

**TESIS DE DOCTORADO PEDECIBA BIOLOGÍA
SUB-ÁREA NEUROCIENCIAS**

**IDENTIFICACIÓN DE GENES CON POTENCIAL
NEUROPROTECTOR EN UN MODELO DE REVERSIÓN DE
NEURODEGENERACIÓN EN *DROSOPHILA
MELANOGASTER***



Mag. MARÍA JOSÉ FERREIRO LLANES

Departamento de Biología del Neurodesarrollo-IIBCE-MEC-Montevideo, Uruguay

Orientador: Dr. Rafael Cantera

Co-orientadora: Dra. Rosa Barrio

Montevideo, Uruguay

2018

***Para vos viejita que siempre confiaste en mí y
estarás siempre en mi corazón.....***

AGRADECIMIENTOS

Al tribunal: Drs. Patricia Cassina, Beatriz Goñi y Hugo Peluffo.

A mis orientadores: Rosa y Rafael.

A PEDECIBA.

A la ANII: POS_NAC_2012_1_8720 y FCE_1_2014_1_104669

A otras fuentes de financiación: Fundación Carl Tryggers, MINECO MICINN español [BFU2011-25986; BFU2014-52282-P; Consolider (CSD2007-008-25120, BFU2014-57703-REDC)]; Departamentos de Educación e Industria del Gobierno Vasco [PI2012/42] y Provincia de Vizcaya

A todos los co-autores y personas que participaron en experimentos: Coralía Pérez, Ana María Aransay, Mariana Marchesano, Santiago Ruiz, Angel Caputi, Pedro Aguilera, Naiara Rodríguez-Ezpeleta, Michael Hackenberg, Rosa y Rafael. Cristina Parada, Guillermo Valiño, Giorgina Bachino.

A la Dra. Ana M Aransay. Plataforma Análisis Genómico. CICbioGUNE y CIBERhd y todo su equipo.

Al Dr. Juan Andrés Abín. Plataforma de HPLC- IIBCE.

A los integrantes de BND: Cris, Flavio, Daniel, Giorgina, Martín, Santiago, Sole

A los integrantes del Laboratorio de Genómica Funcional, CIC bioGUNE: Corita, Laura, Jim, Mónica, Ana, Lutxi, Leire, Wendy.

A todos mis amigos de acá y de allá, de hoy y de siempre.....

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL.....	1
----------------------	---

INTRODUCCIÓN GENERAL

<i>1. Enfermedades neurodegenerativas.....</i>	<i>5</i>
--	----------

<i>2. Drosophila melanogaster: un excelente modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.....</i>	<i>7</i>
--	----------

<i>3. Los genes spalt-like.....</i>	<i>12</i>
-------------------------------------	-----------

<i>4. Mutantes spalt de Drosophila: un caso excepcional de neurodegeneración reversible.....</i>	<i>13</i>
--	-----------

HIPÓTESIS GENERAL.....	15
------------------------	----

OBJETIVO GENERAL.....	16
-----------------------	----

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
----------------------------	----

ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	17
-----------------------------	----

CAPÍTULO I: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE UN PROCESO DE NEURODEGENERACIÓN REVERSIBLE

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO I.....	19
------------------------------	----

HIPÓTESIS CAPÍTULO I.....	21
---------------------------	----

OBJETIVO GENERAL CAPÍTULO I.....	22
----------------------------------	----

OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO I.....	22
---------------------------------------	----

METODOLOGÍA CAPÍTULO I

<i>1. Selección de embriones y extracción de ARN.....</i>	<i>23</i>
---	-----------

<i>2. Validación de expresión por PCR y qPCR.....</i>	<i>24</i>
---	-----------

<i>3. Secuenciación mRNA-Seq, anotación de secuencias y análisis de expresión diferencial.....</i>	<i>26</i>
--	-----------

<i>4. Análisis de la ontología génica y otros análisis bioinformáticos.....</i>	<i>27</i>
---	-----------

RESULTADOS CAPÍTULO I

<i>1. Cuantificación y chequeo de calidad de las muestras de ARN empleadas en la secuenciación mRNA-Seq.....</i>	<i>29</i>
<i>2. Análisis por PCR y qPCR de la expresión de los genes sall.....</i>	<i>30</i>
<i>3. Secuenciación mRNA-Seq y análisis DE.....</i>	<i>31</i>
<i>4. Validación de los resultados de mRNA-Seq por medio de qPCR de genes del sistema inmune previamente asociados a ND.....</i>	<i>38</i>
<i>5. Análisis de los sitios de unión a la proteína Sall en los genes del sistema inmune seleccionados para la validación del análisis DE.....</i>	<i>39</i>
<i>6. Comparación de los resultados DE con los datos de modENCODE.....</i>	<i>40</i>
<i>7. Análisis de ontología génica.....</i>	<i>40</i>
7.1. Identificación de genes potencialmente asociados a ND.....	42
7.2. Identificación de genes potencialmente asociados a NP.....	43

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES CAPÍTULO I

<i>1. Validación del modelo de ND reversible de los mutantes sall.....</i>	<i>48</i>
<i>2. Identificación de genes potencialmente asociados a ND y NP.....</i>	<i>49</i>
2.1. Identificación de genes potencialmente asociados a ND.....	50
2.2. Identificación de genes potencialmente asociados a NP.....	51
<i>3. Genes regulados directamente por los factores de transcripción Sall.....</i>	<i>52</i>
<i>4. Existe un cambio global en la expresión génica durante la transición de la etapa de desarrollo neural temprano y la de diferenciación neuronal tardía en Drosophila.....</i>	<i>55</i>
<i>5. Conclusiones principales.....</i>	<i>56</i>

CAPÍTULO II: LOS MUTANTES DEL GEN WHITE DE DROSOPHILA PRESENTAN NEURODEGENERACIÓN

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

1. <i>El gen white de Drosophila</i>	58
2. <i>El ojo compuesto de Drosophila como modelo de ND</i>	61
3. <i>Variaciones en el contenido de dopamina y su asociación con ND</i>	64
4. <i>Problemas de locomoción y reducción en el largo de vida en condiciones normales y de estrés como indicios de ND en mutantes de Drosophila</i>	65
HIPÓTESIS CAPÍTULO II	67
OBJETIVO GENERAL CAPÍTULO II	68
OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO II	68
METODOLOGÍA CAPÍTULO II	
1. <i>Cepas de Drosophila y condiciones de laboratorio</i>	69
2. <i>Histología retinal</i>	69
3. <i>Medición de lagunas</i>	70
4. <i>Mediciones del tamaño y número de rabdómeros</i>	70
5. <i>Electroretinogramas</i>	71
6. <i>Medición del contenido de DA por HPLC</i>	72
7. <i>Ensayo de locomoción (climbing)</i>	73
8. <i>Ensayos de largo de vida</i>	74
9. <i>Ensayos de estrés: dieta enriquecida en azúcar, ayuno y tratamiento con los agentes oxidantes paraquato y peróxido de hidrógeno</i>	74
10. <i>Neutralización óptica de la córnea</i>	75
RESULTADOS CAPÍTULO II	
1. <i>Dos mutaciones del gen w de Drosophila causan una degeneración retinal progresiva</i>	76
2. <i>Las mutaciones en w afectan la función retinal</i>	81
3. <i>Las mutaciones en w tienden a disminuir los niveles de DA y alteran la locomoción</i>	83

<i>4. Las mutaciones en el gen w reducen el largo de vida y la tolerancia al estrés.....</i>	84
<i>5. La expresión del transgen mini-white⁺ en los mutantes w rescata el fenotipo de degeneración retinal.....</i>	88
DISCUSIÓN CAPÍTULO II.....	90
 CAPÍTULO III: VALIDACIÓN DE GENES CANDIDATOS A NEUROPROTECCIÓN: LA SEÑALIZACIÓN POR ACETIL-COA	
INTRODUCCIÓN CAPÍTULO III.....	96
HIPÓTESIS CAPÍTULO III.....	103
OBJETIVO GENERAL CAPÍTULO III.....	104
OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO III.....	104
METODOLOGÍA CAPÍTULO III	
<i>1. Selección de genes candidatos a NP.....</i>	105
<i>2. Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes candidatos en embriones y en el SNC de moscas adultas.....</i>	105
<i>3. Análisis de la expresión de los genes candidatos en el SNC mediante hibridación in situ en cerebro de larva.....</i>	107
3.1. Construcción de sondas.....	107
3.2. Síntesis y marcaje de sondas.....	109
3.3. Disección de cerebros de larvas.....	111
3.4. Hibridación <i>in situ</i>	111
<i>4. Cepas y cruces de moscas transgénicas para el silenciamiento y la sobre-expresión de los genes candidatos.....</i>	113
<i>5. Medición del largo de vida.....</i>	114
<i>6. Ensayos de locomoción (climbing).....</i>	115

RESULTADOS CAPÍTULO III

1. Selección de genes candidatos a neuroprotectores	116
1.1. Incongruencias en el patrón de expresión entre las tres comparaciones genotípicas de interés (Filtro 1)	116
1.2. Asociación previa demostrada a procesos de ND/ NP en <i>Drosophila</i> (Filtro 2)	117
1.3. Falta de expresión en el SN de <i>Drosophila</i> (Filtro 3)	117
1.4. Ausencia de cepas transgénicas de <i>Drosophila</i> para sobre-expresar o inhibir su expresión (Filtro 4)	118
1.5. Falta de homología con genes humanos (Filtro 5)	119
1.6. Previa asociación demostrada a procesos de ND/ NP de los genes homólogos humanos (Filtro 6)	120
1.7. Falta de expresión de los genes homólogos humanos en el SN (Filtro 7)	120
1.8. Selección de genes asociados a la vía de <i>parkin</i> (Filtro 8)	123
2. Validación mediante qPCR de los niveles de expresión mRNA-Seq de los genes candidatos	127
3. Confirmación de la expresión de los genes candidatos en el SNC por hibridación in situ en cerebros de larva	129
4. Validación in vivo de los tres genes candidatos a neuroprotectores vinculados a la vía de acetil-CoA: ACC, CG4586 y CG10932	131
4.1. Ensayos de largo de vida en moscas silenciadas para ACC, CG4586 o CG10932 y en moscas <i>parkin</i> con sobre-expresión de ACC y CG10932	132
4.1.1. El silenciamiento de ACC acorta el largo de vida mientras que su sobre-expresión conferiría NP	132
4.1.2. El silenciamiento y la sobre-expresión de CG10932 en neuronas dopaminérgicas acortan el largo de vida mientras que la regulación de su expresión en neuronas colinérgicas conferiría NP	134
4.1.3. El silenciamiento glial y dopaminérgico de CG4586 acorta el largo de vida mientras que su silenciamiento colinérgico conferiría NP	136

4.2. Ensayos de climbing para el silenciamiento génico y sobre-expresión de ACC y CG10932.....	137
4.2.1. El silenciamiento dopaminérgico y glial de ACC y su sobre-expresión neuronal causan un deterioro de la movilidad y empeoran la movilidad de individuos con ND	137
4.2.2. El silenciamiento glial de CG10932 y su sobre-expresión neuronal causan un deterioro de la movilidad	140
5. Actualización del enriquecimiento en genes de ND y NP en nuestra lista inicial de genes candidatos.....	142
DISCUSIÓN CAPÍTULO III.....	145
<i>Genes de la vía del Acetil-CoA y los lípidos como potenciales neuroprotectores.....</i>	151
1. La Acetil-CoA-carboxilasa, ACC, como potencial neuroprotector.....	153
2. La Acetil-CoA-acetiltransferasa, codificada por CG10932, como potencial neuroprotector.....	156
3. La Acetil-CoA-oxidasa, codificada por CG4586, como potencial neuroprotector.....	157
4. Perspectivas generales para completar la caracterización de una potencial función neuroprotectora de los tres genes candidatos.....	158
<u>CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS.....</u>	162
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	165
<u>TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....</u>	185

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	8
Figura 2. SN de <i>Drosophila</i>	10
Figura 3. Microscopía electrónica de cerebros de embriones normales y mutantes nulos <i>sall</i> en los estadios de ND y reversión.....	14
Figura 4. Selección de muestras de embriones para la extracción de ARN.....	24
Figura 5. Esquema de las comparaciones realizadas para el análisis de solapamiento de expresión diferencial DE.....	27
Figura 6. Resumen de los resultados de chequeo de calidad por Agilent del ARN extraído de todas las muestras posteriormente secuenciadas por mRNA-Seq.....	30
Figura 7. Análisis de la expresión de los genes <i>sall</i> en las muestras de ARN por PCR y qPCR.....	31
Figura 8. Agrupamiento jerárquico (heatmap) de los 2534 genes con expresión diferencial ($p < 0.001$) en al menos una de las comparaciones entre genotipos y estadios secuenciados por mRNA-Seq.....	34
Figura 9. Análisis comparativo del transcriptoma mutante <i>sall</i> en los estadios correspondientes a ND (16) y reversión (17).....	34
Figura 10. Resultados del análisis DE durante la transición de estadio embrionario 16 a 17.....	37
Figura 11. Validación de los resultados de la secuenciación mRNA-Seq.....	38
Figura 12. Análisis de potenciales sitios de unión al factor de transcripción Sall dentro de los promotores de los genes <i>dro5</i> e <i>IM3</i>	39
Figura 13. Comparación de nuestros resultados con los datos del proyecto modENCODE.....	40
Figura 14. Clasificación en categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en los embriones mutantes <i>sall</i> Ho respecto a los WT en los estadios de ND (16) y reversión (17) y en los embriones Ho en el estadio de reversión respecto al de ND.....	45

Figura 15. Clasificación en categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en las comparaciones genotípicas entre mutantes <i>sall</i> Ho y He en los estadios 16 y 17 y entre embriones WT en ambos estadios.....	46
Figura 16. Patrón de transcripción característico de los estadios de ND y NP.....	47
Figura 17. Efecto de dosis de <i>sall</i> en la regulación génica.....	54
Figura 18. Morgan investigó la transmisión cromosómica de la herencia a partir del descubrimiento de una mosca con ojos blancos en 1910.....	59
Figura 19. Función del gen <i>w</i> en la síntesis de los neurotransmisores serotonina y DA.....	60
Figura 20. Estructura del ojo compuesto de <i>Drosophila</i>	61
Figura 21. Distribución de los fotoreceptores en un omatidio del ojo compuesto de <i>Drosophila</i>	62
Figura 22. La extraordinaria regularidad de la estructura del ojo de <i>Drosophila</i> favorece su uso como modelo para el estudio de procesos degenerativos.....	63
Figura 23. ERGs del ojo compuesto de <i>Drosophila</i>	64
Figura 24. Ensayos de locomoción (climbing) en <i>Drosophila</i> para detectar mutantes de ND.....	65
Figura 25. Ensayos de largo de vida en <i>Drosophila</i> para detectar mutantes de ND.....	66
Figura 26. Los mutantes w^{1118} de <i>Drosophila melanogaster</i> presentan degeneración retinal progresiva.....	77-80
Figura 27. Los mutantes w^{1118} presentan un ERG atípico.....	81
Figura 28. Los mutantes w^{1118} muestran una tendencia a niveles reducidos de DA.....	83
Figura 29. Los mutantes w^{1118} muestran un deterioro progresivo de la locomoción.....	84
Figura 30. Los mutantes w^{1118} viven menos que las moscas w^+ y son menos tolerantes al estrés.....	85-87
Figura 31. La expresión del transgen <i>mini-white</i> ⁺ en los mutantes w^{1118} rescata el fenotipo de degeneración retinal.....	89
Figura 32. Esquema que resume los principales resultados del Capítulo I a partir de los cuales se plantearon la hipótesis y objetivos del Capítulo III.....	96

Figura 33. Vías metabólicas en las que están implicados los tres genes candidatos <i>ACC</i> , <i>CG10932</i> y <i>CG4586</i>	98
Figura 34. Silenciamiento y sobre-expresión de genes candidatos para los ensayos de validación <i>in vivo</i>	114
Figura 35. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 1.....	117
Figura 36. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 2.....	117
Figura 37. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 3.....	118
Figura 38. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 4.....	119
Figura 39. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 5.....	119
Figura 40. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 6.....	120
Figura 41. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 7.....	121
Figura 42. Análisis mediante el programa STRING de posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los 47 genes candidatos seleccionados.....	123
Figura 43. Análisis mediante el programa STITCH de posibles interacciones entre las proteínas codificadas por estos 47 genes y grupos químicos.....	124
Figura 44. Análisis de interacción STRING y STITCH de los 10 genes de <i>Drosophila</i> seleccionados como candidatos a neuroprotectores para su validación.....	126
Figura 45. Resumen de la comparación entre los perfiles de expresión obtenidos mediante mRNA-Seq y los obtenidos mediante qPCRs.....	128
Figura 46. Expresión de los genes candidatos a neuroprotectores obtenidos mediante qPCRs a partir de cerebros WT de adultos de <i>Drosophila</i>	129
Figura 47. Resumen de resultados de las hibridaciones <i>in situ</i> en cerebros de larvas L3 WT con las ribosondas sentido (S) y antisentido (AS) para los genes candidatos.....	130
Figura 48. Resumen de resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento y sobre-expresión del gen <i>ACC</i>	133
Figura 49. Resumen de resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento y sobre-expresión del gen <i>CG10932</i>	135
Figura 50. Resumen de los resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento del gen <i>CG4586</i>	137

Figura 51. Resumen de resultados de los ensayos de climbing para el silenciamiento y sobre-expresión del gen <i>ACC</i>	139
Figura 52. Resumen de resultados de los ensayos de climbing para el silenciamiento y sobre-expresión del gen <i>CG10932</i>	141
Figura 53. Resultados de funciones moleculares sobre-representadas en nuestra lista de candidatos original, obtenidos por el análisis de enriquecimiento por GOrilla.....	143
Figura 54. Resumen del lugar que ocupan las enzimas codificadas por los genes candidatos a neuroprotectores <i>ACC</i> y <i>CG10932</i> en el metabolismo del acetil-CoA y los lípidos (AG).....	154

TABLAS

Tabla 1. Oligonucleotidos empleados para el análisis por PCR y qPCR.....	25
Tabla 2. Cuantificación por Nanodrop del ARN total extraído de todas las muestras posteriormente secuenciadas por mRNA-Seq.....	29
Tabla 3. Parámetros de secuenciación de las réplicas biológicas de los genotipos estudiados.....	32
Tabla 4. Número de genes expresados diferencialmente de manera significativa en los mutantes Ho16 y He16 respecto a los WT16.....	35
Tabla 5. Número de genes expresados diferencialmente de manera significativa en los mutantes Ho17 y He17 respecto a los WT17.....	36
Tabla 6. Oligonucleotidos empleados para el análisis por qPCR de genes candidatos.....	106
Tabla 7. Clones EST de <i>Drosophila</i> empleados para generar las sondas de los genes candidatos.....	107
Tabla 8. Linearización de plásmidos para construir las sondas de <i>in situ</i> de los genes candidatos.....	110
Tabla 9. Construcción mediante PCR de las sondas de <i>in situ</i> de los genes candidatos.....	111
Tabla 10. Identidad de los 47 genes de <i>Drosophila</i> candidatos a neuroprotectores...	121
Tabla 11. Identidad de los 10 genes candidatos seleccionados para su validación.....	125
Tabla 12. Resumen de resultados de largo de vida y climbing de <i>ACC</i> , <i>CG10932</i> y <i>CG4586</i>	150

RESUMEN GENERAL

Las enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer y Parkinson, son patologías progresivas e irreversibles que afectan al sistema nervioso de los individuos que las padecen. Se desencadenan principalmente en personas de edad avanzada que representan una gran proporción de la población mundial. Ésta aumenta anualmente de manera exponencial, entre otros factores, debido al aumento en la expectativa de vida. Es por ello que existe gran interés en comprender y caracterizar estas enfermedades, describiendo los mecanismos biológicos que las desencadenan y mantienen, con el fin de prevenirlas o incluso eventualmente revertirlas.

Existe una gran conservación evolutiva de los mecanismos moleculares y celulares básicos para el desarrollo, mantenimiento y función del sistema nervioso, tanto en condiciones normales como patológicas. De hecho, muchas enfermedades neurodegenerativas surgen por mutaciones en genes que presentan homólogos en otras especies, lo que ha permitido el empleo exitoso de diversos modelos biológicos para el estudio de estas enfermedades. Uno de estos modelos por excelencia, es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la cual ha permitido, por ejemplo, dilucidar mecanismos cruciales que intervienen en la enfermedad de Parkinson en humanos.

En esta tesis de Doctorado buscamos definir una potencial función neuroprotectora de genes de *Drosophila* conservados en humanos, seleccionados a partir del análisis transcriptómico de un caso excepcional de neurodegeneración reversible, descrito previamente por Cantera y colaboradores (2002) en mutantes de *Drosophila* nulos para los genes del complejo *spalt-like* (*sall*).

Los genes *sall* se encuentran conservados en humanos y *Drosophila*, al igual que en otras especies animales modelo en biología. Codifican para factores de transcripción que se expresan en diversos tejidos como el sistema nervioso central y controlan la expresión de varios genes diana. En *Drosophila*, las mutaciones de falta de función de los genes *sall* producen una severa patología neurodegenerativa en el estadio 16 de desarrollo embrionario (Cantera *et al.*, 2002). Estos autores observaron con sorpresa que, si bien la falta de función en los genes *sall* conllevaba a la muerte de los individuos hacia el final de la etapa embrionaria, el fenotipo neurodegenerativo

observado en estadio 16 mostraba signos de mejorar o “revertir” transitoriamente en el siguiente estadio embrionario 17.

Basados en estos antecedentes, en esta tesis de Doctorado, nos planteamos la hipótesis general de que la reversión de neurodegeneración en mutantes nulos *sall* de *Drosophila* estaría mediada por una reorganización del transcriptoma cuyo estudio nos permitiría identificar genes asociados a neuroprotección.

En la primera etapa de esta tesis (Capítulo I), por medio de secuenciación masiva mRNA-Seq, comparamos la expresión génica de embriones de *Drosophila* normales (WT) y mutantes nulos *sall* y definimos el perfil de expresión de los estadios de neurodegeneración y reversión previamente descritos por Cantera *et al.* 2002. El estadio de neurodegeneración se caracterizó por la expresión significativa de varios genes previamente asociados empíricamente a neurodegeneración. También encontramos expresión diferencial de genes previamente asociados a otras funciones biológicas relacionadas con procesos neurodegenerativos, como Redox, Largo de vida/Envejecimiento y Enfermedades mitocondriales. El estadio de reversión de neurodegeneración se caracterizó por la expresión significativa de varios genes previamente asociados empíricamente a neuroprotección. En este estadio también encontramos expresión diferencial de genes asociados a otras funciones biológicas como Respuesta inmune y Estrés salino. Con este estudio definimos una lista de 633 genes a los cuales les adjudicamos alta probabilidad de participar en funciones neuroprotectoras, debido al enriquecimiento de esta lista en genes ya asociados a neurodegeneración y neuroprotección. Estos resultados fueron publicados en Ferreiro *et al.*, 2012. El trabajo presentado en este capítulo también dió origen a una segunda publicación de la que soy co-autora y que decidí no incluir en esta tesis, para no volverla demasiado extensa (Cantera *et al.*, 2014).

