CG3500
FBgn0034850	-	CG9875
FBgn0035259	-	CG13932
FBgn0035260	-	CG7991
FBgn0035262	-	CG18171
FBgn0035263	-	CG12035
FBgn0035264	Outer segment 4	Oseg4
FBgn0035265	-	CG18173
FBgn0035266	Glycerol kinase	Gk
FBgn0035267	-	CG13921
FBgn0035268	-	CG8001
FBgn0035270	-	CG13933
FBgn0035271	-	CG2021
FBgn0035272	mitochondrial ribosomal protein L46	mRpL46
FBgn0035273	-	CG12020
FBgn0035279	Cuticular protein 62Ba	Cpr62Ba
FBgn0035280	Cuticular protein 62Bb	Cpr62Bb
FBgn0035281	Cuticular protein 62Bc	Cpr62Bc
FBgn0035282	-	CG13936
FBgn0035283	-	CG12024
FBgn0035285	-	CG12025
FBgn0035286	-	CG13924
FBgn0035287	-	CG13937
FBgn0035377	-	CG14952
FBgn0035379	spatzle 5	spz5
FBgn0035380	-	CG9970
FBgn0035382	Odorant receptor 63a	Or63a
FBgn0035383	-	CG2107
FBgn0035384	-	CG2113
FBgn0035385	FMRFamide Receptor	FMRFaR

FBgn0035388	-	CG2162
FBgn0035390	scramblase 2	scramb2
FBgn0035720	-	CG10077
FBgn0035724	-	CG10064
FBgn0035725	Mis12	Mis12
FBgn0035726	-	CG9953
FBgn0035727	-	CG10063
FBgn0035730	-	CG17744
FBgn0035733	-	CG8641
FBgn0035734	-	CG14823
FBgn0035735	Cuticular protein 65Ea	Cpr65Ea
FBgn0035736	Cuticular protein 65Eb	Cpr65Eb
FBgn0035737	Cuticular protein 65Ec	Cpr65Ec
FBgn0035741	Bardet-Biedl syndrome 1 ortholog (H. sapiens)	BBS1
FBgn0035742	-	CG8629
FBgn0035743	-	CG15829
FBgn0040064	yippee interacting protein 2	yip2
FBgn0040308	thioredoxin peroxidase 2	Jafrac2
FBgn0040330	EY2-8	EY2-8
FBgn0040754	-	CG17059
FBgn0040772	-	CG12430
FBgn0040837	-	CG8620
FBgn0040963	-	CG18662
FBgn0040964	-	CG18661
FBgn0041194	Phosphoribosylamidotransferase 2	Prat2
FBgn0041619	SM2-1	SM2-1
FBgn0041735	lethal (3) 65AEa	l(3)65AEa
FBgn0042174	-	CR18854
FBgn0042712	HBS1	HBS1
FBgn0043010	-	Fsn
FBgn0043564	Su(hh)III	Su(hh)III
FBgn0043565	Su(hh)II	Su(hh)II
FBgn0043566	Su(hh)I	Su(hh)I
FBgn0044106	E(rst)C408	E(rst)C408
FBgn0044398	Sensitized chromosome inheritance modifier 29	Scim29
FBgn0044412	Sensitized chromosome inheritance modifier 15	Scim15
FBgn0044452	Autophagy-specific gene 2	Atg2
FBgn0045759	biniou	bin
FBgn0047205	-	CR32385
FBgn0050011	gemini	gem
FBgn0050058	-	CG30058
FBgn0050277	Organic anion transporting polypeptide 58Da	Oatp58Da