El estudio de los cambios transcriptómicos del mutante *sall* reveló que uno de los genes regulados diferencialmente en las etapas de neurodegeneración y neuroprotección es el gen *white* (*w*). Si bien este gen no parece tener homólogos en humanos, su mutante nulo es ampliamente usado por la comunidad científica para la construcción y selección de la mayoría de las cepas transgénicas de *Drosophila*, muchas de las cuales son frecuentemente empleadas para estudiar

neurodegeneración. Este importante hallazgo ameritó por tanto un conjunto de experimentos (Capítulo II). En este capítulo, empleando diversos métodos, demostramos por primera vez que las moscas mutantes nulas para el gen *w* sufren neurodegeneración, manifestada como degeneración histológica y malfuncionamiento retinal, acompañada de una deficiencia locomotora progresiva, acortamiento del largo de vida, menor resistencia a diversas formas de estrés y una tendencia a menores niveles de dopamina (DA). Estos resultados fueron publicados en Ferreiro *et al.*, 2018.

Finalmente, dado el enriquecimiento en genes empíricamente asociados a neurodegeneración y/o neuroprotección presentes en la lista de genes regulados diferencialmente en los mutantes *sall* respecto a los WT (Capítulo I), planteamos la hipótesis de que existe en dicha lista un enriquecimiento en genes con función neuroprotectora aún no conocida, denominados "genes candidatos a neuroprotección". Esta hipótesis fue investigada en la tercera etapa de esta tesis (Capítulo III). Para acotar nuestro estudio al tiempo disponible, aplicamos una serie de "filtros" conceptuales, para reducir el número de genes candidatos a neuroprotectores a estudiar inicialmente. Luego validamos mediante qPCR la expresión de 10 candidatos en embriones y cerebros adultos de *Drosophila* y confirmamos su expresión en el sistema nervioso de larvas por hibridación *in situ*. La neurodegeneración se asocia a una reducción del largo de vida y usualmente afectan la movilidad de los individuos que las padecen. Por ello, para validar *in vivo* una potencial función neuroprotectora de nuestros genes candidatos realizamos ensayos de largo de vida y locomoción. Elegimos 3 de entre estos 10 genes los cuales comparten la característica de codificar para proteínas de la vía de acetil-coenzima A (CoA): el gen *ACC* que codifica la Acetil-CoA carboxilasa, el gen *CG4586* que codifica la Acetil-CoA oxidasa y el gen *CG10932* que codifica la Acetil-CoA acetiltransferasa. Previo a los ensayos, construimos mediante diversos cruces, moscas transgénicas con silenciamiento o sobre-expresión de estos genes en neuronas o en la glía, y de sobre-expresión en un contexto genómico de neurodegeneración causado por la mutación en *parkin* (gen homólogo al gen *PARK2* humano asociado a Parkinson). Los ensayos de largo de vida y de climbing permiten postular la existencia de un proceso neurodegenerativo cuando se registra reducción de la supervivencia y de la movilidad, o un efecto neuroprotector del gen candidato

cuando su silenciamiento o su sobre-expresión en mutantes *parkin*, resulta en aumento de la supervivencia y mejoría de la movilidad. Nuestros resultados de estos ensayos indicaron una potencial función neuroprotectora de *ACC*, *CG10932* y *CG4586*. Su rol neuroprotector será confirmado en un futuro por métodos histológicos.

La gran homología entre los genes de *Drosophila* y humanos, y la conservación de mecanismos moleculares y funciones biológicas, abre la interesante posibilidad de postular una función neuroprotectora para estos genes también en humanos.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Enfermedades neurodegenerativas

Desde el punto de vista etimológico, el término "neurodegeneración" (abreviado como ND en esta tesis) incluye un prefijo "neuro-" que refiere a las células del tejido nervioso (neuronas y glía) y el término "degeneración" que referido a tejidos implica el proceso de pérdida de estructura y función, por lo que en sentido estricto refiere a cualquier condición patológica que afecte al tejido nervioso (Przedborski *et al.*, 2003). En sentido práctico, hablar de ND implica hablar de las enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías del sistema nervioso (SN) que presentan gran heterogeneidad de patrones clínicos, afectando generalmente sub-poblaciones específicas de neuronas (Przedborski *et al.*, 2003; Bertram & Tanzi, 2005). A pesar de esta heterogeneidad, comparten diversos mecanismos moleculares y celulares de aparición y mantenimiento, además del hecho de ser progresivas e irreversibles. Representan un gran problema para la salud humana, afectando negativamente a un elevado porcentaje de las personas de más de 70 años a nivel personal, familiar y socio-económico. En Estados Unidos, por ejemplo, 5 millones de personas sufren de Alzheimer (AD); 1 millón de Parkinson (PD); 400.000 de Esclerosis Múltiple (MS); 30.000 de Esclerosis Amiotrófica Lateral (ALS), y 3.000 de la enfermedad de Huntington (HD) (revisado en Agrawal & Biswas, 2015). Pese a los esfuerzos para desarrollar tratamientos efectivos para prevenir y combatir estas enfermedades, no existe todavía ninguna cura ni terapia completamente satisfactoria (revisado en Tan *et al.*, 2015; Wiendl *et al.*, 2015). Se vuelve entonces crucial, lograr una mejor comprensión y caracterización de estas enfermedades y una descripción de los mecanismos biológicos que las desencadenan y mantienen, así como también explorar nuevos mecanismos de neuroprotección (abreviado como NP en esta tesis) – definida ésta, en contrapartida con la ND, como la preservación de la estructura y/o función neuronal.

Las enfermedades neurodegenerativas son frecuentemente de origen multifactorial (revisado en Gascon & Gao, 2012; Tan *et al.*, 2015). De acuerdo a

Ramanan y Saykin (2013), los principales factores biológicos que inciden en los procesos de ND se pueden dividir en cuatro grandes tipos: 1) mecanismos intracelulares, 2) ambiente tisular local, 3) ambiente sistémico y 4) neurodesarrollo y envejecimiento biológico. Dentro de los mecanismos intracelulares se incluyen alteraciones en la apoptosis (Bredesen *et al.*, 2006), en la autofagia de componentes celulares sobrantes o defectuosos (Tong *et al.*, 2010), en el sistema ubiquitina-proteosoma de degradación de proteínas (Kraft *et al.*, 2010) y en las mitocondrias, promoviendo estrés oxidativo y daño en el ADN (De Strooper & Scorrano, 2012). Dentro del factor ambiente tisular local se incluyen alteraciones en la adhesión celular (Horwitz, 2012), la endocitosis (Zhang, 2008) y los neurotransmisores (Edwards, 1993). El factor ambiente sistémico incluye alteraciones en las vías inmunológicas (Swardfager *et al.*, 2010) y en factores lipídicos, metabólicos y endocrinos que afectarían la señalización sináptica y la plasticidad neuronal (Anchisi *et al.*, 2013). Finalmente, los factores de neurodesarrollo y envejecimiento biológico que incidirían en procesos de ND incluyen alteraciones en los factores neurotróficos (Chowdary *et al.*, 2012), en el largo telomérico de las células somáticas (Calado & Young, 2009) y en los mecanismos epigenéticos que modifican la expresión del ADN (Gräff *et al.*, 2012). Las enfermedades neurodegenerativas pueden desencadenarse, mantenerse y evolucionar por fallos en uno o varios de estos mecanismos biológicos, siendo, por tanto, procesos muy complejos.

Muchas enfermedades neurodegenerativas pueden desencadenarse por mutaciones en genes que se expresan normalmente en el SN bajo estrictos controles espaciales, temporales y cuantitativos para preservar la integridad del tejido (revisado en Hirth, 2010). La mutación en un mismo gen puede desencadenar diferentes enfermedades neurodegenerativas, como es el caso del gen de *α-synucleina* (*SNCA*) asociado tanto a AD como a PD (Miller & O'Callaghan, 2015). Adicionalmente, mutaciones en determinados genes caracterizan a una enfermedad neurodegenerativa en particular. Por ejemplo, el PD puede heredarse de manera mendeliana en forma autosómica dominante o recesiva, por mutaciones en los genes de *SNCA*; *kinasa2 rica en repetidos leucina* (*LRRK2*); *parkin* (*PARK2*), *hidrolasa L1 ubiquitin carboxi-terminal* (*UCH-L1*); *Kinasa1 inducida por PTEN* (*PINK1*) y el oncogen *DJ1* (Grasso *et al.*, 2014).

Muchos de estos genes humanos se encuentran evolutivamente conservados en diversas especies, lo que ha permitido el empleo exitoso de diversos modelos biológicos para el estudio de estas enfermedades.

Pese a no contar actualmente con tratamientos efectivos para prevenir y combatir a las enfermedades neurodegenerativas, el mejor conocimiento de los procesos de ND y NP ha permitido realizar ciertos avances. Hasta ahora se han identificado unos pocos factores endógenos de transcripción, de crecimiento y antioxidantes que pueden contribuir a la NP (revisado en Antonelli *et al.*, 2012; Wiendl *et al.*, 2015). También cada vez son más los ensayos que intentan probar un efecto neuroprotector de factores exógenos, principalmente compuestos de origen vegetal. La mayoría de los avances surgen del estudio post-mortem de cerebros humanos pero fundamentalmente del empleo de modelos animales (revisado en Tan *et al.*, 2015). Uno de los modelos biológicos por excelencia, utilizado ampliamente para estudios de ND y NP y elegido para llevar a cabo esta tesis de Doctorado, es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

2. *Drosophila melanogaster*: un excelente modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas

Drosophila melanogaster, cuyo significado literal es "amante del rocío de vientre negro", es más conocida como la mosca de la fruta o del vinagre (Meigen, 1830). Presenta un ciclo de vida con cuatro estadios identificables: embrión, larva (3 subestadios), pupa y adulto (**Figura 1**) (revisado en Ashburner & Thompson, 1978). La duración del ciclo de vida depende de la temperatura y es de unos 10 días a temperatura ambiente de 25⁰C. Los adultos pueden llegar a vivir en condiciones normales de laboratorio unos 120 días (3 meses) y la hembra pone cientos de huevos (revisado en Sang, 2001).

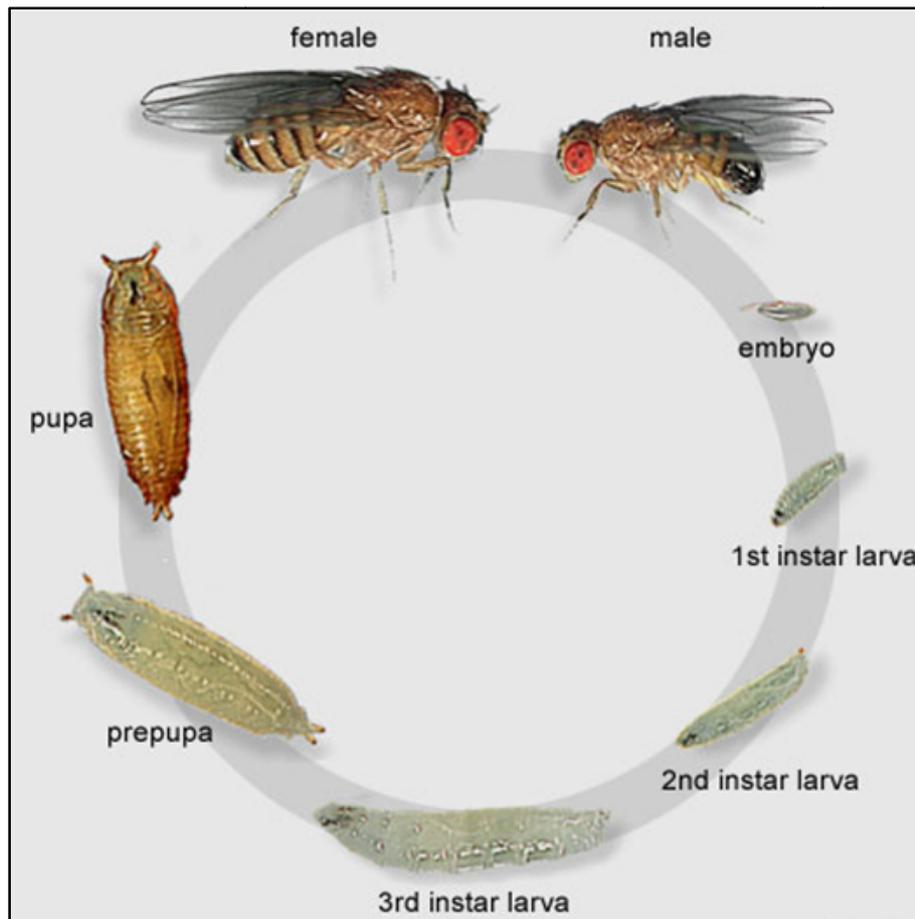


Figura 1. Ciclo de vida de *D. melanogaster*. Se observa un individuo adulto de cada sexo, hembra (female) y macho (male); el huevo (embryo); los tres estadios larvales (1st, 2nd y 3rd instar larva); el estadio de prepupa y el estadio de pupa (FLYMOVE: <http://flymove.uni-muenster.de/>).

El desarrollo embrionario se completa aproximadamente 24 hs después de que el huevo es fertilizado. Más tarde emerge una larva de primer estadio que se alimenta y posteriormente muda a una larva de segundo estadio y esta finalmente muda a una larva de tercer estadio (**Figura 1**). La larva es un gusano que reptaba en la comida, donde se desarrolla rápidamente. Hacia el final del tercer estadio deja de alimentarse, abandona la comida y busca activamente un sitio donde transformarse en pupa (**Figura 1**), el estadio sésil en el cual los tejidos y órganos de la larva son transformados en los del adulto. Éste emergerá del pupario a los pocos días, una vez completada la metamorfosis.

Drosophila es uno de los organismos modelo por excelencia en la biología debido a sus muchas ventajas con respecto a otros animales de laboratorio, como su bajo coste de mantenimiento, un ciclo de vida muy corto y la gran conservación

evolutiva de los mecanismos biológicos básicos (revisado en Pierce, 2004). El 75% de los genes humanos asociados a diversas enfermedades humanas tienen genes homólogos en *D. melanogaster* (Reiter *et al.*, 2001). Otra de sus principales ventajas es el gran conocimiento que tenemos de su genética. Su genoma está compuesto por unos 15000 genes y su anotación es revisada y actualizada regularmente ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/term= drosophilamelanogaster](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/term=drosophilamelanogaster)). Además, existen muchas bases de datos de *Drosophila* en la web de libre acceso que reúnen toda la información actualizada acerca de genes, proteínas, interacciones, ontología, tejidos, expresión, entre otras (ej: <http://www.flymine.org/>; <http://www.fruitfly.org/>; <http://fly-fish.cabr.utoronto.ca/>; <http://www.droidb.org/>). Esto combinado con propiedades específicas y muy ventajosas de su genética (ej. cromosomas balanceadores) facilita el análisis de genes normales o mutados y el diseño de complejos cruces genéticos que no pueden desarrollarse aún en otros animales modelo.

Gracias a estas ventajas, *Drosophila* es el organismo multicelular que permite la más sofisticada manipulación genética para dirigir específica, temporal y espacialmente la expresión génica y construir moscas transgénicas que expresen, por ejemplo, genes humanos mutados asociados a enfermedades (FLYBASE: <http://flybase.org/>). Es en general sencillo y barato generar moscas transgénicas que porten secuencias de ADN que activen, sobre-expresen o inhiban la expresión de genes individuales de interés, principalmente mediante el sistema GAL4-UAS (Brand & Perrimon, 1993). Se puede reducir la expresión de un gen expresando ARN de doble hebra complementario a su secuencia génica (ARN de interferencia o ARNi). El banco de cepas "Vienna *Drosophila* Resource Center" (VDCR: <https://stockcenter.vdrc.at/control>) posee más de 22000 líneas ARNi para inhibir la expresión de cerca del 90 % de sus genes. Toda esta tecnología ha permitido estudiar en *Drosophila* el rol de genes individuales en diversos procesos biológicos y luego aplicar ese conocimiento a otros modelos animales y a humanos.

Estas y otras ventajas contribuyeron a que *Drosophila* realizara notables aportes a la ciencia, merecedores por ejemplo de seis Premios Nobel de Fisiología o Medicina en 1933, 1946, 1955, 1995, 2011 y 2017 por sus contribuciones

fundamentales a la teoría cromosómica de la herencia, a la inducción de mutaciones por medio de rayos X, a la comprensión de que los genes dirigen el desarrollo temprano del embrión, a la activación de la inmunidad innata y a la descripción de los mecanismos moleculares que controlan los ritmos circadianos (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/).

El SN de *Drosophila* si bien es distinto al de humanos, comparte muchos aspectos básicos (**Figura 2**). Se subdivide en el Sistema Nervioso Central (SNC), compuesto por el cerebro y la cadena ventral; y el Sistema Nervioso Periférico (SNP), compuesto por los ganglios y nervios periféricos. El desarrollo del SN se inicia en el embrión temprano y continúa en la larva y el adulto. El cerebro presenta distintos tipos neuronales (ej. neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas, colinérgicas) y varios tipos de glía. Presenta centros de procesamiento de la información visual, olfativa, de control de ritmos circadianos, aprendizaje, memoria, etc. Existen diversas bases de datos de libre acceso en la web que reúnen información completa acerca del SN de *Drosophila* (ej: http://www.virtualflybrain.org/site/vfb_site/home.htm; <http://flybrain-ndb.iam.u-tokyo.ac.jp/>; <http://fruitfly.inf.ed.ac.uk/braintrap/>; <http://www.flycircuit.tw/>; <http://www.janelia.org/project-team/flylight>).

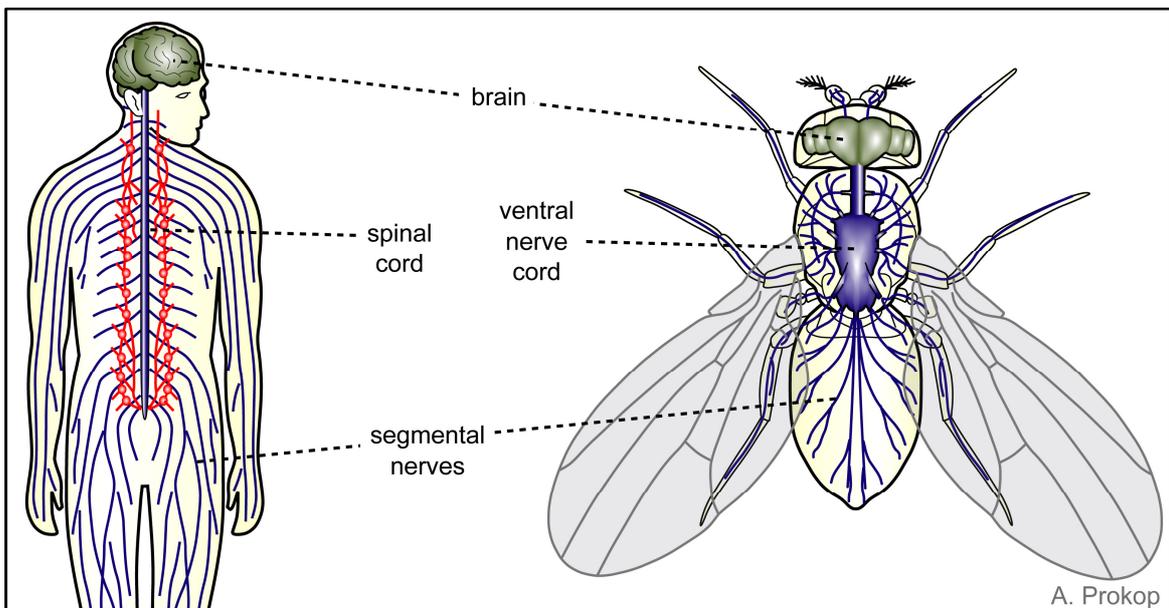


Figura 2. Sistema nervioso de *Drosophila*. Comparación entre las estructuras principales del sistema nervioso entre *Drosophila* y humanos. Se observa el cerebro (brain) en la cabeza al igual que en humanos, la cadena nerviosa ventral (ventral nerve cord) en el tronco análoga a la espina dorsal (spinal cord) de humanos y los principales

nervios segmentales (segmental nerves) al igual que en humanos. (<https://droso4schools.wordpress.com/organs>).

El estudio de procesos neurodegenerativos en el SN de *Drosophila* ha contribuido a nuestro conocimiento sobre procesos similares en seres humanos. Por ejemplo, se identificaron genes que potencian o suprimen la ND producida por proteínas tóxicas (Jaiswal *et al.*, 2012), la degeneración retinal (Bonini & Fortini, 2003; Lenz *et al.*, 2013) o factores cruciales en el establecimiento de enfermedades como AD, PD y HD (ej. Rincon-Limas *et al.*, 2012; Choksi *et al.*, 2013). Un ejemplo destacado del aporte de *Drosophila* al estudio de enfermedades neurodegenerativas es el descubrimiento que los genes *parkin* y *pink*, homólogos a los genes humanos *PARK2* y *PARK6*, que codifican para la ubiquitina-ligasa E3 citoplasmática y la serina/treonina-quinasa mitocondrial, respectivamente, están vinculados a PD (ej. Greene *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2006).

Si bien *Drosophila* es un buen modelo para el estudio del SN, no es posible estudiar todos los síntomas y detalles asociados a una patología humana, ya que ambas especies difieren en muchos aspectos fisiológicos. Algunas limitaciones del modelo incluirían los denominados "desórdenes o trastornos funcionales" como la distonía, el temblor esencial, trastornos del espectro autista, depresión y esquizofrenia, cuya manifestación depende de propiedades del cerebro de vertebrados superiores (revisado en Shulman *et al.*, 2015). De todos modos, varios de los genes asociados a estos trastornos presentan homólogos en *Drosophila* y pueden manipularse para analizar los mecanismos que desencadenan estas patologías en humanos.

En resumen, *Drosophila* es un excelente modelo para el estudio de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas humanas, en gran parte debido a la conservación de los genes. Dentro de estos genes conservados relevantes para el correcto funcionamiento del SN se encuentran los genes *sall* que introduciré a continuación, por ser la base de nuestro "modelo de ND reversible".

3. Los genes *spalt*-like

Los genes *sall* se expresan tempranamente durante el desarrollo embrionario en el SN y en otros tejidos de *Drosophila* y de vertebrados incluyendo los humanos. Codifican factores de transcripción del tipo de dedos de zinc que reprimen o activan diversos genes relevantes para varios procesos biológicos, entre ellos, el mantenimiento del tejido nervioso (revisado en de Celis & Barrio, 2009; Organista & de Celis, 2012).

Drosophila presenta dos genes *sall*: *spalt major (salm)* y *spalt-related (salr)* (Kuhnlein *et al.*, 1994; Barrio *et al.*, 1996). Ambas proteínas actúan mayormente como represores transcripcionales por interacción con complejos histona-desacetilasas (HDAC) o con la heterocromatina (Sanchez *et al.*, 2011). Entre otras funciones, *salm* y *salr* regulan la producción de proteínas de citoesqueleto y adhesión celular en el SNC (Milan *et al.*, 2001; Cantera *et al.*, 2002) y determinan el destino neuronal en el SNP (Elstob *et al.*, 2001; Rusten *et al.*, 2001).

En vertebrados existen cuatro genes homólogos a los genes *sall* de *Drosophila*, llamados *SALL1–4* (Holleman *et al.*, 1996; Kohlhase *et al.*, 1996; 1999; 2002). *SALL1* actúa como represor transcripcional que regula la proliferación celular (Kiefer *et al.*, 2002). *SALL2* actúa como activador transcripcional de genes como la ciclina CDK que interviene en la regulación del ciclo celular, cumpliendo funciones de supresión de varios tipos de tumores (Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). *SALL4* regula la proliferación, el crecimiento celular y la apoptosis, tanto en células madre normales como en células tumorales (revisado en Dirican & Akkiprik, 2016). Puede actuar como represor transcripcional o activador (Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

Las mutaciones de los genes *sall* causan patologías severas tanto en humanos como en *Drosophila*. En humanos, las mutaciones en *SALL1* se asocian al Síndrome de Townes Brocks (OMIM 107480, Kohlhase *et al.*, 1998) y las mutaciones en *SALL4* al Síndrome de Okihiro (OMIM 607323, Al-Baradie *et al.*, 2002; Kohlhase *et al.*, 2002), caracterizados por malformaciones en las extremidades y en riñones y por defectos en el SN que causan sordera sensori-neural, retardo mental y problemas motores (Cameron *et al.*, 1991; Ishikiriyama *et al.*, 1996). También en humanos, las mutaciones en *SALL2* producen una enfermedad congénita denominada “colomba ocular” que

genera ceguera en niños (Kelberman *et al.*, 2014). En ratones, las mutaciones nulas en *Sall3* generan pérdida total de neuronas dopaminérgicas y letalidad perinatal (Böhm, *et al.*, 2008; Harrison *et al.* 2008; Kawakami *et al.* 2009; Heng *et al.*, 2012).

En *Drosophila*, las mutaciones nulas de los genes *salm* y *salr* son letales embrionarias en homocigosis, afectando principalmente al SN (revisado en de Celis & Barrio, 2009). Si bien esta ND es letal, sorprendentemente revierte transitoriamente hacia el final del desarrollo embrionario (Cantera *et al.*, 2002). El extraordinario hallazgo de estos autores de un fenómeno que representaría un caso de ND reversible merece una sección aparte en esta introducción general, por ser la base y antecedente fundamental de nuestro modelo para la búsqueda de genes neuroprotectores y, por lo tanto, de esta tesis.

4. Mutantes *spalt* de *Drosophila*: un caso excepcional de neurodegeneración reversible

En 2002, Cantera y colaboradores descubrieron que las mutaciones con falta de función en los genes *sall* de *Drosophila*, causan un grave fenotipo degenerativo en el cerebro al comienzo del estadio embrionario 16 (13-16 horas de desarrollo) (Cantera *et al.*, 2002). Mediante microscopía electrónica de cerebros y ensayos de inmunohistoquímica en embriones mutantes homocigotos *sall* de estadio 16 (Ho16) y normales del mismo estadio (WT16), así como estudios *in vitro* de cultivos neuronales derivados de células madre de embriones mutantes, estos autores demostraron que el fenotipo neurodegenerativo observado en mutantes *sall* Ho16 se caracteriza por fragilidad del tejido nervioso, deficiencias en el citoesqueleto axonal, pérdida de adhesión celular, espacio extracelular hipertrofiado, vacuolización y proliferación de autofagosomas (comparar Ho16 vs WT16, **Figura 3**).

Sorprendentemente, el fenotipo neurodegenerativo desaparecía en pocas horas en el estadio embrionario 17 (16-18 horas de desarrollo) (Cantera *et al.*, 2002), tal como se observa al comparar las imágenes de microscopía electrónica de cerebros de embriones mutantes homocigotos *sall* de estadio 17 (Ho17) y normales del mismo estadio (WT17) en la **Figura 3**. Esto sugería por primera vez la posibilidad de revertir un

proceso de ND y la existencia de posibles mecanismos de NP activados en los mutantes *sall* homocigotos durante la transición del estadio 16 al 17 (Cantera *et al.*, 2002).

En base a estas observaciones, Cantera y colaboradores propusieron que la reversión parcial de la ND podía estar mediada por una redundancia genética entre los genes *sall* y otros genes expresados durante el desarrollo embrionario, que pudiera compensar parcialmente la ausencia de los genes *sall* mediante una reorganización del transcriptoma (Cantera *et al.*, 2002). Esta redundancia podría ser “coincidente” (genes que se expresan y cumplen una función similar a los genes *sall* en la misma etapa de desarrollo) o “secuencial” (genes que se expresan y cumplen una función similar a los genes *sall* en diferentes estadios del desarrollo).

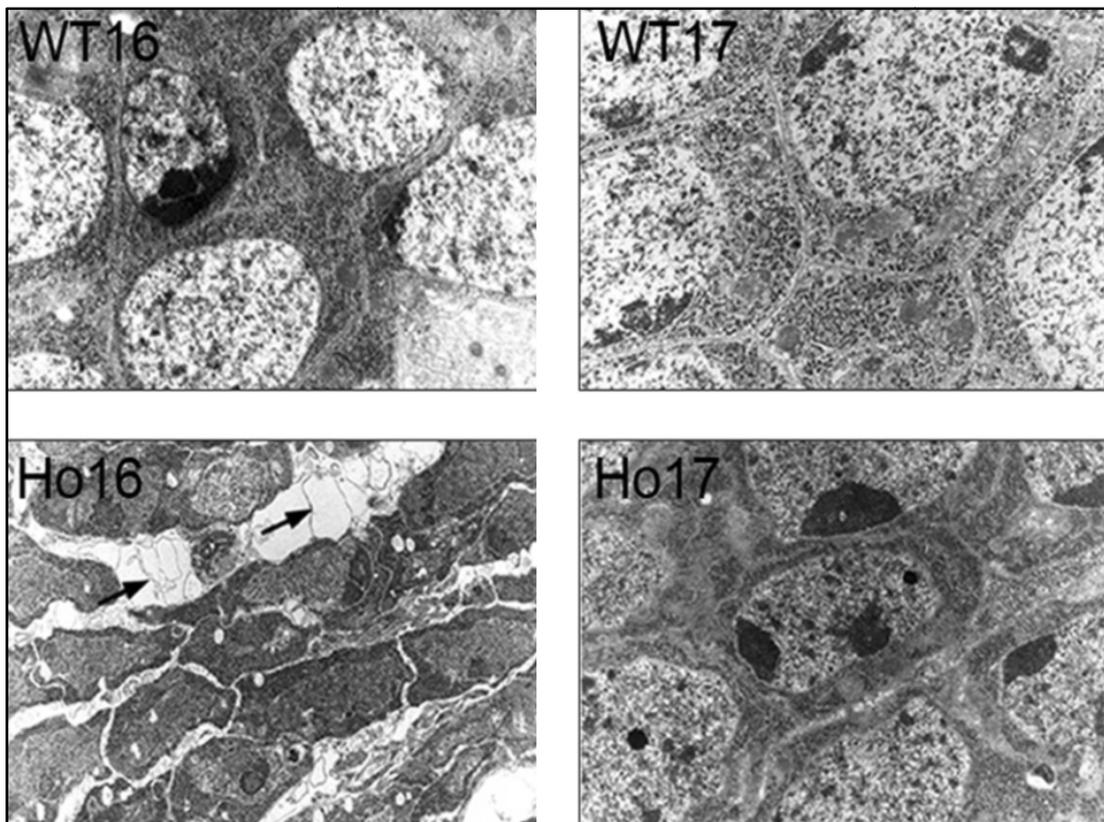


Figura 3. Microscopía electrónica de cerebros de embriones normales y mutantes nulos *sall* en los estadios de neurodegeneración y reversión. WT16: cerebro de embriones normales de estadio 16; WT17: cerebro de embriones normales de estadio 17; Ho16: cerebro de embriones mutantes homocigotos *sall* de estadio 16 mostrando claros indicios de ND (las flechas indican la presencia de vacuolas y espacio extracelular agrandado); Ho17: cerebro de embriones mutantes homocigotos *sall* de estadio 17 mostrando la reversión histológica del fenotipo de ND. Adaptado de Cantera *et al.*, 2002.

HIPÓTESIS GENERAL

La reversión del fenotipo neurodegenerativo observado en mutantes de *Drosophila* nulos para los genes *sall* se debe a una reorganización de su transcriptoma que incluye la regulación de genes que confieren NP. Estos genes podrían ser identificados mediante el análisis comparativo del transcriptoma de embriones de *Drosophila* normales y mutantes nulos *sall* en las etapas de ND y de reversión.

OBJETIVO GENERAL

Identificar genes con potencial neuroprotector usando como modelo un caso excepcional de ND reversible en la mosca *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mediante secuenciación mRNA-Seq, realizar el análisis comparativo del transcriptoma de embriones de *Drosophila* normales y mutantes nulos para los genes *sall* en las etapas de ND y de reversión identificadas por Cantera y colaboradores (2002).
2. Analizar si los mutantes de *Drosophila* con falta de función del gen *w* presentan ND.
3. Caracterizar la potencial función neuroprotectora de genes candidatos obtenidos a partir del análisis mRNA-Seq.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis de doctorado se subdividirá en tres capítulos que corresponden a los objetivos específicos anteriormente planteados:

- I. **Análisis transcriptómico de un proceso de neurodegeneración reversible**
- II. **Los mutantes del gen *white* de *Drosophila* presentan neurodegeneración**
- III. **Validación de genes candidatos a neuroprotección: la señalización por acetil-CoA**

CAPÍTULO I

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE UN PROCESO DE NEURODEGENERACIÓN REVERSIBLE



INTRODUCCIÓN CAPÍTULO I

En este primer capítulo, con el fin de identificar genes con potencial neuroprotector, realizamos un análisis comparativo del transcriptoma de embriones WT y mutantes nulos *sall* en las etapas de ND y de reversión descritas (Cantera *et al.*, 2002). Para ello, utilizamos el método de secuenciación masiva de alto rendimiento “mRNA high throughput sequencing” (mRNA-Seq) de *Illumina* (<http://www.illumina.com/>), que permite analizar las diversas variantes de ARN de un organismo, es decir su transcriptoma, con gran eficiencia y precisión (Marioni *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008). Presenta diversas ventajas frente a los análisis de expresión por microarrays (Brown & Botstein, 1999), ya que detecta transcritos desconocidos de cualquier especie y tipo sin necesidad de usar sondas específicas para un determinado ARN, presenta un bajo ruido de fondo, una mayor sensibilidad de detección y precisión de cuantificación (revisado en Chaitankar *et al.*, 2016).

El método mRNA-Seq de *Illumina* incluye varias etapas principales (revisado en Chaitankar *et al.*, 2016): 1) *extracción, purificación y fragmentación del ARN*; 2) *retrotranscripción del ARN a ADNc*; 3) *construcción de la librería de muestras* (fragmentos de ADNc de doble hebra flanqueados por adaptadores); 4) *generación de “clusters”* y 5) *secuenciación por síntesis (SBS)*. La generación de clusters implica la desnaturalización de las librerías, la hibridación al azar entre los adaptadores unidos al ADNc y oligonucleótidos presentes en la superficie de un soporte sólido, la síntesis repetida por “PCR puente” de las hebras complementarias a los ADN de hebra sencilla generando clusters de clones de ADN de doble hebra y la eliminación de las hebras reversas formando clusters de hebra simple. Para la SBS se agregan nucleótidos terminales reversibles que se van incorporando en cada ciclo al inicio de los clusters, marcados con fluorescencia específica para cada base A, T, G o C, emitiendo a distinta longitud de onda al ser excitados por un láser y dando señales de diferente color según la base incorporada. Estas señales son capturadas por la cámara de un microscopio confocal integrado en el equipo secuenciador. Cada fluoróforo y el terminador son eliminados tras la captura de la imagen, permitiendo la incorporación de la siguiente base y repitiendo el proceso hasta completar la lectura de toda la secuencia. Subsecuentemente, se procede al análisis primario de las lecturas, alineamiento y

mapeo de las lecturas con transcritos conocidos y con el genoma completo para identificar transcritos y cuantificarlos. Posteriormente, suelen aplicarse diversos análisis secundarios que emplean algoritmos como el RPKM/FPKM (“Reads/ Fragments Per Kilobase of the exon model per Million reads”) (Mortazavi *et al.*, 2008; Trapnell *et al.*, 2010) para expresar los niveles de transcritos. Luego se eliminan los transcritos de baja expresión (ej: <1 FPKM) y se normalizan los valores para realizar análisis posteriores como el análisis de Expresión Diferencial (DE) usado para identificar genes que se expresan diferencialmente entre grupos de muestras (ej. WT vs mutantes). Se obtienen así los valores relativizados de transcritos expresados en “fold changes” y se calcula su grado de significancia estadística.

En los últimos años, la mRNA-Seq se ha transformado en el método favorito para caracterizar transcriptomas normales o asociados a enfermedades en diversos organismos como *Drosophila* y humanos (revisado en Byron *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2016). El SN es uno de los sistemas biológicos más complejos. Analizarlo mediante esta técnica podría contribuir a comprender mejor su funcionamiento en condiciones normales o de ND, identificando por ejemplo genes con funciones importantes para el SN, como la de NP, tal como realizamos en esta tesis y presento a continuación en el apartado de Resultados de este Capítulo I.

HIPÓTESIS CAPÍTULO I

El grupo de genes regulados diferencialmente (sobre- o sub-expresados) en los embriones de *Drosophila* mutantes *sall* respecto a los embriones WT, durante el estadio donde se observó ND (estadio 16), estaría enriquecido en genes asociados a ND, mientras que el grupo de genes regulados diferencialmente durante el estadio donde se observó reversión de la ND (estadio 17), estaría enriquecido en genes de NP.

OBJETIVO GENERAL CAPÍTULO I

Identificar genes significativamente sub o sobre-expresados en el mutante *sall* en las etapas de ND y de reversión mediante la comparación del transcriptoma de embriones WT con el de embriones mutantes *sall*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO I

1. Seleccionar embriones WT y mutantes *sall* (homocigotos y heterocigotos) en los estadios 16 y 17 para realizar extracciones de ARN.
2. Confirmar por PCR la falta de expresión de los genes *sall* en las muestras mutantes.
3. Realizar la secuenciación mRNA-Seq, anotar las secuencias, cuantificar los niveles de expresión y realizar el análisis de expresión diferencial (DE).
4. Realizar el análisis de enriquecimiento funcional (GO, Gene Ontology) y otros análisis bioinformáticos.
5. Validar los resultados del análisis DE por qPCR de genes seleccionados.

METODOLOGÍA CAPÍTULO I

1. Selección de embriones y extracción de ARN

Las muestras de ARN para la secuenciación por *Illumina* fueron obtenidas a partir de embriones de *Drosophila*, WT o mutantes nulos para *sall* en heterocigosis (He) u homocigosis (Ho), recolectados en los estadios de desarrollo embrionario 16 (correspondiente al fenotipo de ND) y 17 (correspondiente a la reversión del fenotipo).

Los embriones provinieron de cepas de moscas mantenidas en medio de cultivo estándar a una temperatura de 25°C. Los embriones WT fueron obtenidos de la cepa silvestre *Oregon R*. Los embriones mutantes nulos *sall* Ho (*Df(2L)32FP-5/Df(2L)32FP-5*), que carecen de expresión de ambos genes *sall* debido a una deficiencia en el cromosoma 2 (Barrio *et al.*, 1999), fueron obtenidos de la cepa *Df(2L)32FP-5/CyO-GFP*. Esta cepa mantiene la mutación en heterocigosis ya que es letal embrionaria en homocigosis en etapas tardías de la embriogénesis. También permite identificar y seleccionar los embriones mutantes *sall* Ho ya que éstos no expresan GFP mientras que los He de esta cepa sí la expresan. Los embriones mutantes *sall* He (*Df(2L)32FP-5/+*) fueron obtenidos del cruce entre hembras *Df(2L)32FP-5/CyO-GFP* y machos mutantes *w* (*w*⁻) y seleccionados por ser también GFP negativos. La selección de ambos estadios de desarrollo embrionario, 16 temprano (13,5 hs de desarrollo del huevo a 25°C) y 17 temprano (18 hs de desarrollo a la misma temperatura) se basó en la morfología del intestino medio (**Figura 4**).

Un total de 500 embriones de cada genotipo y estadio fueron congelados en nitrógeno líquido, divididos en réplicas de 50 embriones/tubo y preservados en 20 µl de RNAlater (Ambion).

Se extrajo el ARN total de cada una de las muestras usando el kit “Cells to cDNA II” (Ambion). Las muestras de ARN resultantes de las extracciones fueron cuantificadas por Nanodrop (Thermo Scientific) y su calidad fue chequeada con el “Agilent 2100 Bioanalyzer” (Agilent).

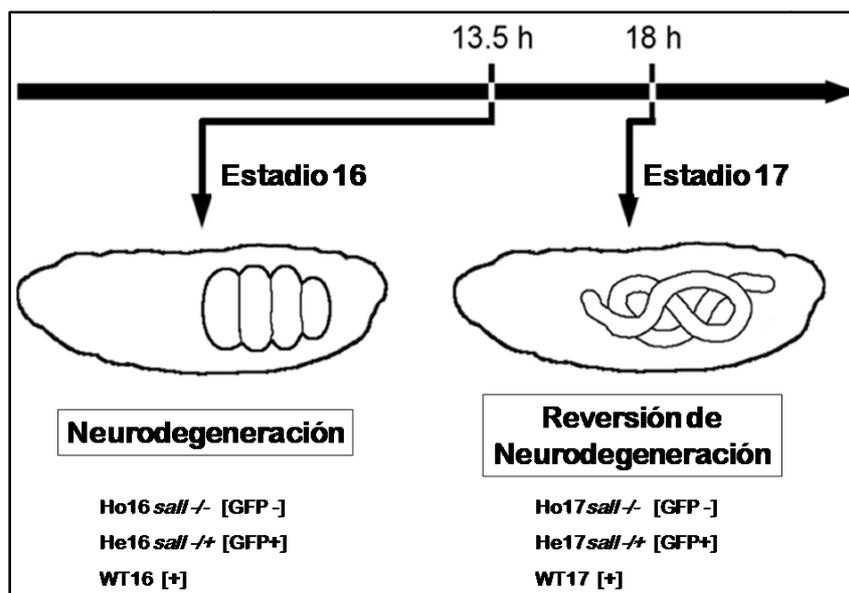


Figura 4. Selección de muestras de embriones para la extracción de ARN.

2. Validación de expresión por PCR y qPCR

Previo a la secuenciación se chequeó la expresión de *salm* y *salr* en las muestras obtenidas a partir de embriones WT y He *sall* de ambos estadios y se confirmó la falta de expresión de ambos genes en las muestras Ho *sall*. Para ello se realizaron PCRs convencionales y qPCRs de ADNc de todas las muestras, con varios juegos de primers específicos (**Tabla 1**) diseñados para ambos genes *sall* usando la herramienta “primer BLAST” disponible en el sitio web de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A fin de validar los datos de la secuenciación mediante otro método cuantitativo, se realizaron también qPCRs para 2 genes asociados al sistema inmune, *Drosomycin-like 5 (dro5)* e *Immune induced molecule 3 (IM3)*, previamente vinculados en la literatura a ND, que mostraron diferencias significativas en las muestras secuenciadas. La **Tabla 1** muestra los juegos de primers específicos empleados diseñados por “primer BLAST”.

Previo a todos los análisis de amplificación del ADNc, realizamos un tratamiento con DNasal en todas las muestras de ARN (2 µl de enzima a 37°C durante 15 minutos seguido de un paso de inactivación a 75°C durante 5 minutos). Luego hicimos una retrotranscripción de 2 µg de ARN de cada una de las muestras (100 µl de volumen de

reacción), empleando oligonucleótidos al azar y el kit “SuperScript III First-Strand Synthesis System” (Invitrogen).

Tabla 1. Oligonucleotidos empleados para el análisis por PCR y qPCR.

GEN			PRIMERS	
SÍMBOLO	NOMBRE	CG ID	FORWARD	REVERSE
<i>salm</i>	<i>spalt major</i>	CG6464	5'-CACCACCGTCACAGCCACATG-3'	5'-CGAGTTATCGTTGCTGTGCCG-3'
<i>dro5</i>	<i>drosomycin-5</i>	CG10812	5'-GCCAAGGAAGCCGATGCCGA-3'	5'-ACGCGCCTTGAAGGATGGCC-3'
<i>IM3</i>	<i>Immune induced molecule 3</i>	CG16844	5'-CTGGCTCTGGCCAACGGTGA-3'	5'-CCGCTGCCCTTAGGCCCTCA-3'
<i>Rpl32</i>	<i>Ribosomal protein L32</i>	CG7939	5'-CCTTCCAGCTCAAGATGACCATCC-3'	5'-ATCCGTAACCGATGTTGGGCATCAG-3'

Las qPCRs se realizaron en un termociclador CFX (BioRad) empleando el “master mix EvaGreen” (Biotium) y el “mix mi-Hot Taq” (Metabion), en un volumen total de 20 µl por reacción (20 ng de ADNc, 1x mi-Hot Taq mix, 1x Eva Green mix, 0.1 µM de cada primer Forward y Reverse).