FBgn0050278	-	CG30278
FBgn0050320	-	CG30320
FBgn0050409	-	CG30409
FBgn0050410	Ribose-5-phosphate isomerase	Rpi
FBgn0051708	-	CG31708
FBgn0051709	-	CG31709
FBgn0051710	-	CG31710
FBgn0051712	-	CG31712
FBgn0051713	diadenosine tetraphosphate hydrolase	Apf
FBgn0051715	-	CG31715
FBgn0051717	-	CG31717
FBgn0051720	methuselah-like 15	mthl15
FBgn0051874	-	CG31874
FBgn0051876	Cuticular protein 30F	Cpr30F
FBgn0051880	-	CG31880
FBgn0052391	-	CG32391
FBgn0052484	Sphingosine kinase 2	Sk2
FBgn0052487	-	CG32487
FBgn0052488	-	CG32488
FBgn0052846	-	CG32846
FBgn0052984	-	CG32984
FBgn0052985	-	CG32985
FBgn0053137	-	CG33137
FBgn0053138	1,4-Alpha-Glucan Branching Enzyme	AGBE
FBgn0053182	Histone demethylase 4B	Kdm4B
FBgn0053200	ventrally-expressed-protein-D	ventrally-expressed-protein-D
FBgn0053300	Mucin 30E	Muc30E
FBgn0053474	-	CG33474
FBgn0053475	-	CG33475
FBgn0053476	-	CG33476
FBgn0053477	-	CG33477
FBgn0053556	formin 3	form3
FBgn0053723	-	CG33723
FBgn0054025	-	CG34025
FBgn0054030	-	CG34030
FBgn0054043	-	CG34043
FBgn0060327	lethal (3) S146508	l(3)S146508
FBgn0060351	lethal (3) S142206	l(3)S142206
FBgn0060509	lethal (3) S104315	l(3)S104315
FBgn0060586	lethal (3) S093902	l(3)S093902
FBgn0060672	lethal (3) S078708	l(3)S078708
FBgn0060719	lethal (3) S068802	l(3)S068802
FBgn0060730	lethal (3) S067309	l(3)S067309
FBgn0060838	lethal (3) S049604	l(3)S049604

FBgn0060863	lethal (3) S047331	l(3)S047331
FBgn0060922	lethal (3) S042239	l(3)S042239
FBgn0060946	lethal (3) S037913	l(3)S037913
FBgn0060983	lethal (3) S028304	l(3)S028304
FBgn0061020	lethal (3) S025266	l(3)S025266
FBgn0061511	fs(2)AL289	fs(2)AL289
FBgn0063389	-	snoRNA:Me18S-G1620
FBgn0063391	snoRNA:U14:30Eb	snoRNA:U14:30Eb
FBgn0063392	snoRNA:U14:30Ea	snoRNA:U14:30Ea
FBgn0063449	U snoRNA host gene 2	Uhg2
FBgn0063598	Calcineurin suppressor, chromosome 3, group 1	CS3-1
FBgn0063644	Calcineurin enhancer, chromosome 3, group 2	CE3-2
FBgn0065108	pickpocket 16	ppk16
FBgn0065109	pickpocket 11	ppk11
FBgn0066131	E(sda)B	E(sda)B
FBgn0067864	Patj	Patj
FBgn0069202	lethal (2) 46Fb	l(2)46Fb
FBgn0082925	snoRNA:Or-aca1	snoRNA:Or-aca1
FBgn0083003	snoRNA:Psi28S-1175c	snoRNA:Psi28S-1175c
FBgn0083004	snoRNA:Psi28S-1175b	snoRNA:Psi28S-1175b
FBgn0083005	snoRNA:Psi28S-1175a	snoRNA:Psi28S-1175a
FBgn0085188	-	CG34159
FBgn0085211	Ribosomal protein S28-like	RpS28-like
FBgn0085212	-	CG34183
FBgn0085236	-	CG34207
FBgn0085237	-	CG34208
FBgn0085239	-	CG34210
FBgn0085264	-	CG34235
FBgn0085341	-	CG34312
FBgn0085344	-	CG34315
FBgn0085395	Shaw-like	ShawI
FBgn0085396	-	CG34367
FBgn0085427	-	CG34398
FBgn0085452	-	CG34423
FBgn0085453	-	CG34424
FBgn0085468	-	CG34439
FBgn0086027	-	snoRNA:Or-CD1
FBgn0086028	-	snoRNA:Me28S-G2173
FBgn0086356	tumbleweed	tum
FBgn0086532	Serine palmitoyltransferase subunit I	Spt-I
FBgn0250789	alpha Spectrin	alpha-Spec
FBgn0250836	-	CG8628
FBgn0250838	-	CG30415