Las condiciones para los pasos de desnaturalización, alineamiento y extensión de las PCRs y qPCRs fueron los siguientes: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto, y una extensión final de 1 minuto a 95°C. Se construyó una curva de fusión desde 60 a 95°C, con incrementos de temperatura de 0.5°C cada 5 segundos. La amplificación del gen *Ribosomal protein L32 (Rpl32)* se empleó como control. Todas las reacciones fueron chequeadas en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Para las qPCRs se realizaron los cálculos de Ct ("threshold cycle") de cada uno de los genes amplificados (genes *sall*, los 2 genes seleccionados del sistema inmune y el gen *Rpl32*) correspondientes a cada muestra (WT16, Ho16, He16, WT17, Ho17, He17). El valor de Ct representa la intersección entre la curva de amplificación de un gen en la muestra y la línea umbral de amplificación y es por tanto una medida relativa de la concentración de ADN del gen estudiado en la reacción PCR. Una vez obtenidos los Ct, se calcularon los ΔvgCt , es decir, los promedios de Ct entre las réplicas biológicas y técnicas de cada muestra amplificada con los juegos específicos para cada gen. También se calculó para cada muestra el dCt, que es la diferencia entre el ΔvgCt

de una muestra para la amplificación de un gen de interés (ej. *sall*) y el ΔvgCt de la misma muestra para la amplificación del gen control *RpL32*. Posteriormente se calculó el ddCt de cada gen en cada muestra relativo a la muestra WT16 (resta del dCt de WT16 al dCt de la muestra para cada gen). Finalmente se calculó para cada muestra la magnitud del cambio de expresión (“Fold change”) de cada gen relativo al valor de WT16 (valor 1) y el porcentaje de expresión correspondiente.

3. Secuenciación mRNA-Seq, anotación de secuencias y análisis de expresión diferencial

La secuenciación mRNA-Seq fue realizada por el personal de la Plataforma de Análisis Genómico de CIC bioGUNE (Bizkaia, España) bajo la dirección de la Dra. Ana María Aransay. Se secuenciaron con un equipo Genome Analyzer II de *Illumina* los ADNc de dos o tres tubos independientes de muestras de embriones de cada genotipo y estadio seleccionados previamente (replicas biológicas y técnicas). Las librerías mRNA-Seq fueron construídas a partir de 1 μg de ARN total por muestra, siguiendo las instrucciones del kit “mRNA Sequencing Sample Preparation” (*Illumina*, <http://www.illumina.com/>). Resumidamente, de cada muestra se aisló ARNm poli-A mediante columnas magnéticas con oligos poli-dT; luego se realizó una fragmentación química al azar de todo el ARNm y se retrotranscribió a ADNc; se ligaron los adaptadores universales de secuenciación de *Illumina* a los extremos de los fragmentos y se amplificaron mediante PCR puente los fragmentos de librería ligados a los adaptadores. Se obtuvieron librerías de tamaños entre 200-250 pares de bases (conteniendo insertos de unos 80-120 pares de bases), que fueron posteriormente cuantificadas por qPCR, agrupadas y amplificadas entre 36-38 ciclos en los carriles del soporte sólido.

Las secuencias resultantes del análisis mRNA-Seq fueron depositadas en el “NCBI Sequence Read Archive” (SRA <http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=studies>) bajo el número de identificación ID:SRA048981.1 y en la base de datos GEO (“Gene Expression Omnibus”, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con el número de acceso GSE38664. Las lecturas se alinearon con el genoma de *Drosophila* (versión r5.22 de FlyBase) empleando el programa Bowtie (Langmead *et al.*, 2009)

eligiendo la opción “best alignment”. Luego fueron anotadas con el programa “R/Bioconductor Genomigator”, normalizadas por RPKMs (Mortazavi *et al.*, 2008) y analizadas para definir el perfil de DE con el programa DESeq (Anders & Huber, 2010) (Figura 5).

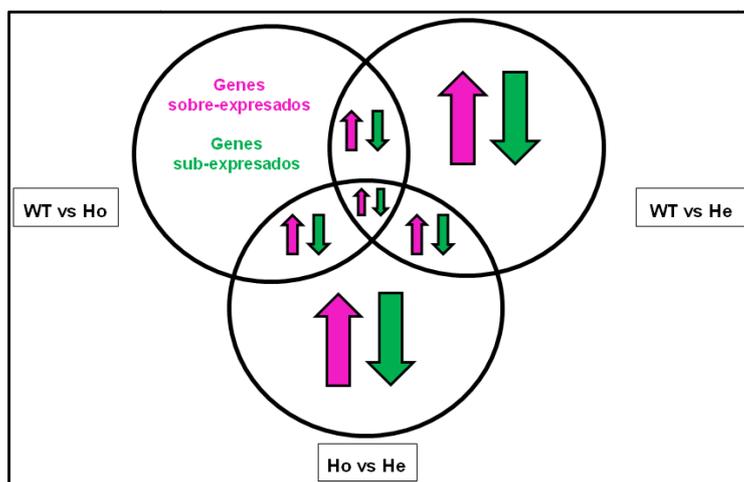


Figura 5. Esquema de las comparaciones realizadas para el análisis de solapamiento de expresión diferencial DE.

4. Análisis de la ontología génica y otros análisis bioinformáticos

Realizamos un análisis GO no sesgado de las listas de genes DE, usando la herramienta online VLAD (Visual Annotation Display. <http://informatics.jax.org/~jer/vlad>). Complementamos este análisis con otro relativamente sesgado, basado en listas de genes representativas de ciertas funciones biológicas (Grupos Funcionales, GF), construídas *ad hoc* para este estudio, empleando información de la literatura y diversas bases de datos disponibles en red: VLAD, AMIGO (The Gene Ontology. <http://amigo.geneontology.org>), GATHER (Gene Annotation Tool to Help Explain Relationships. <http://gather.genome.duke.edu>), GOTM (GOTree Machine. <http://genereg.ornl.gov/gotm>) y FlyBase (<http://flybase.org>). Algunas de estas listas de referencia fueron construídas exclusivamente en base a estudios cuyo objetivo era construir catálogos de genes asociados experimentalmente a ciertos GF. Nuestra lista de referencia para el GF *Regeneración tisular* se basó en listas publicadas por Blanco *et al.*, 2010; la de *Estrés salino* se basó en Stergiopoulos *et al.*, 2009; la de *Enfermedades mitocondriales* en Fernández-Ayala *et al.*, 2010; y la de *Largo de vida/envejecimiento* en Camporeale *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Kim *et*

al., 2010. Posteriormente calculamos y graficamos el porcentaje de genes DE en el mutante *Ho sall* que pertenecían a cada GF de referencia, en el estadio 16 (WT16 vs Ho16; He16 vs Ho16), 17 (WT17 vs Ho17; He17 vs Ho17) y en la transición entre ambos estadios (Ho16 vs Ho17; WT16 vs WT17). La **Tabla Suplementaria 1** muestra los genes en cada categoría de GF de referencia. Los genes de las listas DE que no pertenecían a los GF seleccionados fueron clasificados bajo el término genérico *Otros* y aquellos que no tenían anotación funcional en Flybase fueron clasificados bajo el término *Función desconocida*. Finalmente, realizamos el análisis GO con el programa FatiGO del paquete BABELOMICS (Al-Shahrour *et al.*, 2006).

Mediante otros métodos bioinformáticos se analizaron los sitios de unión a la proteína Sall en los genes del Sistema Inmune *dro5* e *IM3* que mostraron DE en nuestro análisis. Para ello se usó el programa MatScan (Blanco *et al.*, 2006), exigiendo como máximo una sustitución de base respecto a la secuencia de unión consenso publicada (Barrio *et al.*, 1996) y usando como referencia el ensamblaje del genoma R5/dm3 de la base de datos BDGP (<http://www.fruitfly.org>).

También comparamos nuestros resultados mRNA-Seq de muestras WT de estadio 16 y 17 con aquellos de muestras de embriones de *Drosophila* que coinciden temporalmente con las nuestras, obtenidas en otro análisis transcriptómico (modENCODE, Graveley *et al.*, 2011). Esto fue realizado de dos maneras, previa normalización de todos los datos por la mediana, con el fin de comparar el número e identidad de genes que aumentan o reducen sus transcritos en el intervalo de desarrollo embrionario de *Drosophila* comprendido en ambos estudios. La primera manera de comparar ambos análisis fue calculando los coeficientes de correlación de Pearson entre: a) nuestros datos mRNA-Seq de las muestras WT16 (13,5 hs de desarrollo) y aquellos de modENCODE obtenidos de embriones de 12-14 horas de desarrollo (SRX015647), y b) nuestros datos mRNA-Seq de las muestras WT17 (18 hs de desarrollo) y aquellos de modENCODE obtenidos de embriones de 18-20 horas de desarrollo (SRX015650). Para la segunda comparación de nuestros resultados con los de Graveley y col. (2011) calculamos el número de genes DE sobre o sub-expresados al menos 4 veces en nuestras muestras WT en la transición entre los estadios 16 y 17 y entre las muestras modENCODE de 12–14 hs y 18–20 hs.

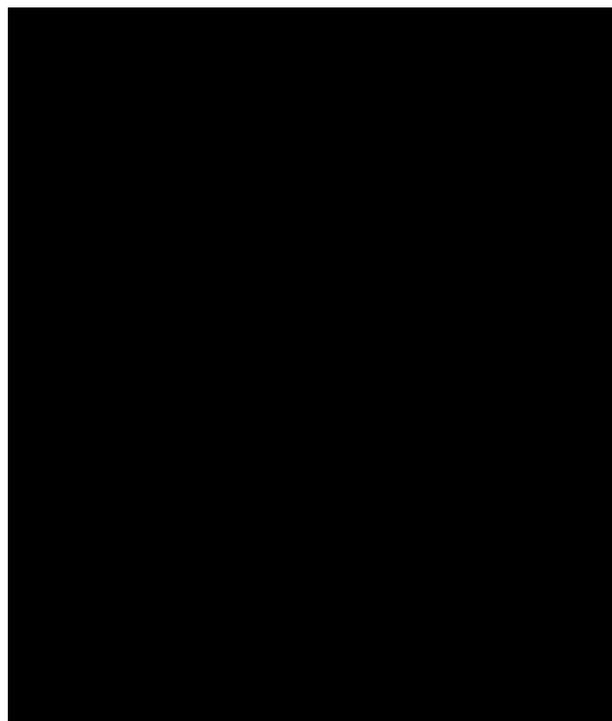
RESULTADOS CAPÍTULO I

A continuación resumiré los principales resultados correspondientes a este capítulo de la tesis, en relación al orden de los objetivos específicos que expuse anteriormente. Quisiera destacar que la mayoría de estos resultados fueron ya publicados (Ferreiro *et al.*, 2012, se adjunta al final de la tesis) y mencionar que muchas de las imágenes presentadas a continuación son parte de esa publicación por lo que las mantuve en idioma inglés, respetando la versión original publicada.

1. Cuantificación y chequeo de calidad de las muestras de ARN empleadas en la secuenciación mRNA-Seq

Las muestras de ARN para la secuenciación mRNA-Seq fueron extraídas a partir de embriones de *Drosophila* WT, mutantes nulos *sall* Ho y He, colectados en los estadios de desarrollo embrionario 16 (WT16, Ho16 y He16) y 17 (WT17, Ho17 y He17). La **Tabla 2** y la **Figura 6** muestran los resultados de la cuantificación por Nanodrop y el chequeo de calidad por “Agilent 2100 Bioanalyzer” (respectivamente) de estas muestras.

Tabla 2. Cuantificación por Nanodrop del ARN total extraído de todas las muestras posteriormente secuenciadas por mRNA-Seq.



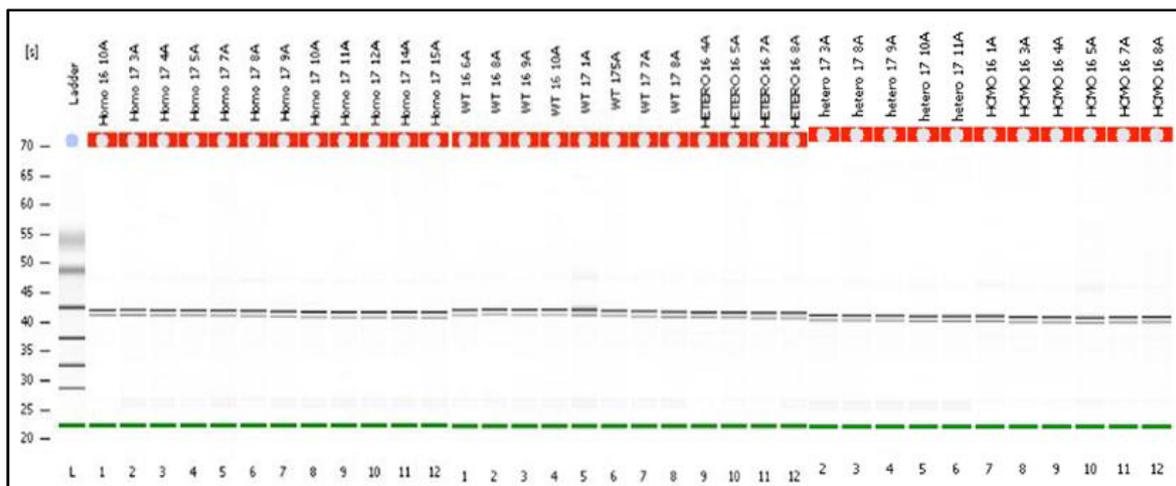


Figura 6. Resumen de los resultados de chequeo de calidad por Agilent del ARN extraído de todas las muestras posteriormente secuenciadas por mRNA-Seq. Las bandas visualizadas en los distintos carriles se corresponden al ARNr 18s. Todas las muestras (a excepción de la He16 10A que no se muestra en esta figura) contenían ARN de buena calidad, no degradado. La banda verde simboliza el marcador inferior que se usa como un estándar interno para alinear los datos del "ladder" con los datos de los carriles de muestras.

Estos resultados confirmaron que el ARN no se encontraba degradado y que tanto la cantidad como la calidad de todas las muestras de ARN permitía usarlas para secuenciar a excepción de la muestra He16 10A que fue descartada por estar degradada.

2. Análisis por PCR y qPCR de la expresión de los genes *salm*

Previo a la secuenciación chequeamos por PCR y qPCR la expresión de *salm* y *salm* en las muestras de ARN WT16, He16, WT17, He17 y confirmamos la ausencia de transcritos de ambos genes en las muestras He16 y He17. Para ello hicimos retrotranscripciones de los ARN a ADNc y amplificamos los genes con oligonucleótidos específicos. Los resultados se resumen en la **Figura 7**.

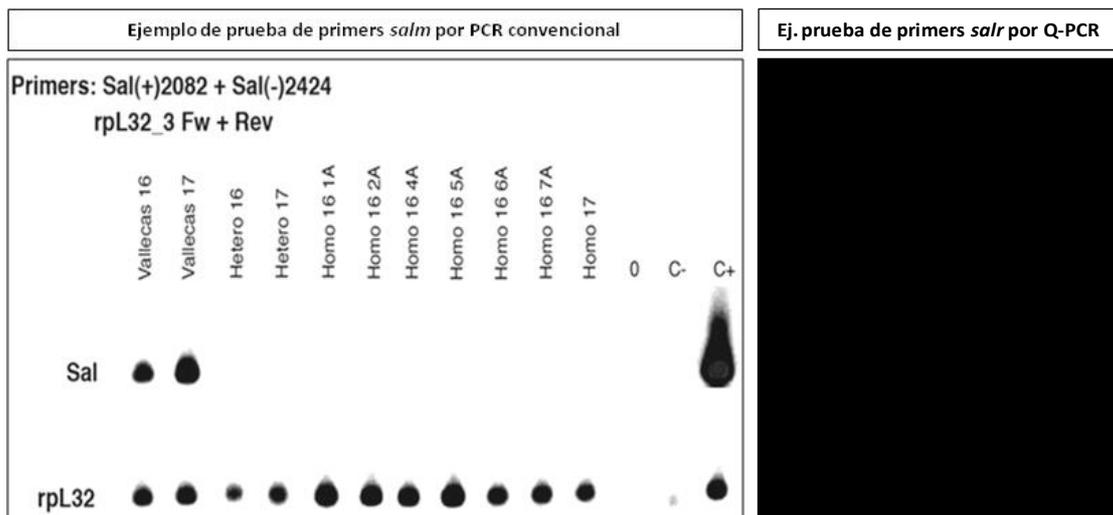


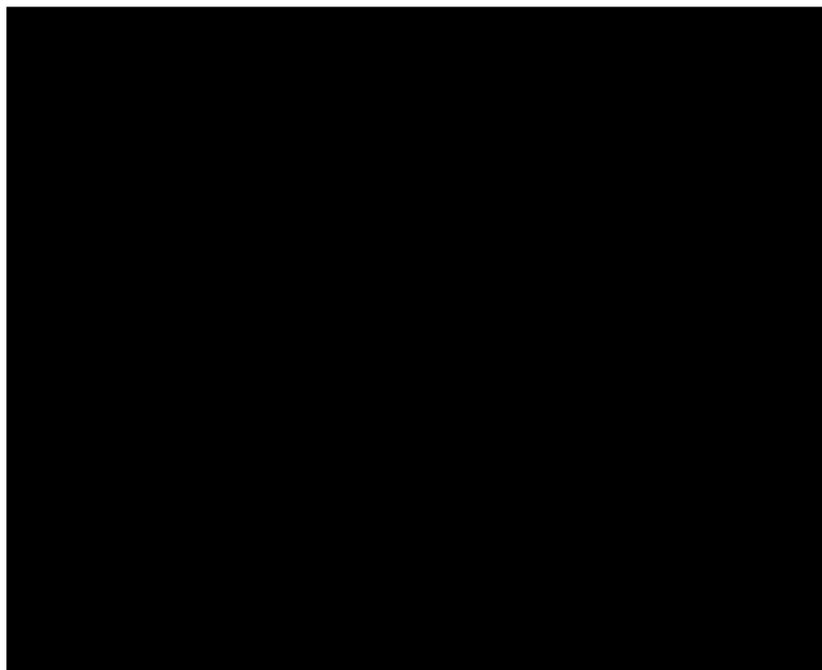
Figura 7. Análisis de la expresión de los genes *salm* en las muestras de ARN por PCR y qPCR. La figura muestra un ejemplo de PCR convencional con uno de los pares de primers para la amplificación del gen *salm* y el control *rpL32* (izquierda) y un ejemplo de cálculo de ct resultante de una qPCR con uno de los pares de primers para la amplificación del gen *salr* (derecha). *RpL32* (o *Rp49*) corresponde al gen ribosomal de tipo "housekeeping" usado como control.

3. Secuenciación mRNA-Seq y análisis de expresión diferencial

Con el fin de construir una base de datos del perfil de transcripción en los estadios de ND y reversión, realizamos la secuenciación mRNA-Seq de los ADNc obtenidos por retrotranscripción a partir del ARN de todas las muestras (WT16, He16, Ho16, WT17, He17, Ho17) por duplicado o triplicado. La **Tabla 3** muestra los parámetros de secuenciación de las réplicas biológicas.

Empleando el programa DESeq (Anders & Huber, 2010) para medir las diferencias de expresión génica entre todas las muestras, identificamos 2534 genes con valores de DE que superaban el límite definido como estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en al menos una de las comparaciones genotípicas (por estadio y entre estadios, **Figura 5**). La **Tabla Suplementaria 2** muestra la varianza en la proporción de transcritos entre los resultados del análisis DE por comparación genotípica. También calculamos los RPKM (Mortazavi *et al.*, 2008; ver Introducción Capítulo I) para confirmar la variabilidad de expresión interna de las muestras (**Tabla Suplementaria 3**).

Tabla 3. Parámetros de secuenciación de las réplicas biológicas de los genotipos estudiados.



Símbolos genotípicos: Silvestre o normal (WT), heterocigoto (He), homocigoto (Ho). Las letras a, b y c representan diferentes experimentos para cada genotipo. Las réplicas técnicas para una misma muestra genotípica se agruparon (ej: WT16ab). *Se considera que un gen es expresado cuando presenta valores de RPKM > 1.

Comparamos el perfil global de transcripción de las muestras Ho16 y Ho17 con las muestras WT y He de ambos estadios, dada nuestras hipótesis de que los genes DE en el Ho16 estarían principalmente asociados a ND mientras que los genes DE en el Ho17 estarían principalmente asociados a NP. La **Figura 8** muestra el agrupamiento jerárquico de todos los genotipos en los estadios 16 y 17 respecto a los 2534 genes definidos como DE en al menos una de las comparaciones pareadas entre genotipos y estadios (**Figura 5**). En estos resultados se observa una clara diferencia entre los transcriptomas de estadio 16 y 17 independientemente del genotipo analizado, lo cual indica que la variación de expresión en este intervalo del desarrollo embrionario es mayor a la variación debida a la mutación de los genes *sall*. Por otro lado, también se observa una mayor similitud entre las muestras WT y He con respecto a las muestras Ho, que aparecen más diferenciadas.

El resultado más interesante a resaltar dadas nuestras hipótesis es que existen diferencias de expresión en los mutantes Ho y los WT tanto en el estadio de ND como en el de reversión. La comparación del transcriptoma de los embriones WT y mutantes Ho dio lugar a una lista de 633 genes regulados diferencialmente en los mutantes Ho en los estadios embrionarios 16 y/o 17, y en la transición entre ambos estadios (**Tabla Suplementaria 4 y Figuras 8-10**).

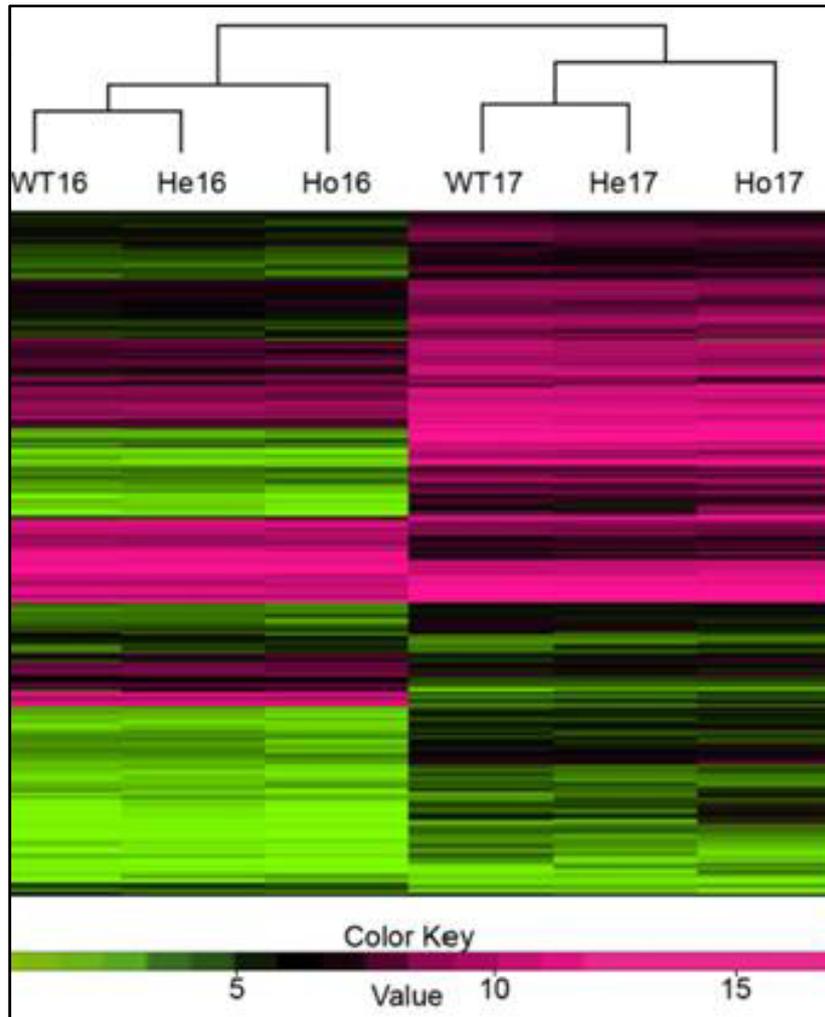


Figura 8. Agrupamiento jerárquico (heatmap) de los 2534 genes con expresión diferencial ($p < 0.001$) en al menos una de las comparaciones entre genotipos y estadios secuenciados por mRNA-Seq. Comparaciones en estadio 16 ó 17: WT vs Ho, WT vs He y He vs Ho. Comparaciones en la transición entre ambos estadios: WT16 vs WT17, He16 vs He17 y Ho16 vs Ho17. Las columnas representan el tipo de muestra y las filas horizontales los 2534 genes. Los colores representan los valores \log_2 de la proporción de expresión por encima (magenta, sobre-expresados) o por debajo (verde, sub-expresados) del nivel medio de expresión fila/columna (conteo normalizado de genes), tal como muestra la escala.

La **Figura 9** muestra diagramas de Venn representando el número total de genes DE en cada comparación pareada entre genotipos en cada estadio. Los perfiles transcriptómicos de los embriones WT y He solo se diferenciaron en 72 genes en el estadio 16 (42 sobre-expresados y 30 sub-expresados en el He respecto al WT) y 94 genes en el estadio 17 (24 sobre-expresados y 70 sub-expresados en el He respecto al WT). Los perfiles transcriptómicos de los embriones WT y Ho se diferenciaron en más de 200 genes: 216 genes en el estadio 16 (190 sobre-expresados y 26 sub-expresados en el Ho respecto al WT) y 260 genes en el estadio 17 (163 sobre-expresados y 97 sub-expresados en el He respecto al WT).

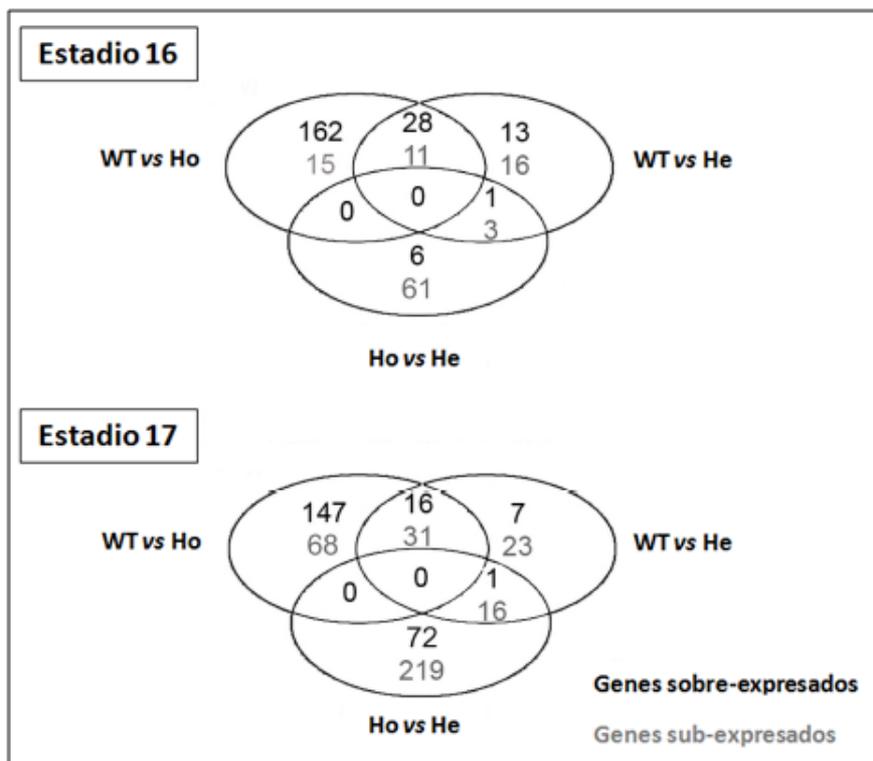
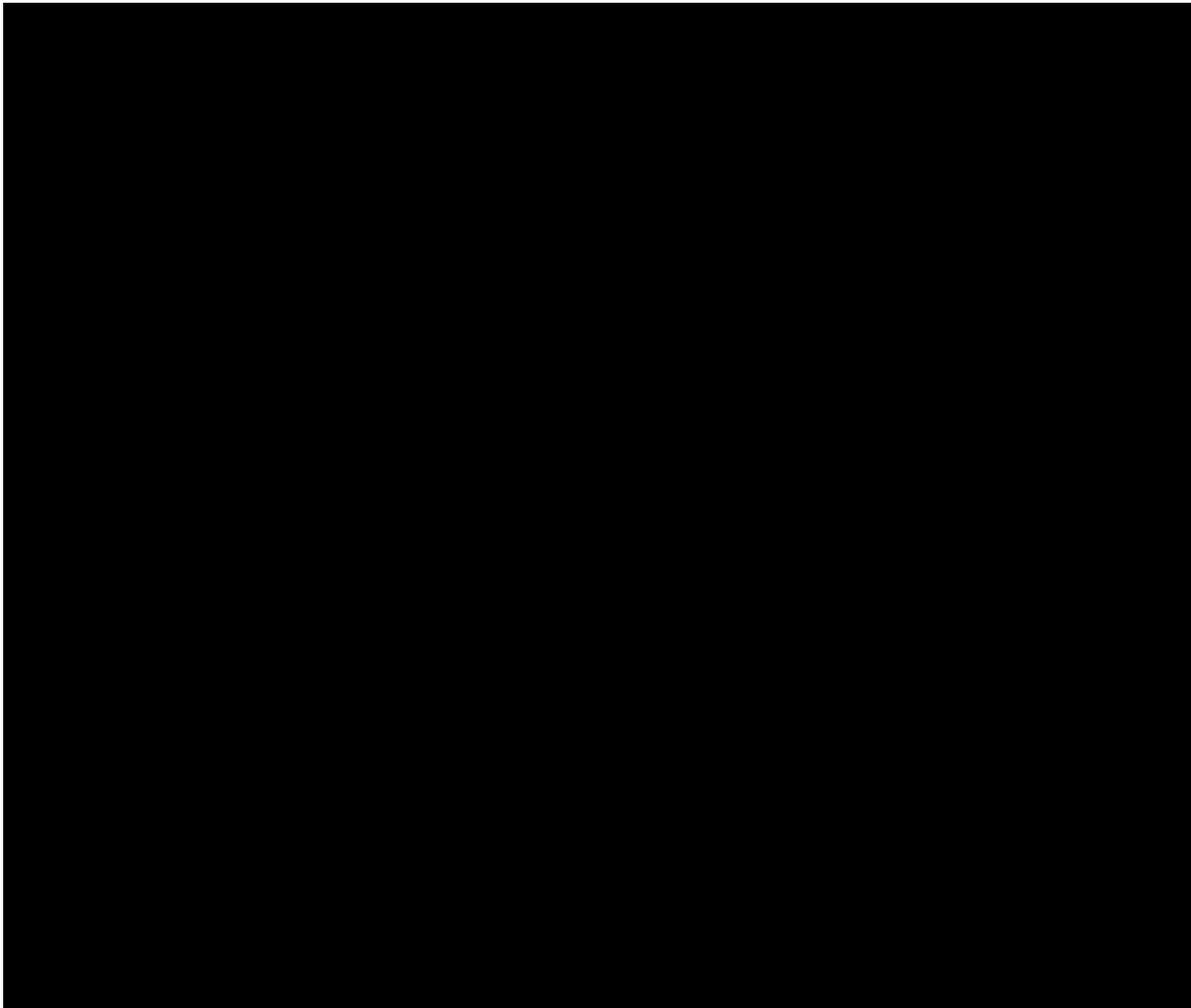


Figura 9. Análisis comparativo del transcriptoma mutante *salI* en los estadios correspondientes a neurodegeneración (16) y reversión (17). Los diagramas de Venn representan el número de genes con DE $p < 0.001$ en cada genotipo (WT, He y Ho) respecto a los otros dos para los estadios 16 (arriba) y 17 (abajo). El solapamiento de diagramas incluye los genes con igual comportamiento o compartidos entre las comparaciones de genotipos (solapamiento de expresión diferencial). Los números superiores de cada diagrama (en negro) representan los genes sobre-expresados y los inferiores (en gris) los genes sub-expresados en el segundo genotipo respecto al primero (ej. el diagrama de Venn etiquetado "WT vs Ho" representa el número de genes sobre o sub expresados en las muestras de embriones Ho respecto a los WT).

La comparación del transcriptoma de los tres genotipos en el estadio 16, mostró 249 genes DE en los mutantes *sall* (Ho16 + He16) respecto a los WT16 (**Figura 9**). De esos 249 genes descartamos 161 que mostraban perfiles diferentes en las comparaciones genotípicas pareadas (ej.: genes que se expresaban diferencialmente en la comparación WT16 vs He16 pero no en las comparaciones WT16 vs Ho16 o He16 vs Ho16). Los 88 genes que presentaban perfiles acordes en todas las comparaciones entre genotipos del estadio 16 fueron clasificados en dos categorías de acuerdo a si eran independientes (47 genes) o dependientes (41 genes) de la dosis génica de *sall* (**Tabla 4**).

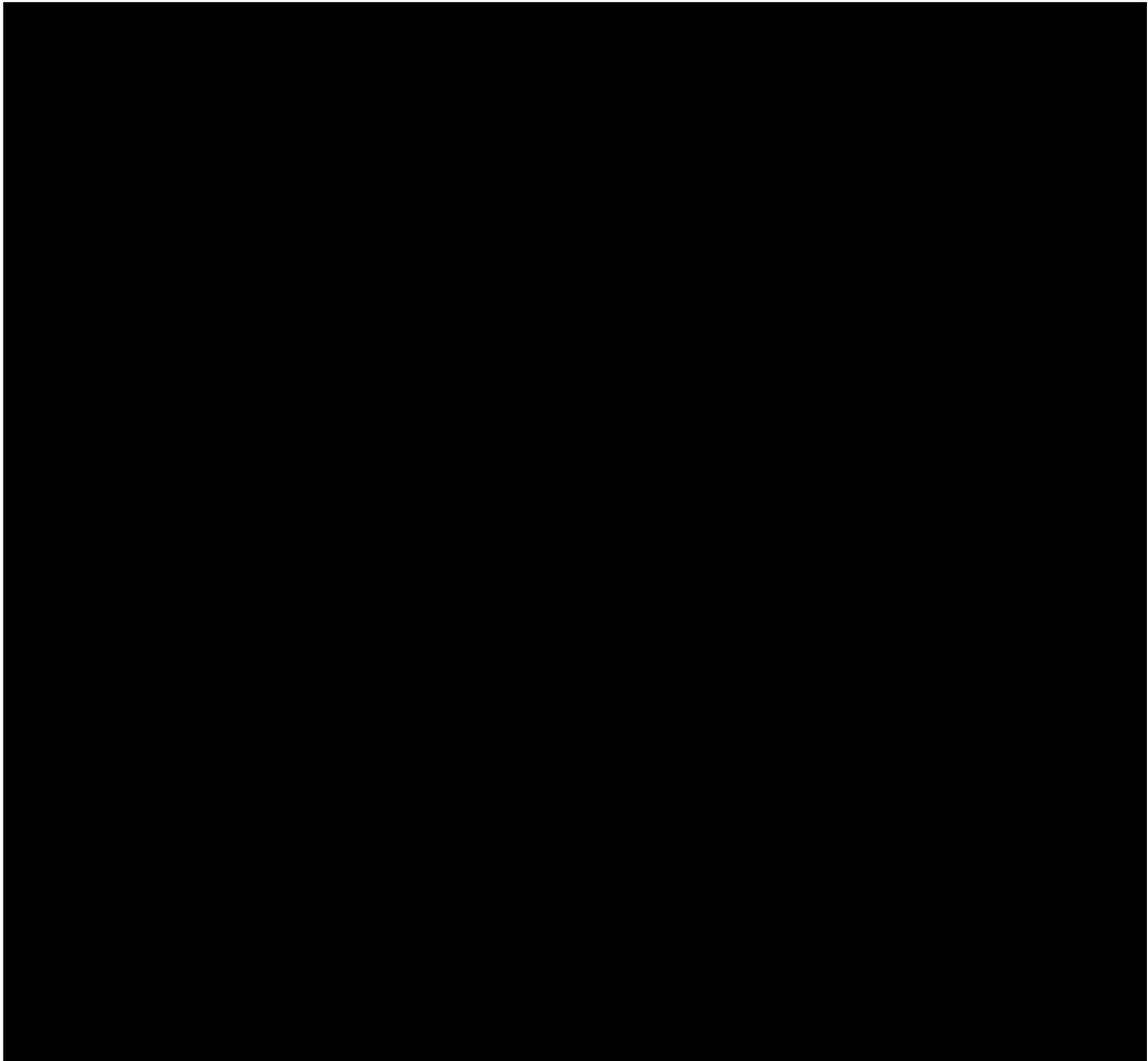
Tabla 4. Número de genes expresados diferencialmente de manera significativa en los mutantes Ho16 y He16 respecto a los WT16.



Genes sub-expresados (D=downregulated) o sobre-expresados (U=upregulated) en el segundo genotipo respecto al primero; (E=Equal) representa la ausencia de cambios significativos en la expresión de los genes considerados entre los genotipos comparados.

La comparación del transcriptoma de los tres genotipos en el estadio 17, mostró 307 genes DE en los mutantes *sall* (Ho17 + He17) respecto a los WT17 (**Figura 9**). De esos 307 genes descartamos 92 que mostraban perfiles diferentes en las comparaciones genotípicas pareadas. Los 215 genes restantes fueron clasificados en dos categorías de acuerdo a si eran independientes (151 genes) o dependientes (64 genes) de la dosis génica de *sall* (**Tabla 5**).

Tabla 5. Número de genes expresados diferencialmente de manera significativa en los mutantes Ho17 y He17 respecto a los WT17.



Genes sub-expresados (D=downregulated) o sobre-expresados (U=upregulated) en el segundo genotipo respecto al primero; (E=Equal) representa la ausencia de cambios significativos en la expresión de los genes considerados entre los genotipos comparados.

La **Figura 10** muestra los resultados del análisis DE de las comparaciones genotípicas durante la transición entre el estadio 16 y el estadio 17, expresados como

gráficos de dispersión log2 del cambio en la expresión génica (**Figura 10A**) o como diagramas de Venn al igual que en la figura anterior (**Figura 10B**). En los embriones WT, la transición entre ambos estadios implicó un aumento de la expresión de 1687 genes y una disminución de la expresión de 312 genes (en WT17 respecto al WT16, **panel izquierdo en la Figura 10A**), con un cambio similar en el mutante He (no se muestra en la figura). Los mutantes Ho, en cambio, mostraron una disminución en los genes que aumentan su expresión en la transición de estadios (781 genes vs 1687) y un aumento en los genes que bajan su expresión (416 genes vs 312) respecto a la anterior comparación (**panel derecho en la Figura 10A**). 872 genes se expresan diferencialmente en los tres genotipos en el estadio 17 respecto al 16 (664 sobre-expresados y 208 sub-expresados; **Figura 10B**).

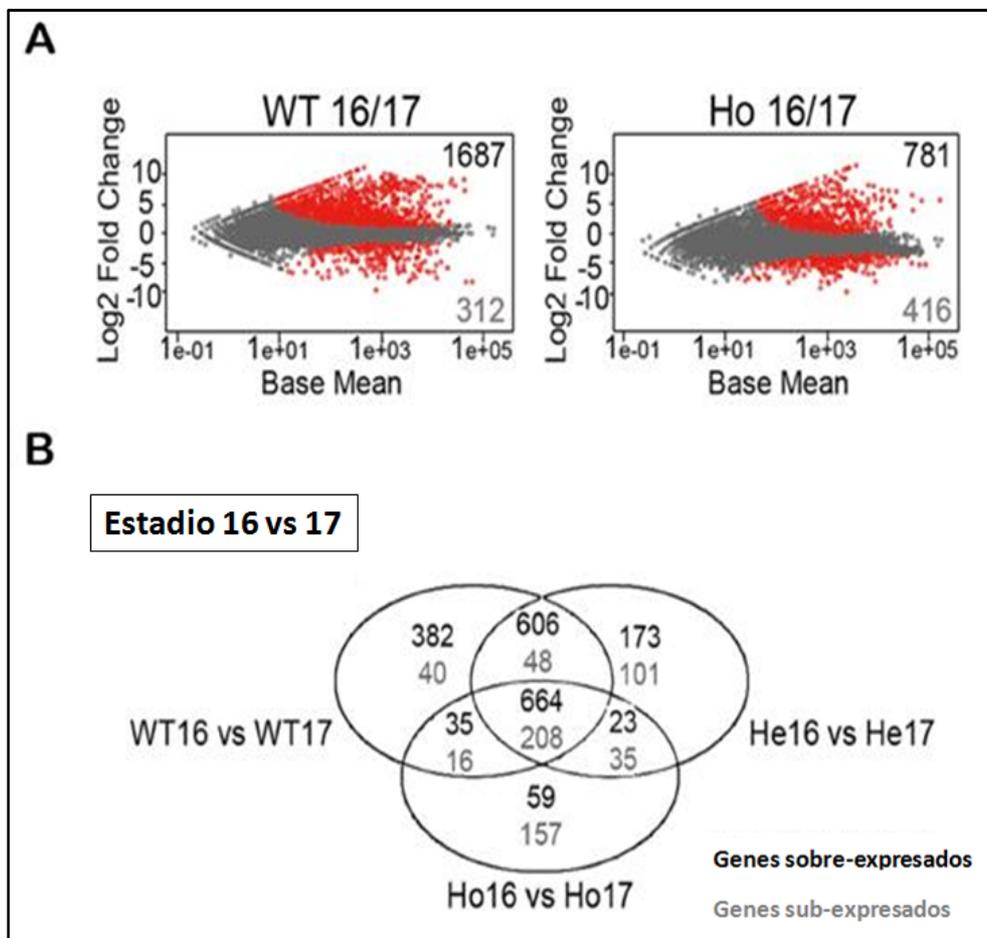


Figura 10. Resultados del análisis de expresión diferencial durante la transición de estadio embrionario 16 a 17. (A) Gráficos de dispersión del log2 del nivel de cambio en la expresión génica en el estadio 17 respecto al 16 en los genotipos WT y Ho, en relación al conteo promedio de genes. Cada punto simboliza un gen. En rojo se representan aquellos genes que cambian su nivel de expresión significativamente ($p < 0.001$) en la transición entre estadios: hacia arriba del eje de las x (sobre-expresados

en 17 respecto a 16) y hacia abajo (sub-expresados en 17 respecto a 16). **(B)** Diagramas de Venn que muestran el solapamiento de DE en la transición entre ambos estadios (WT16 vs WT17, He16 vs He17 y Ho16 vs Ho17). La forma de leer estos diagramas es igual a la explicada para la **Figura 9**.

4. Validación de los resultados de mRNA-Seq por medio de qPCR de genes del sistema inmune previamente asociados a neurodegeneración

A fin de validar los datos de la secuenciación mRNA-Seq mediante otro método de cuantificación de transcritos, analizamos por qPCRs los transcritos de los genes del sistema inmune *dro5* e *IM3*, previamente vinculados por la literatura a ND, que presentaban diferencias significativas entre las muestras Ho y WT secuenciadas. Para obtener información detallada de los genes seleccionados ver FLYBASE: <http://flybase.org/>.

Respecto al gen *dro5*, los resultados de la secuenciación indicaban que se encontraba sobre-expresado en la muestra Ho respecto a la WT en estadio 16, pero no en el estadio 17. Esto fue confirmado por los resultados de la qPCR (**Figura 11, izquierda**). El gen *IM3* según nuestros resultados de mRNA-Seq se encontraba fuertemente sobre-expresado en Ho respecto al WT en estadio 17, pero no en el estadio 16, lo cual también fue confirmado por qPCR (**Figura 11, derecha**).

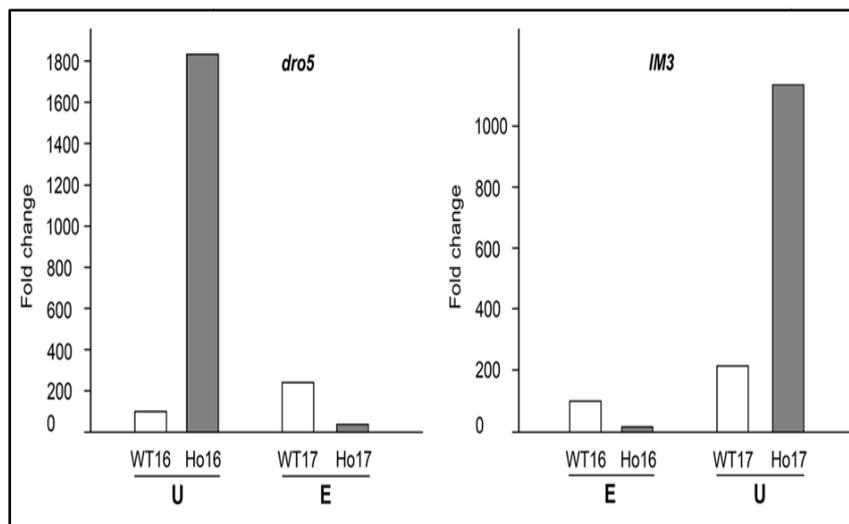


Figura 11. Validación de los resultados de la secuenciación mRNA-Seq. Representación gráfica de los resultados de expresión por qPCR de los genes *dro5* (izquierda) e *IM3* (derecha) en embriones WT y Ho de estadios 16 ó 17. Las letras U (“upregulated”=sobre-expresado) y E (“equal”=sin diferencias significativas en la

expresión) indican el resultado que se había obtenido previamente por medio de secuenciación por mRNA-Seq.