FBgn0250840	-	CG12907
FBgn0250843	Proteasome alpha6 subunit	Prosalph6
FBgn0250849	-	CG32388
FBgn0259173	cornetto	corn
FBgn0259482	-	Mob3
FBgn0259712	-	CG42366
FBgn0259713	-	CG42367
FBgn0259876	-	Cap-G
FBgn0260660	multiplexin	mp
FBgn0260749	-	Utx
FBgn0260750	Multi-substrate lipid kinase	Mulk
FBgn0260866	defense repressor 1	dnr1
FBgn0261014	TER94	TER94
FBgn0261049	Vacuolar protein sorting 45	Vps45
FBgn0261445	sugarless	sgl
FBgn0261562	-	CG42676
FBgn0261686	-	CG42733
FBgn0261698	-	CG42732
FBgn0261862	withered	whd
FBgn0262036	-	CG42847
FBgn0262114	Ran-binding protein M	RanBPM
FBgn0262428	mir-87 stem loop	mir-87
FBgn0262593	Shaker cognate b	Shab
FBgn0262782	Malate dehydrogenase 1	Mdh1
FBgn0262806	-	CG43177
FBgn0263341	-	CR43422
FBgn0263387	-	CG43439
FBgn0263392	-	CG43444
FBgn0263444	-	CR43467
FBgn0263612	-	CR43621
FBgn0263973	javelin	jv
FBgn0263998	Activated Cdc42 kinase-like	Ack-like
FBgn0264266	-	CR43766
FBgn0264269	-	CR43769
FBgn0264998	-	CR44149
FBgn0264999	-	CR44150
FBgn0265001	pickpocket 18	ppk18
FBgn0265002	-	CG44153
FBgn0265053	-	CR44168
FBgn0265296	Down syndrome cell adhesion molecule 2	Dscam2
FBgn0265512	mulet	mlt
FBgn0266139	-	CR44845
FBgn0266330	-	CR44995
FBgn0266432	-	CG45062

FBtr0079907
FBtr0079908
FBtr0079909
FBtr0079910
FBtr0304395

Tabla 2 - Genes analizados con DAVID. Genes delecionados en las líneas de deficiencias que fueron positivas en el *screen* de ojo.

Gen	Nombre	Agrupamiento
FBgn0034728	DNA repair protein RAD50	1
FBgn0010387	Diazepam-binding inhibitor	1 y 7
FBgn0033521	Dmel_CG12896	1 y 7
FBgn0035743	Dmel_CG15829	1 y 7
FBgn0032225	Dmel_CG5022	1
FBgn0250836	Dmel_CG8628	1 y 7
FBgn0035742	Dmel_CG8629	1 y 7
FBgn0029174	FK506-binding protein FKBP59	1
FBgn0035385	Fmrf Receptor	1 y 7
FBgn0024248	Insulin receptor substrate 1	1 y 8
FBgn0010238	Lachesin	1
FBgn0033520	Peroxiredoxin 2540-1	1 y 7
FBgn0033518	Peroxiredoxin 2540-2	1 y 7
FBgn0040308	thioredoxin peroxidase 2	1 y 7
FBgn0032123	Organic anion transporting polypeptide 30B	2
FBgn0050277	Organic anion transporting polypeptide 58Da	2
FBgn0034715	Organic anion transporting polypeptide 58Db	2
FBgn0034716	Organic anion transporting polypeptide 58Dc	2
FBgn0034731	Dmel_CG10384	3
FBgn0034739	Dmel_CG3927	3
FBgn0022986	quaking related 58E-1	3
FBgn0022985	quaking related 58E-2	3
FBgn0022984	quaking related 58E-3	3
FBgn0025878	Dmel_CG10382	4
FBgn0001104	G protein alpha subunit 65A	4 y 9
FBgn0001122	G protein alpha 47A	4 y 9
FBgn0002973	Protein numb	4
FBgn0019809	Transcription factor glial cells missing 2	4
FBgn0014179	glial cells missing	4
FBgn0032125	Cuticular protein 30B	5
FBgn0051876	Cuticular protein 30F	5
FBgn0035279	Cuticular protein 62Ba	5