5. Análisis de los sitios de unión a la proteína Sall en los genes del sistema inmune seleccionados para la validación del análisis DE

Mediante el programa MatScan (Blanco *et al.*, 2006), se analizaron los posibles sitios de unión de los factores de transcripción Sall en las regiones genómicas adyacentes a los genes *dro5* e *IM3*. Encontrar posibles sitios de unión a Sall dentro de las regiones promotoras de estos dos genes apoyaría la hipótesis de que los cambios significativos en sus niveles de transcripción en el mutante Ho respecto al WT se deben a la ausencia de los factores de transcripción Sall en el mutante. Nuestro análisis reveló que tanto *dro5* como *IM3* presentan en sus promotores varios sitios conservados de unión a Sall (**Figura 12**). Esto indica que ambos genes podrían estar regulados, más concretamente reprimidos, por Sall, lo que indica que las diferencias de transcritos entre los Ho y WT probablemente se deban a la ausencia de Sall en los mutantes.

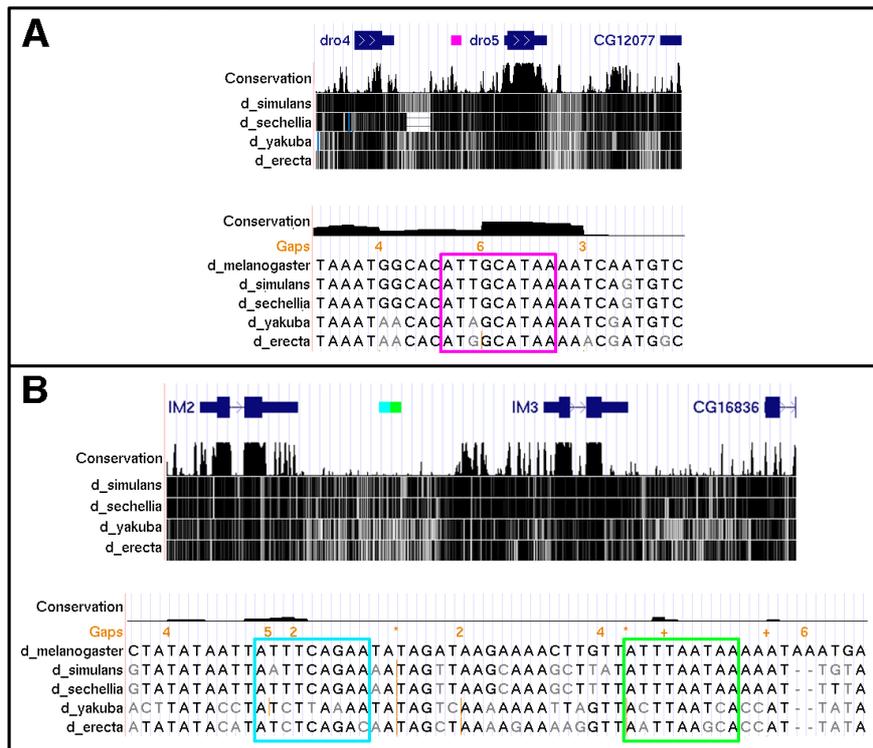


Figura 12. Análisis de potenciales sitios de unión al factor de transcripción Sall dentro de los promotores de los genes *dro5* e *IM3*. La imagen muestra la región del genoma de *Drosophila* donde se encuentran los genes *dro5* e *IM3* y las secuencias conservadas de unión a Sall que presentan estos sitios en diversas especies de *Drosophila* (*melanogaster*, *simulans*, *sechellia*, *yakuba* y *erecta*).

6. Comparación de los resultados DE con los datos de modENCODE

Como forma adicional de confirmar la calidad de nuestra secuenciación, comparamos nuestros resultados para las muestras WT de los estadios 16 y 17 con los valores obtenidos para muestras WT de estadios aproximadamente equivalentes, obtenidos por otros investigadores también mediante mRNA-Seq (datos del proyecto modENCODE disponibles en una base de datos de acceso público, Graveley *et al.*, 2011). El coeficiente de correlación de Pearson mostró una gran correlación entre ambas colecciones de datos ($r=0.79776$ para el estadio 16 y $r=0.81202$ para el estadio 17; **Figura 13**). 1175 genes (64%) aparecen sobre-expresados y 412 (39%) aparecen sub-expresados en ambas colecciones de datos.

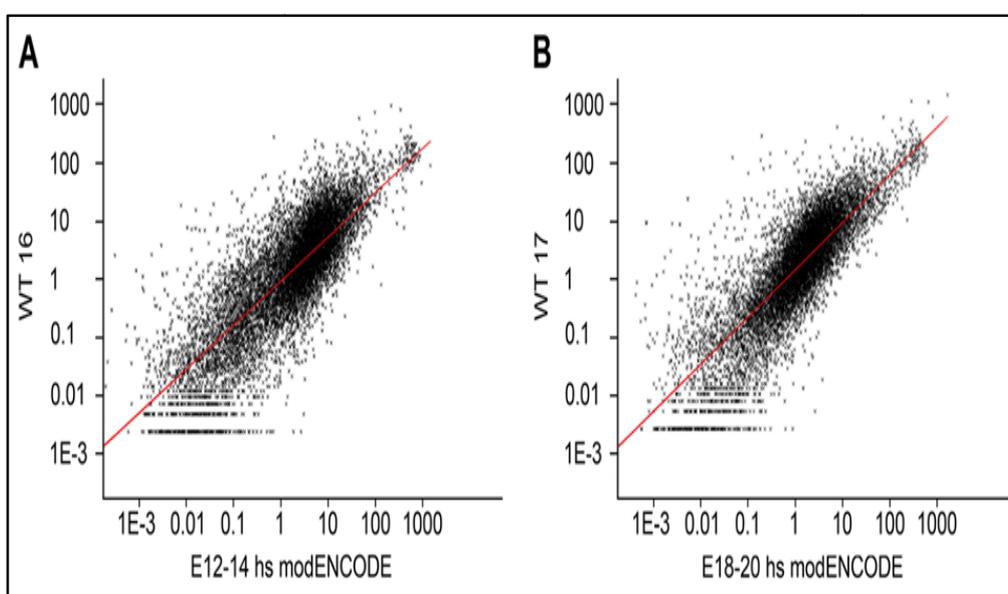


Figura 13. Comparación de nuestros resultados con los datos del proyecto modENCODE. En ambos casos se usó mRNA-Seq para analizar el transcriptoma de embriones WT a lo largo del desarrollo embrionario. Los gráficos muestran el resultado del análisis de correlación entre los datos modENCODE correspondientes a E12-14hs y nuestros resultados mRNA-Seq para la muestra WT16, $r=0.79776$ (A) y los datos modENCODE correspondientes a E18-20hs y nuestros resultados mRNA-Seq para la muestra WT17, $r=0.81202$ (B).

7. Análisis de ontología génica

Una vez definidas las listas de genes DE obtenidas de las comparaciones entre los embriones WT y los mutantes He y Ho de los estadios 16 y 17 o entre embriones de un mismo genotipo de estadios distintos, se procedió a investigar qué funciones

biológicas conocidas se encontraban representadas en estas listas y cuáles aparecían sobre-representadas en ellas respecto a su representación en el genoma total de *Drosophila* (análisis de enriquecimiento funcional).

Para realizar un análisis de enriquecimiento funcional se compara la proporción de genes del genoma total anotados con una cierta función biológica, con la proporción de genes de la misma función presentes en una lista experimental (ej. genes DE en la comparación WT16 vs Ho16). Se puede usar una aproximación “no sesgada” analizando las listas directamente en línea con diversos programas de análisis de ontología génica (GO) de libre acceso en la web. También se puede usar una aproximación “sesgada” usando como referencia listas de Grupos Funcionales (GF) de interés generadas fundamentalmente en base a la literatura.

En esta tesis decidimos emplear ambas aproximaciones para clasificar por función biológica los 620 genes DE en los embriones Ho respecto a los WT, en los estadios 16 y/o 17 y en la transición entre ambos estadios, e investigar qué funciones biológicas aparecían sobre-representadas (**Figura 14**). Mediante estos análisis identificamos que 72 de los 633 genes estaban experimentalmente asociados con procesos de ND o NP en *Drosophila* u otros organismos (**Tabla Suplementaria 4**, en rojo), representando aproximadamente 5 % de los genes de nuestras listas. Nuestra hipótesis postulaba que el grupo de genes expresados diferencialmente en el Ho16 respecto al WT16 estaría enriquecido en genes asociados a ND, mientras que el grupo de genes expresados diferencialmente en el Ho17 respecto al WT17 y/o en el Ho17 respecto al Ho16 estaría enriquecido en genes asociados a NP. La totalidad de genes de *Drosophila* asociados empíricamente a procesos de ND o NP conocidos al momento de nuestro análisis representaba el 2% del genoma total, por lo cual interpretamos que nuestras listas se encontraban enriquecidas en genes asociados a ambos procesos biológicos, tal como habíamos postulado.

El análisis de enriquecimiento funcional “no sesgado” (ver **Metodología Capítulo I.4**) fue realizado empleando el programa VLAD (<http://informatics.jax.org/~jer/vlad>) y mostró un enriquecimiento en genes asociados a procesos de oxidoreducción en la comparación WT16 vs Ho16 y en genes asociados a serinas-endopeptidasas en las comparaciones WT17 vs Ho17 y Ho16 vs Ho17 (**Tabla**

Suplementaria 5). Ambos procesos se encuentran estrechamente relacionados con procesos de ND.

El análisis de enriquecimiento funcional "sesgado" (ver **Metodología Capítulo I.4**) fue realizado empleando listas de GF que construimos especialmente para este análisis en base a la literatura (**Tabla Suplementaria 6**) y mostró como resultado más importante a resaltar, un enriquecimiento en genes previamente asociados de manera empírica a ND y/o NP. También mostró una sobre-representación de GF asociados por la literatura a ambos procesos, sugiriendo el potencial de nuestras listas para identificar genes potencialmente asociados a ellos.

7.1. Identificación de genes potencialmente asociados a neurodegeneración

La clasificación en GF de los genes DE en la comparación genotípica WT16 vs Ho16 (**Figura 14A** y **Tabla Suplementaria 6**) mostró que 5% de ellos pertenecían al GF *ND/NP* y el análisis GO mostró un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) en este GF (**Figura 14A**, en rojo). Los otros GF mayoritariamente representados fueron *Neuronal* (8%), *Redox* (7%), *Estrés salino* (6%), *Regeneración tisular* (6%) y *Largo de vida/Envejecimiento* (6%). Se encontraron también representados otros GF vinculados a ND como *Enfermedades mitocondriales* en porcentajes menores a 5% (**Figura 14A**). Un 27% de estos genes fueron clasificados en el grupo *Función desconocida* (no asignada empíricamente ni sugerida). El análisis GO mostró también un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) de los GF *Redox*, *Largo de vida/Envejecimiento* y *Enfermedades mitocondriales*, respecto a la representación de estos GF en el genoma completo de *Drosophila* (**Figura 14A**, en rojo). Los GF *Neuronal* y *Ayuno* (Starvation) también se encontraron significativamente sobre-representados con un $p < 0.05$ (**Figura 14A**, en verde).

La clasificación en GF de los genes DE en la comparación genotípica He16 vs Ho16 (**Figura 15A** y **Tabla Suplementaria 6**) mostró que 4% de ellos pertenecían al GF *ND/NP* y el análisis GO mostró un enriquecimiento significativo ($p < 0.05$) en este GF (**Figura 15A**, en verde). Los otros GF mayoritariamente representados fueron *Estrés salino* (8%), *Neuronal* (7.5%), *Regeneración tisular* (6%), *Largo de vida/Envejecimiento* (6%), *Enfermedades mitocondriales* (6%) y *Redox* (5%). Se encontraron también

representados otros GF vinculados a ND como *Fagocitosis* en porcentajes menores a 5% (**Figura 15A y Tabla Suplementaria 6**). Un 24% de estos genes fueron clasificados en el grupo *Función desconocida*. El análisis GO mostró también un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) del GF *Redox* (**Figura 15A**, en rojo). Los GF *Neuronal*, *Enfermedades mitocondriales*, *Ayuno* y *Regulación hormonal* también se encontraron significativamente sobre-representados con un $p < 0.05$ (**Figura 15A**, en verde). Estos resultados son similares a los de la comparación WT16 vs Ho16 (**Figura 14A**).

7.2. Identificación de genes potencialmente asociados a neuroprotección

La clasificación en GF de los genes DE en la comparación genotípica WT17 vs Ho17 (**Figura 14B y Tabla Suplementaria 6**) mostró que 6% de ellos pertenecían al GF de *ND/NP* y el análisis GO mostró un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) en este GF (**Figura 14B**, en rojo). Los otros GF mayoritariamente representados fueron *Respuesta inmune* (10%), *Neuronal* (9%), *Estrés salino* (8,5%) y *Largo de vida/Envejecimiento* (5,5%). Se encontraron también representados otros GF en porcentajes menores a 5% (**Figura 14B y Tabla Suplementaria 6**). Un 19% de estos genes fueron clasificados en el grupo *Función desconocida*. El análisis GO mostró también un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) de los GFs *Respuesta inmune*, *Estrés salino*, *Largo de vida/Envejecimiento*, *Ayuno*, *Redox* y *Enfermedades mitocondriales* (**Figura 14B**, en rojo). El GF *Neuronal* también se encontró significativamente sobre-representado con un $p < 0.05$ (**Figura 14B**, en verde).

La clasificación en GF de los genes DE en la comparación genotípica He17 vs Ho17 (**Figura 15B y Tabla Suplementaria 6**) mostró que 4% de ellos pertenecían al GF *ND/NP* y el análisis GO mostró un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) en este GF (**Figura 15B**, en rojo). Los otros GF mayoritariamente representados fueron *Estrés salino* (10%), *Respuesta inmune* (10%), *Enfermedades mitocondriales* (7%), *Neuronal* (6%) y *Largo de vida/Envejecimiento* (5%). Se encontraron también representados otros GF en porcentajes menores a 5% (**Figura 15B y Tabla Suplementaria 6**). Un 18% de estos genes fueron clasificados en el grupo *Función desconocida*. El análisis GO mostró también un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) de los GFs *Respuesta*

inmune, Enfermedades mitocondriales, Estrés salino y Ayuno (Figura 15B, en rojo). Estos resultados son similares a los de la comparación WT17 vs Ho17 (Figura 14B).

Por último, la clasificación en GF de los genes DE en la comparación genotípica Ho16 vs Ho17 (Figura 14C y Tabla Suplementaria 6) mostró que 5% de ellos pertenecían al GF *ND/NP* y el análisis GO mostró un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) en este GF (Figura 14C, en rojo), principalmente entre los genes significativamente sub-expresados en la transición de estadios ($p = 2.15 \times 10^{-9}$). Los otros GF mayoritariamente representados fueron *Neuronal* (8%), *Regeneración tisular* (6,5%), *Largo de vida/Envejecimiento* (6,5%), *Estrés salino* (6%), *Respuesta inmune* (6%) y *Transmembrana* (5%). Se encontraron también representados otros GF en porcentajes menores a 5% (Figura 14C y Tabla Suplementaria 6). Un 19% de estos genes fueron clasificados en el grupo *Función desconocida*. El análisis GO mostró también un enriquecimiento significativo ($p < 0.01$) de los GFs *Redox* (principalmente entre los genes significativamente sub-expresados en la transición de estadios, $p = 1.29 \times 10^{-4}$), *Largo de vida/Envejecimiento* y los GFs *Respuesta inmune*, *Ayuno* y *Enfermedades mitocondriales*, estos tres últimos principalmente entre los genes significativamente sobre-expresados en la transición de estadios ($p = 8.77 \times 10^{-12}$, $p = 2.75 \times 10^{-12}$ y $p = 1.36 \times 10^{-5}$, respectivamente) (Figura 14C, en rojo). El GF *Estrés salino* también se encontró significativamente sobre-representado con un $p < 0.05$ (Figura 14C, en verde).

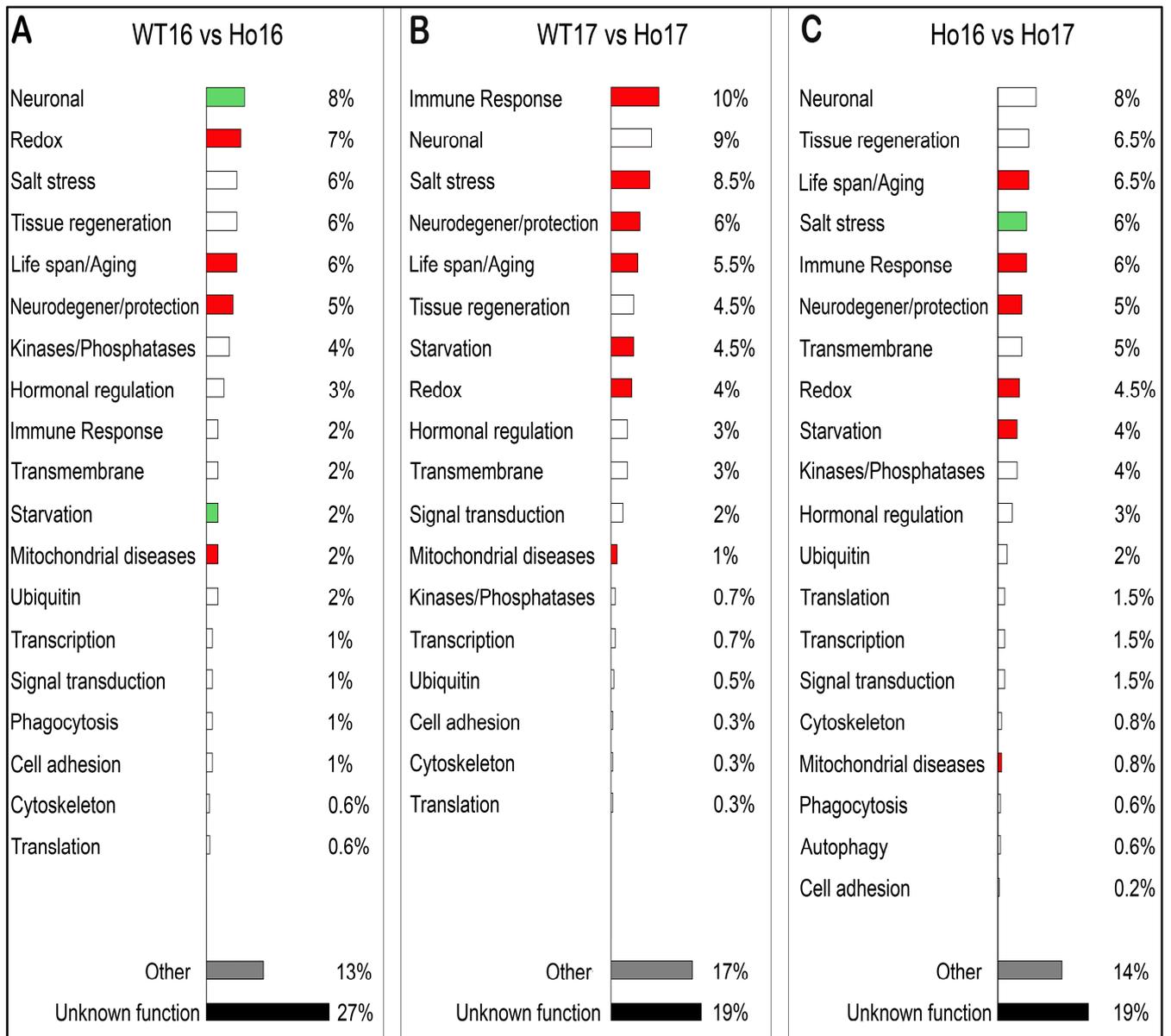


Figura 14. Clasificación en categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en los embriones mutantes *sall* Ho respecto a los WT en los estadios de neurodegeneración (16) y reversión (17) y en los embriones Ho en el estadio de reversión respecto al de neurodegeneración. Principales GF representados en los genes DE en los mutantes *sall*, expresados como porcentaje de genes en cada grupo: (A) Ho16 respecto a WT16, (B) Ho17 respecto a WT17 y (C) Ho17 respecto a Ho16. En rojo y verde se muestran los resultados del análisis de enriquecimiento GO, GF significativamente sobre-representados en la muestra, con $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente, respecto al genoma total de *Drosophila*.

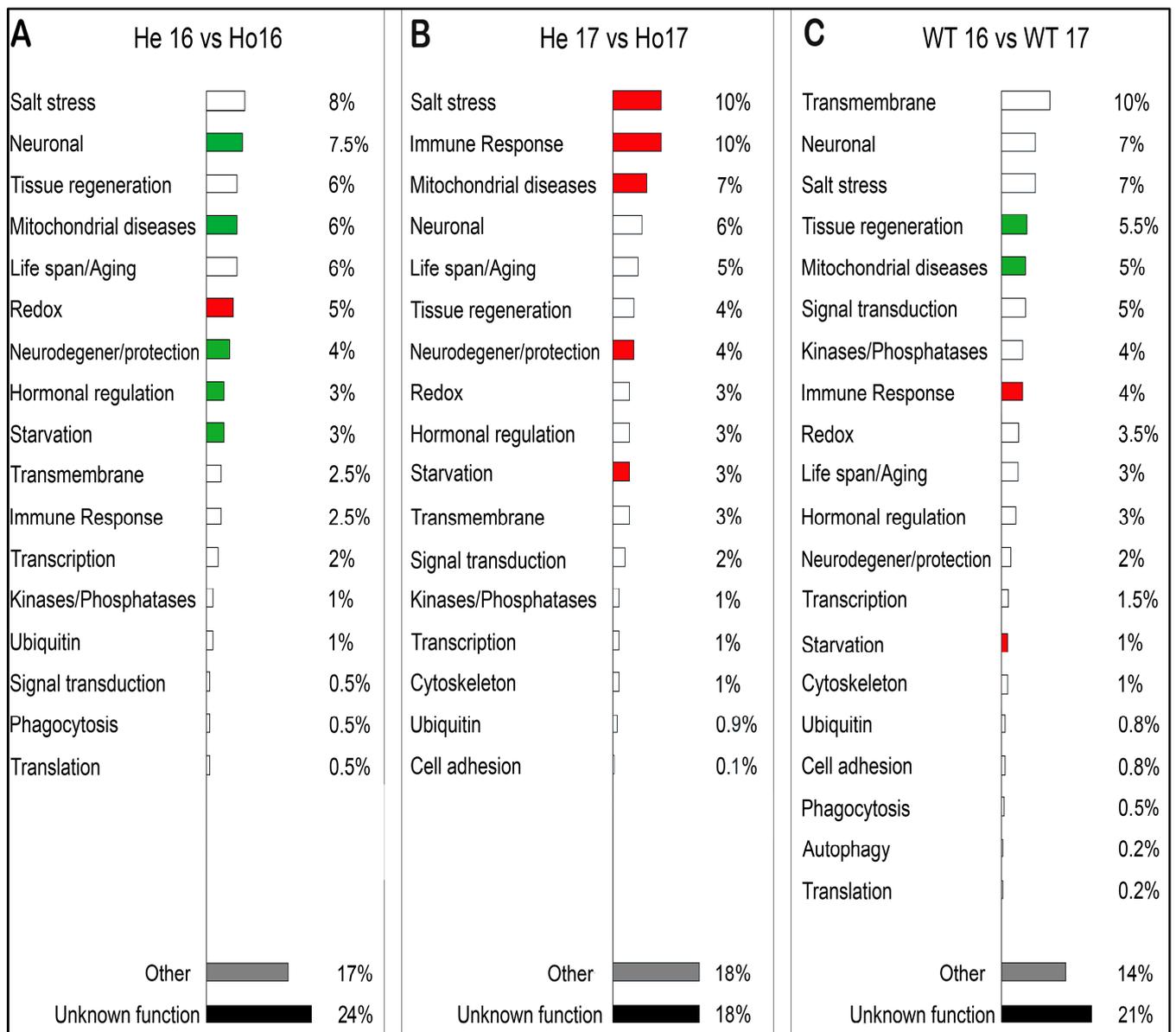


Figura 15. Clasificación en categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en las comparaciones genotípicas entre mutantes *sall* Ho y He en los estadios 16 y 17 y entre embriones WT en ambos estadios. Principales GF representados en los genes DE en el segundo genotipo de cada comparación respecto al primero, expresados como porcentaje de genes en cada grupo. (A) Ho16 respecto a He16, (B) Ho17 respecto a He17 y (C) WT17 respecto a WT16. En rojo y verde se muestran los resultados del análisis de enriquecimiento GO, GF significativamente, sobre-representados en la muestra, con $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente respecto al genoma total de *Drosophila*.

En resumen, el análisis de expresión diferencial combinado con el análisis de enriquecimiento funcional, nos permitió construir una base de datos del perfil de transcripción en los estadios de ND y reversión, revelando que existe un patrón de transcripción característico que identifica a estos dos momentos críticos del desarrollo en el mutante (Figura 16).

El estadio de ND se caracteriza por sobre-expresión de genes asociados principalmente a *Redox*, *Largo de vida/Envejecimiento* y *Ayuno*, y sub-expresión de genes asociados a *Enfermedades mitocondriales* y función *Neuronal*.

El estadio de reversión de ND (NP) se caracteriza por sobre-expresión de genes asociados principalmente a la *Respuesta inmune*, *Enfermedades mitocondriales*, *Estrés salino* y sub-expresión de otros genes asociados a *Redox*, *Largo de vida/Envejecimiento* y *Ayuno*.

	NEURODEGENERACIÓN	NEUROPROTECCIÓN
RESPUESTA INMUNE		↑
L. VIDA/ENVEJECIMIENTO	↑	↓
ENF. MITOCONDRIALES	↓	↑
NEURONAL	↓	
REDOX	↑	↓
ESTRÉS SALINO		↑
AYUNO	↑	↓

Figura 16. Patrón de transcripción característico de los estadios de neurodegeneración y neuroprotección. Las flechas simbolizan los genes de cada GF sobre o sub- representados (orientación hacia arriba o abajo respectivamente). El tamaño de las flechas es proporcional al grado de significancia de esta sobre-representación ($p < 0.01$ ó $p < 0.05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES CAPÍTULO I

1. Validación del modelo de neurodegeneración reversible de los mutantes *sall*

Uno de los aspectos más importantes que merecen ser discutidos en este capítulo es que los resultados de la secuenciación detallados anteriormente confirman el modelo de ND reversible propuesto por Cantera y col. (2002) y descrito en la Introducción General. En ese trabajo se demostraba por diversos métodos, principalmente por la histología de cerebros WT y mutantes Ho *sall* analizados por microscopía electrónica, que existía un claro fenotipo de ND en los mutantes de estadio 16 y, más llamativo e interesante aún, que existía una reversión histológica de este fenotipo en los mutantes Ho en el siguiente estadio de desarrollo embrionario. Estas observaciones llevaron a estos autores a plantear que la falta de *Sall* podría ser compensada parcialmente, gracias a una redundancia funcional de los genes *sall* con otros genes, por una reorganización del genoma que lograra revertir transitoriamente el fenotipo de ND. Por lo que los embriones mutantes *sall* de *Drosophila* podían ser un buen modelo para analizar procesos de ND y de NP (responsables de la reversión), desde diversos enfoques metodológicos, entre los que resalta el análisis de la expresión de genes característicos de ambos estadios donde estos autores observaron los fenotipos histológicos. Esto podía dar lugar a la definición de perfiles de expresión característicos de procesos de ND y NP y a la identificación de nuevos genes asociados a uno o ambos procesos, tal como los presentados en este capítulo de la tesis.

Consideramos que nuestros resultados del análisis de expresión mRNA-Seq comparativo de embriones WT y mutantes *sall* validaron el modelo de ND reversible, ya que encontramos un enriquecimiento significativo de genes previamente asociados de manera empírica a ND entre los genes expresados diferencialmente en la etapa de ND histológica ($p=1.28 \times 10^{-7}$, **Figura 14A** y **Tabla suplementaria 6**). Por ejemplo, encontramos un enriquecimiento significativo de la función Redox (Greene *et al.*, 2005; Gruenewald *et al.*, 2009; Rival *et al.*, 2009). Algunos ejemplos de estos genes son *l(2)01289*, que protege de la toxicidad causada por β -amiloide (Rival *et al.*, 2009); nueve genes de citocromos mitocondriales (*Cyt-b*, *Col-III*, *Cyp4g1*, *Cyp4p2*, *Cyp6a23*,

Cyp12c1, *Cyp304a1*) y seis genes para NADH-ubiquinonas oxidoreductasas mitocondriales (*ND1-6*).

Además, observamos un enriquecimiento significativo de genes previamente asociados de manera empírica a NP entre los genes expresados diferencialmente en la etapa de reversión de la ND histológica ($p=1.05 \times 10^{-12}$, **Figura 14B** y **Tabla suplementaria 6**). Como ejemplo de algunos de estos genes se encuentra el gen que codifica la proteína de choque térmico *Hsp70Bc* cuya expresión mejora la ND causada en *Drosophila* por mutaciones en el gen *parkin* (Bonini, 2002; Fernandez-Funez *et al.*, 2007; Gruenewald *et al.*, 2009). Otros ejemplos son los genes *Cyp6a8*, *CG2065*, *CG11825*, *GstE1*, *Prx2540-1* y *Prx2540-2* cuyas mutaciones se encuentran asociadas a varias enfermedades neurodegenerativas como PD y AD (Scherzer *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004; Greene *et al.*, 2005; Gruenewald *et al.*, 2009; Rival *et al.*, 2009).

Nuestros resultados también muestran que la mayoría de los genes DE en la etapa de ND se encuentran sobre-expresados. Esto coincide con lo reportado en otros estudios genómicos en *Drosophila* que analizan la expresión de genes asociados a ND, encontrándose éstos mayoritariamente sobre-expresados en los mutantes de ND respecto a WT, por ejemplo en mutantes *parkin* (Greene *et al.*, 2005) o en moscas con expresión transgénica de α -synuclein y tau humanas (Scherzer *et al.*, 2003).

2. Identificación de genes potencialmente asociados a neurodegeneración y neuroprotección

Otros resultados que ameritan resaltarse y ser discutidos es que también logramos identificar un conjunto de genes significativamente sub- o sobre-expresados en los mutantes *sall* durante la reversión del fenotipo de ND aún no anotados funcionalmente en las bases de datos de *Drosophila* (cerca de un 20%) o que han sido empíricamente asociados a otras funciones biológicas conocidas pero no a ND y/o NP.

A partir de nuestro análisis, estos genes podrían considerarse preliminarmente asociados a ND y/o NP y eventualmente ser experimentalmente validados como tales. Puesto que el estudio experimental de las funciones de un gen o proteína requiere mucho tiempo y esfuerzo, y teniendo en cuenta que los genes sin función demostrada experimentalmente constituyen actualmente la mitad del genoma aproximadamente,

la confección de una lista enriquecida en genes asociados a una patología o función biológica permite facilitar el descubrimiento de nuevos genes importantes para esa patología o función. Desde ese punto de vista, la construcción de una lista de genes potencialmente involucrados en mecanismos que confieren NP (**Tabla Suplementaria 6**) es uno de los resultados más importantes de esta tesis.

La ND y la NP podrían considerarse como dos caras de la misma moneda. Un mismo gen podría estar asociado a ambos procesos antagónicos, encontrándose por ejemplo significativamente sub-expresado en procesos de ND y sobre-expresado en procesos que dieran lugar a una NP o reversión del fenotipo de ND. O, dicho de otra forma, la falta de función de un gen podría desencadenar ND, mientras que su expresión o sobre-expresión podría ejercer una función neuroprotectora. De igual forma, un mismo grupo funcional o función biológica, como *Redox*, *Sistema inmune*, *Largo de vida/Envejecimiento* o *Ayuno* podría estar sobre-representada tanto en procesos de ND como de NP.

2.1. Identificación de genes potencialmente asociados a neurodegeneración

Nuestros resultados del análisis DE de los mutantes *sall* muestran que la lista de genes significativamente sobre-expresados en los mutantes *sall* en el estadio neurodegenerativo está enriquecida en genes de los GFs *Redox* y *Enfermedades mitocondriales* ($p=5.25 \times 10^{-3}$). Estos resultados por tanto, además de sugerir una posible función de los genes *sall* en el mantenimiento y la regulación de la función mitocondrial, refuerzan la idea planteada en trabajos previos de una fuerte asociación entre el estrés oxidativo y los procesos de ND (Jenner *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2006, Sau *et al.*, 2007, Trushina *et al.*, 2007, Zhu *et al.*, 2007).

Otros GFs enriquecidos en la lista de genes DE en los mutantes *sall* en el estadio neurodegenerativo fueron *Neuronal* (genes asociados al desarrollo y función del SN) y *Ayuno*. Algunos ejemplos de estos genes son el gen *Ama* que participa en la adhesión celular de las neuronas (Nelson *et al.*, 2005); los genes *Hsp23* y *Hsp26* que codifican proteínas de choque térmico asociadas a la longevidad y la regeneración tisular (Aigaki *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2010; Fernández-Ayala *et al.*, 2010); el gen *nAcR α -34E* que codifica un receptor de acetilcolina en el SNC de *Drosophila* y el gen *CG4306* que está

involucrado en el crecimiento neuronal y la formación de sinapsis (Mastushita-Sakai *et al.*, 2010).

La sobre-representación de genes asociados a la función neuronal en nuestras listas de genes DE en el estadio de ND está en concordancia con que es el tejido nervioso el que es susceptible y blanco de procesos de ND. Muchos de estos genes, hasta ahora no asociados empíricamente a ND, podrían ser eventualmente caracterizados como tales mediante, por ejemplo, ensayos con mutantes de falta de función y análisis y descripción de fenotipos de ND en estos mutantes. Por otro lado, encontrar genes asociados a longevidad está en concordancia con que la ND tanto en *Drosophila* como en otros organismos, está asociada a una disminución significativa de la longevidad de los individuos que la padecen, por lo que también podrían eventualmente ser caracterizados como asociados a fenotipos de ND de igual forma en un futuro. Por último, el ayuno (starvation) ha demostrado tener relación con la longevidad, promoviendo usualmente un aumento en el largo de vida y encontrándose asociado a variaciones metabólicas vinculadas con la función Redox y la reducción de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, esto nos hace sugerir una asociación del ayuno con los procesos neurodegenerativos y plantear una futura caracterización de genes asociados a este proceso que generen cambios metabólicos que induzcan ND.

2.2. Identificación de genes potencialmente asociados a neuroprotección

El análisis de enriquecimiento funcional de los genes DE en los mutantes *sall* en el estadio de NP mostró, en coincidencia con trabajos previos de ND en *Drosophila* (ej.: Gruenewald *et al.*, 2009; Rival *et al.*, 2009), un enriquecimiento de genes asociados al GF *Sistema inmune*. Estos genes se encuentran principalmente sobre-expresados significativamente ($p=6.48 \times 10^{-21}$). Algunos ejemplos son el gen *IM4*, sobre-expresado también en mutantes *parkin* (Greene *et al.*, 2005) y el gen *IM10*, sobre-expresado también en moscas con expresión transgénica de una proteína Tau humana mutante (Scherzer *et al.*, 2003).

La desregulación de genes del sistema inmune en moscas con patologías neurodegenerativas puede ser una consecuencia secundaria frente a una respuesta de

estrés del SN a la ND. Otra alternativa es que la expresión diferencial de genes del sistema inmune se active y promueva bien un efecto neurodegenerativo o alternativamente uno neuroprotector (revisado en Cantera & Barrio, 2015).

Otros de los GFs enriquecidos en el estadio de NP, fueron el de *Largo de vida/Envejecimiento* que agrupa genes como *Cyp6a13*, *Nplp4*, *mthl8*, *Prx2540-1* y *Prx2540-2* mayormente vinculados a mitocondrias y que promueven un aumento en la longevidad (West *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2011) y el GF de *Ayuno*, cuya posible vinculación con procesos de ND/NP se discutió anteriormente.

Finalmente, el GF *Estrés Salino* también se encontró enriquecido ($p=1 \times 10^{-8}$) entre los genes significativamente sobre-expresados en los mutantes *sall* en el estadio de NP. Esto sugiere que esta reversión puede estar relacionada con un proceso de respuesta a estrés salino.

Una pérdida celular de agua a causa de un desequilibrio osmótico, podría explicar el fenotipo neurodegenerativo observado por Cantera *et al.* (2002), caracterizado por un espacio extracelular agrandado, reducción del tamaño de somas neuronales y de diámetro axonal. La sobre-expresión de genes de respuesta a estrés salino en el estadio 17 podría entonces reflejar la acción de un mecanismo que permite revertir al menos esa parte del fenotipo neurodegenerativo observado en estadio 16. Curiosamente, el gen *salm* es uno de los más sobre-expresados en el transcriptoma de moscas sujetas a estrés salino (Stergiopoulos *et al.*, 2009) y se ha observado que mutaciones en ciertos genes *SALL* de humanos y ratones se encuentran asociadas a malfuncionamiento renal (revisado en de Celis & Barrio, 2009). Por lo tanto, amerita ser investigada la participación de los genes *sall* en la regulación osmótica.

3. Genes regulados directamente por los factores de transcripción Sall

Nuestros resultados de secuenciación mRNA-Seq también aportan a la comprensión del posible mecanismo de acción de las proteínas Sall de *Drosophila*. La mayoría de los genes regulados diferencialmente en los mutantes *sall* Ho estaban sobre-expresados respecto a los WT y los mutantes *sall* He. Esto constituye una

importante evidencia a favor de la hipótesis de que los factores Sall funcionan generalmente como represores transcripcionales (Netzer *et al.*, 2001; Kiefer *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2011).

Nuestro hallazgo de posibles sitios de unión conservados para la proteína Sall en las regiones promotoras de los genes del sistema inmune *dro5* y *IM3* (**Figura 12**), sumado a nuestros resultados de mRNA-Seq y confirmación por qPCR sugieren por primera vez que ambos genes podrían estar regulados directamente por Sall. Sin embargo, no podemos descartar una probable inducción indirecta de *dro5* y *IM3* debida a una activación del sistema inmune en respuesta a la ND (o al estrés celular causado por la degeneración). Sería interesante realizar en un futuro experimentos *in vivo* e *in vitro* que confirmaran una activación directa de estos genes por Sall.

Teniendo en cuenta que el GF *Sistema inmune* se encuentra significativamente enriquecido en el estadio de NP sería interesante también repetir el análisis de sitios de unión a Sall en otros genes del sistema inmune que se encuentren desregulados en el mutante *sall*. Si se encontrase una fuerte relación entre los genes del sistema inmune y Sall, los mutantes *sall* podrían representar un buen modelo para el estudio de patologías relacionadas con la regulación del sistema inmune.

Nuestros resultados de secuenciación y DE también nos permitieron clasificar a los genes expresados diferencialmente en los estadios embrionarios 16 y 17 en dos categorías: genes dependientes de la dosis de *sall* y genes independientes de la dosis de *sall* (**Tablas 4 y 5**). Encontramos un efecto de dosis de *sall* en ciertos genes, entre ellos, algunos de los reportados previamente por Cantera *et al.* (2002) mediante métodos histológicos, como por ejemplo *armadillo (arm)*, *Fasciclin 2 y 3 (Fas2 y 3)*, *cadherin-N (CadN)* y *Neuroglian (Nrg)* (**Figura 17A**), por lo que nuestro análisis apoya también estos resultados.

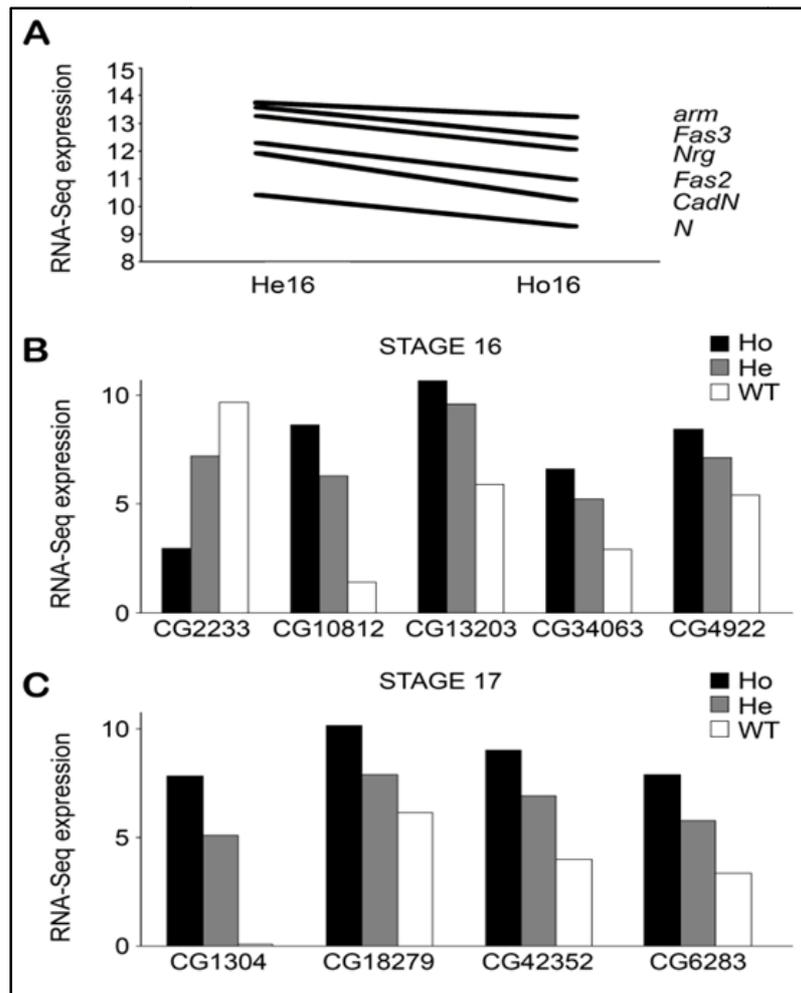


Figura 17. Efecto de dosis de *salI* en la regulación génica. El análisis mRNA-Seq confirmó un efecto de dosis de *salI* sobre la regulación de ciertos genes, entre ellos, algunos de los reportados previamente por Cantera y col. (2002) mediante métodos histológicos. Los mutantes *salI* He tienen menor cantidad de transcritos para estos genes respecto a los WT. A) Representación gráfica de la diferencia en los niveles de transcritos en los genes *arm*, *Fas3*, *Nrg*, *Fas2*, *CadN* y *N* entre los mutantes *salI* He16 y Ho 16. B) Representación gráfica de los niveles de transcritos en los genes *CG2233*, *CG10812*, *CG13203*, *CG34063* y *CG4922* en los embriones WT16 y en los mutantes *salI* He16 y Ho 16. C) Representación gráfica de los niveles de transcritos en los genes *CG1304*, *CG18279*, *CG42352* y *CG6283* en los embriones WT17 y en los mutantes *salI* He17 y Ho 17.

Nuestro análisis también mostró niveles intermedios de transcritos en varios otros genes de los mutantes He respecto a los Ho y los WT (**Figura 17B-C**). Como ejemplos de esto, en el estadio 16 encontramos genes asociados a *Regeneración tisular*, *Largo de vida/Envejecimiento* y *Estrés salino*. En el estadio 17 encontramos genes asociados a *ND*, *Estrés salino* y *Ayuno*. Esto indica, por tanto, que la regulación de muchos genes por los factores Sall es sensible a dosis y requiere de dos copias de

los genes *sall* para funcionar normalmente. Este efecto de dosis es interesante, ya que se ha demostrado que el Síndrome de Okihiro (OMIM 607323, Al-Baradie *et al.*, 2002; Kohlhasse *et al.*, 2002), cuyas características fueron resumidas en la introducción general de esta tesis, es causado por la falta de una copia de *SALL4* (Borozdin *et al.*, 2004).

4. Existe un cambio global en la expresión génica durante la transición de la etapa de desarrollo neural temprano y la de diferenciación neuronal tardía en *Drosophila*

Nuestros resultados mRNA-Seq indican que el transcriptoma WT de *Drosophila* cambia sustancialmente en apenas 5 horas, durante la transición entre los estadios embrionarios 16 y 17. Ese cambio ocurre también en los mutantes *sall* aunque en éstos, los genes que cambian su nivel de expresión no son necesariamente los mismos que en el WT (**Figura 10A**). Confirmamos este indicio mediante diversos análisis *a posteriori* que publicamos separadamente (Cantera *et al.*, 2014, se adjunta al final). Si bien estos resultados derivan directamente de resultados presentados en este capítulo de tesis, decidí no incluirlos como parte de este capítulo o como un nuevo capítulo ya que no estaban directamente relacionados con la búsqueda de genes implicados en ND/NP.

Otros autores habían observado previamente que durante las diferentes etapas de desarrollo de *Drosophila*, existen varias olas de cambios coordinados en la transcripción de cientos de genes (Arbeitman *et al.*, 2002; Hooper *et al.*, 2007; Papatsenko *et al.*, 2010). Uno de los momentos del desarrollo donde se encuentran grandes cambios en el transcriptoma es entre las 11 y 18 horas de desarrollo embrionario. Este intervalo solapa parcialmente con el intervalo de tiempo establecido para la recogida de las muestras analizadas en esta tesis (**Figura 4**). Deducimos que dentro de los 872 genes que presentan cambios de expresión en la transición 16 a 17 en los tres genotipos analizados (**Figura 10B**), se encuentran la mayoría de los genes relevantes para la finalización del desarrollo embrionario. También deducimos que la coordinación de estos cambios de transcriptoma es suficientemente robusta como para persistir aún en los mutantes *sall* Ho, que son capaces de pasar al estadio 17 de desarrollo aunque rara vez completan el desarrollo embrionario.