FBgn0035280	Cuticular protein 62Bb	5
FBgn0035281	Cuticular protein 62Bc	5
FBgn0035735	Cuticular protein 65Ea	5
FBgn0035736	Cuticular protein 65Eb	5
FBgn0035737	Cuticular protein 65Ec	5
FBgn0259713	Dmel_CG42367	5
FBgn0050410	Dmel_CG30410	6
FBgn0028479	Dmel_CG4389	6
FBgn0032162	Dmel_CG4592	6
FBgn0032161	Dmel_CG4594	6
FBgn0032160	Dmel_CG4598	6
FBgn0010531	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	7
FBgn0004907	14-3-3 protein zeta	8
FBgn0013746	COP9 signalosome complex subunit 2	8
FBgn0011763	DP transcription factor	8
FBgn0001291	Jun-related antigen	8
FBgn0011656	Myocyte enhancing factor 2	8
FBgn0011823	Pendulin	8
FBgn0004636	Roughened	8
FBgn0052484	Sphingosine kinase 2	8
FBgn0261014	Transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94	8
FBgn0250789	alpha Spectrin	8
FBgn0004372	always early	8
FBgn0000229	basket	8
FBgn0000273	cAMP-dependent protein kinase 1	8, 9 y 10
FBgn0004817	female sterile (2) ltoAHK35	8
FBgn0004823	female sterile (2) ltoAPV63	8
FBgn0004818	female sterile (2) ltoDC37	8
FBgn0004813	female sterile (2) ltoHM11	8
FBgn0004821	female sterile (2) ltoRM7	8
FBgn0004816	female sterile (2) ltoRU26	8
FBgn0026659	lethal (2) 17E1	8
FBgn0026653	lethal (2) 3A2	8
FBgn0011256	male sterile (2) 30C	8
FBgn0011207	pelota	8
FBgn0016053	polar granule component	8
FBgn0003188	quit	8
FBgn0011232	scattered	8
FBgn0004867	string of pearls	8
FBgn0003977	virilizer	8
FBgn0034711	Alkaline phosphatase	10
FBgn0034712	Alkaline phosphatase	10
FBgn0034710	Alkaline phosphatase	10
FBgn0032120	Dmel_CG33298	10

FBgn0034742	Dmel_CG4294	10
FBgn0026379	Dmel_CG5671	10
FBgn0032078	Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1	10

Tabla 3 – Resultado obtenido mediante DAVID. Se obtuvieron 79 genes que pudieron ser agrupados en 10 agrupamientos funcionales.

Bibliografía

- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-2195.
- Arrese, E. L. and J. L. Soulages (2010). "Insect fat body: energy, metabolism, and regulation." Annu Rev Entomol **55**: 207-225.
- Atkinson, A., P. Smith, et al. (2011). "The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria." Mol Cell Biol **31**(19): 3988-3996.
- Bellen, H. J., R. W. Levis, et al. (2004). "The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes." Genetics **167**(2): 761-781.
- Bettencourt da Cruz, A., M. Schwarzel, et al. (2005). "Disruption of the MAP1B-related protein FUTSCH leads to changes in the neuronal cytoskeleton, axonal transport defects, and progressive neurodegeneration in *Drosophila*." Mol Biol Cell **16**(5): 2433-2442.
- Bier, E. (2005). "*Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics." Nat Rev Genet **6**(1): 9-23.
- Boveris, D. L. and A. Boveris (2007). "Oxygen delivery to the tissues and mitochondrial respiration." Front Biosci **12**: 1014-1023.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-415.
- Bridges, H. R., J. A. Birrell, et al. (2011). "The mitochondrial-encoded subunits of respiratory complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): identifying residues important in mechanism and disease." Biochem Soc Trans **39**(3): 799-806.
- Burcin, M. M., B. W. O'Malley, et al. (1998). "A regulatory system for target gene expression." Front Biosci **3**: c1-7.
- Carvalho, A. B., B. A. Dobo, et al. (2001). "Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13225-13230.
- Celotto, A. M. and M. J. Palladino (2005). "*Drosophila*: a "model" model system to study neurodegeneration." Mol Interv **5**(5): 292-303.
- Cermakova, P., Z. Verner, et al. (2007). "Characterization of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in the

- trypanosomatid *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida)." FEBS J **274**(12): 3150-3158.
- Clark, I. E., M. W. Dodson, et al. (2006). "Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin." Nature **441**(7097): 1162-1166.
- Cook, R. K., S. J. Christensen, et al. (2012). "The generation of chromosomal deletions to provide extensive coverage and subdivision of the *Drosophila melanogaster* genome." Genome Biol **13**(3): R21.
- Cooley, L., C. Berg, et al. (1988). "Controlling P element insertional mutagenesis." Trends Genet **4**(9): 254-258.
- Depetris-Chauvin, A., J. Berni, et al. (2011). "Adult-specific electrical silencing of pacemaker neurons uncouples molecular clock from circadian outputs." Curr Biol **21**(21): 1783-1793.
- Dietzl, G., D. Chen, et al. (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*." Nature **448**(7150): 151-156.
- Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife." Genesis **34**(1-2): 1-15.
- Feany, M. B. and W. W. Bender (2000). "A *Drosophila* model of Parkinson's disease." Nature **404**(6776): 394-398.
- Federico, A., E. Cardaioli, et al. (2012). "Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration." J Neurol Sci **322**(1-2): 254-262.
- Fernandez-Funez, P., M. L. Nino-Rosales, et al. (2000). "Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration." Nature **408**(6808): 101-106.
- Fernandez, M. P., J. Berni, et al. (2008). "Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior." PLoS Biol **6**(3): e69.
- Fischer, J. A., E. Giniger, et al. (1988). "GAL4 activates transcription in *Drosophila*." Nature **332**(6167): 853-856.
- Gates, J., G. Lam, et al. (2004). "rigor mortis encodes a novel nuclear receptor interacting protein required for ecdysone signaling during *Drosophila* larval development." Development **131**(1): 25-36.
- Ghosh, S. and M. B. Feany (2004). "Comparison of pathways controlling toxicity in the eye and brain in *Drosophila* models of human neurodegenerative diseases." Hum Mol Genet **13**(18): 2011-2018.
- Greenspan, R. (1997). Fly Pushing - The theory and practice of *Drosophila* Genetics. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Greeve, I., D. Kretzschmar, et al. (2004). "Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*." *J Neurosci* **24**(16): 3899-3906.
- Hebert, L. E., L. A. Beckett, et al. (2001). "Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050." *Alzheimer Dis Assoc Disord* **15**(4): 169-173.
- Heimbeck, G., V. Bugnon, et al. (1999). "Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons." *J Neurosci* **19**(15): 6599-6609.
- Helfrich-Forster, C. (2003). "The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*." *Microsc Res Tech* **62**(2): 94-102.
- Helfrich-Forster, C. (2005). "Neurobiology of the fruit fly's circadian clock." *Genes Brain Behav* **4**(2): 65-76.
- Huang da, W., B. T. Sherman, et al. (2009). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists." *Nucleic Acids Res* **37**(1): 1-13.
- Huang da, W., B. T. Sherman, et al. (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nat Protoc* **4**(1): 44-57.
- Kozlova, T. and C. S. Thummel (2000). "Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*." *Trends Endocrinol Metab* **11**(7): 276-280.
- Lee, W. C., M. Yoshihara, et al. (2004). "Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3224-3229.
- Lim, C., J. Lee, et al. (2011). "The novel gene twenty-four defines a critical translational step in the *Drosophila* clock." *Nature* **470**(7334): 399-403.
- Linneweber, G. A., J. Jacobson, et al. (2014). "Neuronal control of metabolism through nutrient-dependent modulation of tracheal branching." *Cell* **156**(1-2): 69-83.
- Lu, B. and H. Vogel (2009). "*Drosophila* models of neurodegenerative diseases." *Annu Rev Pathol* **4**: 315-342.
- Martin, J. R. (2003). "Locomotor activity: a complex behavioural trait to unravel." *Behav Processes* **64**(2): 145-160.
- McGuire, S. E., Z. Mao, et al. (2004). "Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*." *Sci STKE* **2004**(220): pl6.
- Moussian, B., E. Tang, et al. (2006). "*Drosophila* Knickkopf and Retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle

- differentiation through their specific requirement for chitin filament organization." Development **133**(1): 163-171.
- Nassel, D. R. and U. Homberg (2006). "Neuropeptides in interneurons of the insect brain." Cell Tissue Res **326**(1): 1-24.
- Nunnari, J. and A. Suomalainen (2012). "Mitochondria: in sickness and in health." Cell **148**(6): 1145-1159.
- Osterwalder, T., K. S. Yoon, et al. (2001). "A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12596-12601.
- Palladino, M. J., J. E. Bower, et al. (2003). "Neural dysfunction and neurodegeneration in *Drosophila* Na⁺/K⁺ ATPase alpha subunit mutants." J Neurosci **23**(4): 1276-1286.
- Palladino, M. J., T. J. Hadley, et al. (2002). "Temperature-sensitive paralytic mutants are enriched for those causing neurodegeneration in *Drosophila*." Genetics **161**(3): 1197-1208.
- Park, J., S. B. Lee, et al. (2006). "Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin." Nature **441**(7097): 1157-1161.
- Peschel, N. and C. Helfrich-Forster (2011). "Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*." FEBS Lett **585**(10): 1435-1442.
- Pignoni, F., B. Hu, et al. (1997). "Identification of genes required for *Drosophila* eye development using a phenotypic enhancer-trap." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9220-9225.
- Poderoso, J. J., S. Fernandez, et al. (1994). "Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats." Circ Shock **44**(4): 175-182.
- Qiu, J., C. L. Gao, et al. (2009). "LYRM1, a novel gene promotes proliferation and inhibits apoptosis of preadipocytes." Eur J Endocrinol **160**(2): 177-184.
- Rezaval, C., J. Berni, et al. (2008). "A functional misexpression screen uncovers a role for *enabled* in progressive neurodegeneration." PLoS ONE **3**(10): e3332.
- Riddiford, L. M., P. Cherbas, et al. (2000). "Ecdysone receptors and their biological actions." Vitam Horm **60**: 1-73.
- Rorth, P. (1996). "A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12418-12422.
- Rouault, T. A. (2014). "Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function." Nat Rev Mol Cell Biol.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, et al. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes." Science **287**(5461): 2204-2215.

- Sanz, A., M. Soikkeli, et al. (2010). "Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(20): 9105-9110.
- Seiger, M. B. and J. F. Kink (1993). "The effect of anesthesia on the photoresponses of four sympatric species of *Drosophila*." Behav Genet **23**(1): 99-104.
- Sokolowski, M. B., Kent, C, and Wong, J. (1984). "*Drosophila* larval foraging behaviour: Developmental stages." Anim Behav **32**.
- St Johnston, D. (2002). "The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*." Nat Rev Genet **3**(3): 176-188.
- Sullivan, W., Ashburner, M., and Hawley, R.S. (2000). *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Talsma, A. D., C. P. Christov, et al. (2012). "Remote control of renal physiology by the intestinal neuropeptide pigment-dispersing factor in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(30): 12177-12182.
- Van Den Eeden, S. K., C. M. Tanner, et al. (2003). "Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity." Am J Epidemiol **157**(11): 1015-1022.
- Verstreken, P., T. Ohyama, et al. (2009). "Tweek, an evolutionarily conserved protein, is required for synaptic vesicle recycling." Neuron **63**(2): 203-215.
- Villani, G. and G. Attardi (2007). "Polarographic assays of respiratory chain complex activity." Methods Cell Biol **80**: 121-133.
- Wingrove, J. A. and P. H. O'Farrell (1999). "Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*." Cell **98**(1): 105-114.
- Xu, K., X. Zheng, et al. (2008). "Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*." Cell Metab **8**(4): 289-300.
- Zhu, C., Y. Q. Liu, et al. (2010). "LYRM1, a gene that promotes proliferation and inhibits apoptosis during heart development." Molecules **15**(10): 6974-6982.
- Zinke, I., C. Kirchner, et al. (1999). "Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system." Development **126**(23): 5275-5284.