5. Conclusiones principales

El análisis de los datos de secuenciación mRNA-Seq reveló que el perfil transcriptómico del mutante Ho *sall* comparte aspectos con perfiles obtenidos en otros estudios genómicos de ND en *Drosophila* mencionados anteriormente. Los GF *Redox* y *Enfermedades mitocondriales* están sobre-representados en la etapa de ND mientras que el de *Sistema inmune* está enriquecido en la NP. Estos resultados fortalecieron la validez conceptual del modelo de ND reversible descrito por Cantera *et al.* (2002).

La caracterización del perfil de expresión de las etapas de ND y NP también reveló que uno de los genes de *Drosophila* regulados diferencialmente en ambas etapas es el gen *w*, sugiriendo que podría estar implicado en procesos de ND. Si bien este gen no parece tener un homólogo claro en humanos su mutante nulo es usado para la construcción de la mayoría de las cepas transgénicas de *Drosophila* empleadas en experimentos entre los que destacan aquellos asociados a ND y NP. Este importante hallazgo ameritó por tanto un capítulo independiente de experimentos en esta tesis que se presenta a continuación (Capítulo II).

Finalmente, los resultados de este capítulo permitieron generar una lista de genes que potencialmente tendrían función neuroprotectora. En adelante denominaré a estos genes "genes candidatos", siguiendo la pauta de autores como Yang y colaboradores (2015) que estipulan que los genes identificados en estudios genéticos que emplean métodos de secuenciación NGS deben denominarse así hasta ser asociados a una patología particular mediante validaciones experimentales adicionales (Yang *et al.*, 2015). En nuestro caso, los denominaré "genes candidatos a neuroprotectores" ya que planteamos la hipótesis de su relevancia funcional en procesos de NP y, para algunos de ellos, proponemos experimentos para validarlos como tales en la parte final de esta tesis (Capítulo III).

CAPÍTULO II

LOS MUTANTES DEL GEN *WHITE* DE *DROSOPHILA*

PRESENTAN NEURODEGENERACIÓN



INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

El análisis de los resultados de la secuenciación mRNA-Seq (Capítulo I) sugirió una posible asociación del gen *w* de *Drosophila* con procesos de ND (**Tabla Suplementaria 4**, resaltado en amarillo). Existían estudios previos que sugerían una posible vinculación entre *w* y ND. De estos antecedentes, el principal era que la ND retinal causada en moscas por la expresión transgénica de una forma mutante de la proteína Tau humana es potenciada al combinarse con mutaciones en el gen *w* (Ambegaokar & Jackson, 2010). Además de esto, el gen *w* exhibe niveles anormales de transcritos en dos estudios genómicos de moscas que sufrían ND por expresión transgénica de una forma mutante de la proteína α -synuclein humana (Scherzer *et al.*, 2003; Shieh & Bonini, 2011). A pesar de estos antecedentes, al momento de comenzar esta tesis no se había postulado explícitamente que la falta de función de *w* en sí mismo podría causar ND.

Si bien el gen *w* no parece tener un homólogo robusto en humanos y por tal motivo no fue definido en esta tesis como “candidato a neuroprotector” (ver Capítulo III), consideramos que su papel preponderante en el uso de *Drosophila* como organismo modelo justifica su estudio y la investigación sobre la hipótesis de que su falta de función produce ND.

1. El gen white de Drosophila

Las moscas *Drosophila melanogaster* WT tienen ojos de color rojo brillante. El descubrimiento en 1910 de un macho de *Drosophila* con ojos blancos permitió realizar experimentos de herencia cromosómica que demostraron la existencia de los genes y su modo de función, estableciendo el inicio de la genética moderna y revolucionando la experimentación en *Drosophila* (**Figura 18**, Green, 1996). Desde entonces, los mutantes nulos para el gen *w* se han convertido en una herramienta genética fundamental para responder una gran variedad de cuestiones biológicas de importancia. Una de las razones para ello, es que estos mutantes son la base para la construcción de moscas transgénicas (Rubin & Spradling, 1982; St Johnston, 2013).

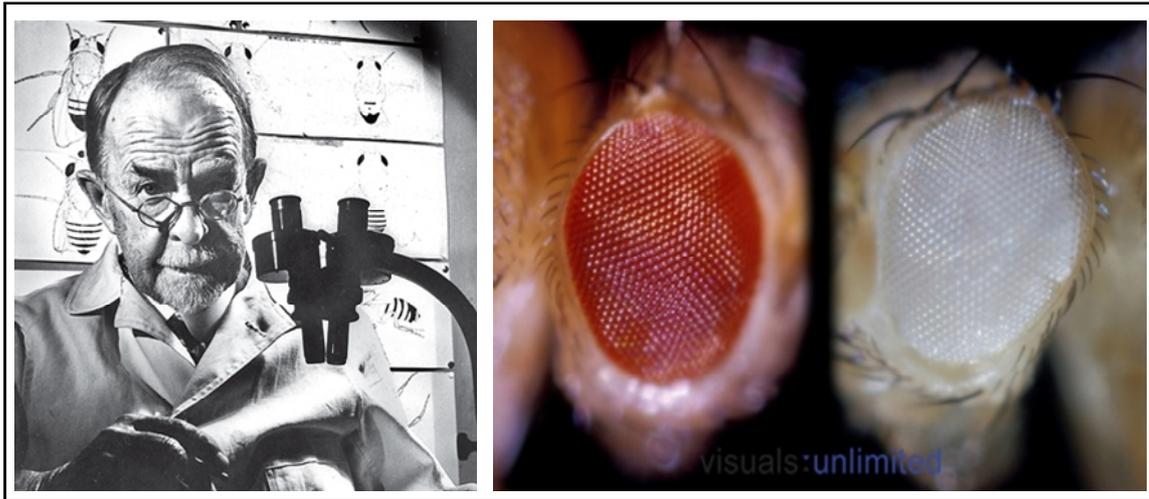


Figura 18. Morgan investigó la transmisión cromosómica de la herencia a partir del descubrimiento de una mosca con ojos blancos en 1910. La imagen muestra una fotografía de Morgan en su laboratorio y el fenotipo mutante de ojos blancos (cepa w^{1118}) comparado con el fenotipo WT de ojos rojos. (<http://archive.protomag.com/>; <https://www.chegg.com/>).

El gen w de *Drosophila* (CG2759) se encuentra localizado en el cromosoma sexual X y se conocen 2319 alelos mutantes (<http://flybase.org/reports/FBgn0003996.html>). Codifica un solo tipo de transcritto que da lugar a una sola proteína que se expresa principalmente en el ojo y los túbulos de Malpighi (órgano de excreción) y se acumula en la membrana de los gránulos de pigmento visual (Mackenzie *et al.*, 2000). La proteína White también se expresa a menor nivel en el cerebro y otros tejidos (Chintapalli *et al.*, 2007; Borycz *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2008).

En la vía de pigmentación del ojo, la proteína White funciona como un transportador tipo ABC (ATP-binding cassette transporters) de unión a ATP que al dimerizar con las proteínas Brown o Scarlet transporta guanina o triptófano/quinureína, respectivamente. Éstos son los precursores para la síntesis de dos tipos de pigmentos visuales: drospterinas y omocromos (**Figura 19**, Nolte, 1952; Sullivan & Sullivan, 1975; Sullivan *et al.*, 1979; O Hare *et al.*, 1984; Pepling & Mount, 1990). En neuronas, White interviene en la síntesis de serotonina y DA al transportar sus precursores guanina y triptófano, respectivamente (**Figura 19**, Goodwill *et al.*, 1998). Por lo tanto, los mutantes nulos w presentan niveles muy bajos de estas aminas biogénicas (Borycz *et al.*, 2008; Sitaraman *et al.*, 2008).

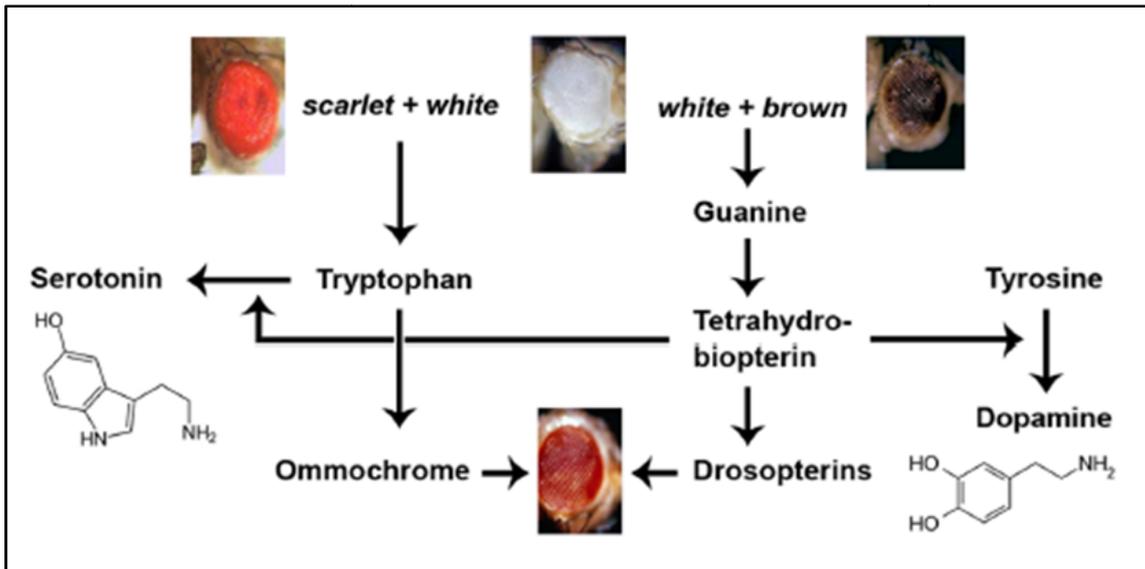


Figura 19. Función del gen *white* en la síntesis de los neurotransmisores serotonina y dopamina. La proteína White contribuye al transporte del triptófano, precursor de la serotonina, y de la guanina, cofactor esencial para la conversión de tirosina en DA y de triptófano en serotonina. (Krstic *et al.*, 2013).

Entre las funciones más importantes de los pigmentos visuales del ojo compuesto de insectos destacan la mejora de la agudeza visual y la protección de los fotoreceptores de una excesiva exposición a la luz (Shoup, 1966; Schraermeyer & Dohms, 1993). Por tanto, los mutantes *w* tienen deficiencias en la agudeza visual y sensibilidad potenciada a la luz (revisado en Belušič, 2011). También sufren degeneración retinal cuando son expuestos a condiciones de iluminación constante (Shoup, 1966; Wu & Wong, 1977; Schraermeyer & Dohms, 1993; Lee & Montell, 2004; Bulgakova *et al.*, 2010; Belušič, 2011). Además, presentan electroretinogramas (ERG) anormales, alteraciones en el comportamiento de fototaxis (Kain *et al.*, 2012), y una significativa reducción en el número de vesículas sinápticas en las terminales de los fotoreceptores (Borycz *et al.*, 2008).

Las mutaciones en el gen *w* también producen gran variedad de fenotipos neurológicos, los cuales probablemente no se deben a la deficiencia de la pigmentación de ojo, que incluyen modificaciones en el comportamiento sexual y de agresión de los machos (Zhang & Odenwald, 1995; Anaka *et al.*, 2008; Hoyer *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Krstic *et al.*, 2013) y en el tiempo de recuperación tras un período de anoxia (Xiao & Robertson, 2016), resistencia a la anestesia (Campbell & Nash, 2001), déficits de aprendizaje olfativo/espacial (Diegelmann *et al.*, 2006; Anaka

et al., 2008; Sitaraman *et al.*, 2008) e hipersensibilidad al etanol y a algunos estímulos táctiles (Chan *et al.*, 2014; Titlow *et al.*, 2014).

A pesar de contar con estos reportes de múltiples deficiencias neurológicas en los mutantes w^- , éstos son empleados por algunos investigadores como si fuesen controles normales (ej.: Chinchore *et al.*, 2012; Manzanillo *et al.*, 2013; Bulat *et al.*, 2014; Lincoln *et al.*, 2015, Snijder *et al.*, 2015; West *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016; Haddadi *et al.*, 2016). Todos estos antecedentes hacen necesario determinar si los mutantes w^- presentan ND y por tanto no deberían seguir siendo empleados como controles normales en experimentos que emplean moscas transgénicas construidas en un contexto genético mutante nulo para el gen w , fundamentalmente aquellos que estudian procesos de ND y NP.

2. El ojo compuesto de *Drosophila* como modelo de neurodegeneración

El ojo de una *Drosophila* adulta es un órgano compuesto por unas 800 unidades ópticas llamadas ommatidios, cada uno formado por diversos tipos celulares (Figura 20; revisado en Lorincz *et al.*, 2016). La estructura es básicamente la misma que fuese definida con ayuda de microscopía electrónica de transmisión, en otras especies de mosca, por el Dr. Trujillo-Cenoz (Trujillo-Cenóz, 1965).

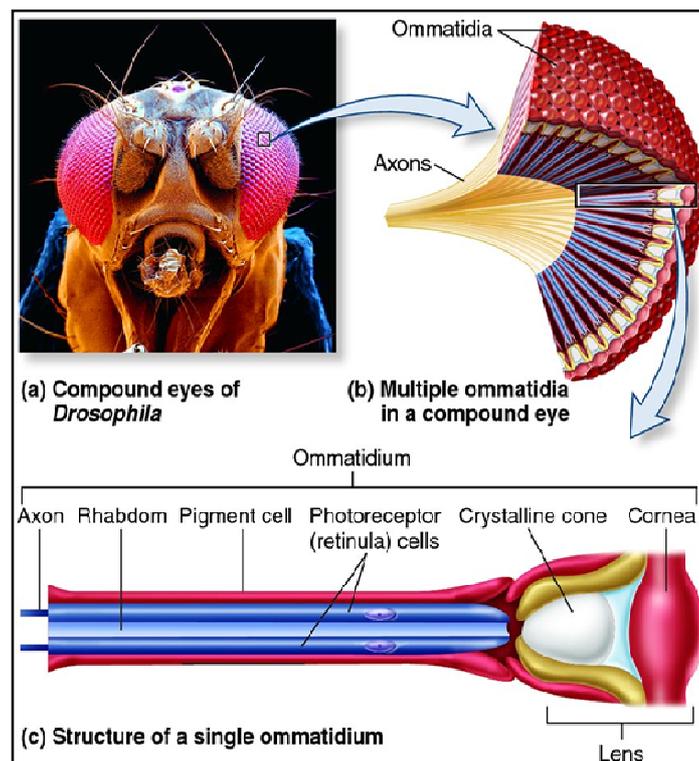


Figura 20 (página anterior). Estructura del ojo compuesto de *Drosophila*. (<http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=1165>).

Cada omatidio contiene 8 células fotorreceptoras (R: retínulas; **Figura 21**). Los fotorreceptores R1-R6 son los más grandes y externos e intervienen en la sensibilidad a la luz, mientras que los fotorreceptores internos R7-R8 son más pequeños e intervienen en la percepción del color y la agudeza visual. Cada fotorreceptor tiene una extensión microvililar apical (rabdómero) orientada hacia el centro del omatidio y rica en la proteína rodopsina, que interviene en la fototransducción (**Figura 20**; revisado en Lorincz *et al.*, 2016). El omatidio contiene también células pigmentales que le permiten un aislamiento óptico de los omatidios circundantes. Estas son las que acumulan el pigmento que le da al ojo su característico color rojo y que no existe en el mutante *w*. Finalmente, entre los fotorreceptores y la superficie del ojo se encuentran las células cono, que secretan los componentes del cono cristalino y los lentes (**Figura 20**).

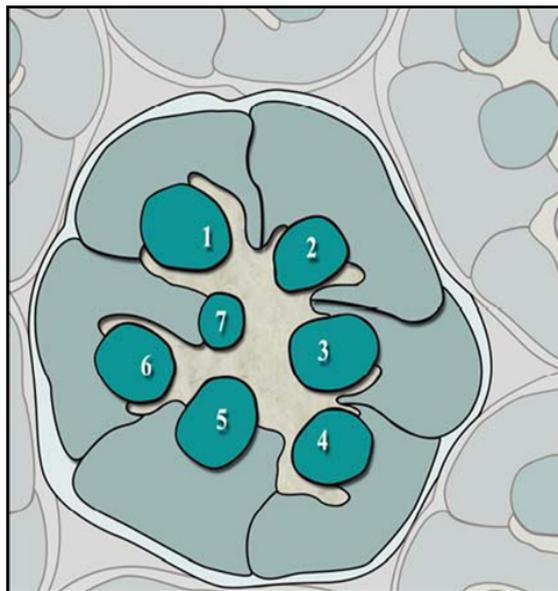


Figura 21. Distribución de los fotorreceptores en un omatidio del ojo compuesto de *Drosophila*. La figura muestra un esquema de los fotorreceptores visibles en un plano. Si bien cada omatidio posee 8 células fotorreceptoras (R1-R8), solo se visualizan usualmente 7 (R1-R7), ya que los rabdómeros de los fotorreceptores R7 y R8 están ubicados a distinta profundidad en el eje óptico no pueden ser vistos simultáneamente en un mismo plano transversal. La zona ilustrada en verde más oscuro representa la región rica en microvellosidades y rodopsina, denominada rabdómero. La proteína White se acumula en la membrana de los gránulos de pigmento visual que rodean estas estructuras. (Imagen adaptada de <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/2/407/htm>).

Ramón y Cajal fue el primero en considerar a la retina como una extensión periférica del SN (revisado en Yang *et al.*, 2015), lo cual es hoy ampliamente aceptado y permite usar a la retina de mosca como un modelo para investigar y modelar el funcionamiento del SN en condiciones normales y patológicas. La gran conservación de la mayoría de los mecanismos celulares y moleculares más fundamentales y la gran facilidad en la detección y análisis de fenotipos mutantes y patologías del ojo compuesto de *Drosophila*, hacen de este órgano un buen modelo para estudiar procesos asociados a ND (**Figura 22**; revisado en Villacampa *et al.*, 2013).

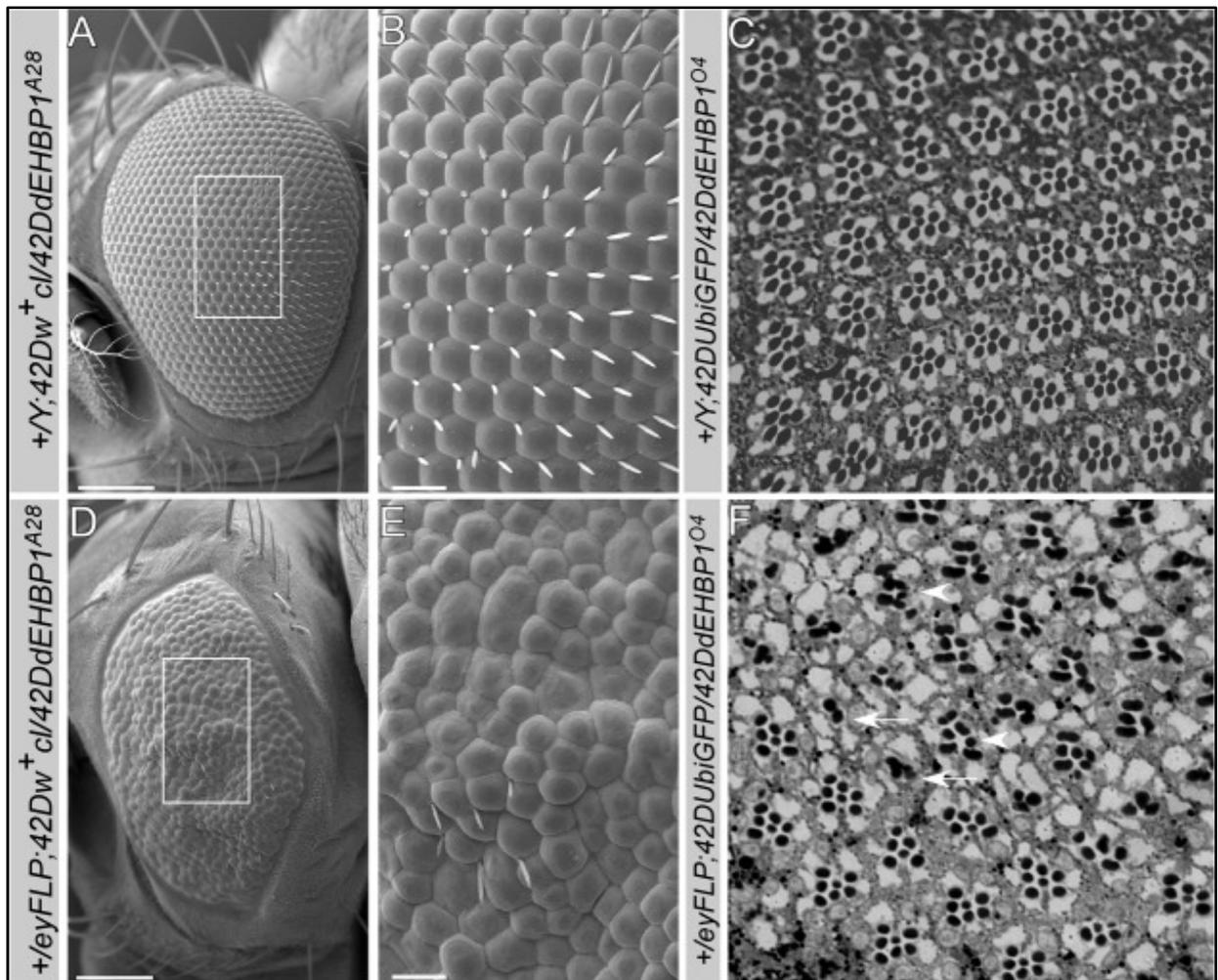


Figura 22. La extraordinaria regularidad de la estructura del ojo de *Drosophila* favorece su uso como modelo para el estudio de procesos degenerativos. (A-C) Estructura de un ojo WT visto mediante microscopía electrónica de barrido y corte histológico. (B) Ampliación del área dentro del rectángulo blanco en A. (D-F) Estructura de un ojo con degeneración retinal, donde se observa que estos mutantes presentan ojos más pequeños (D) y distorsión de los fotorreceptores con omatidios fusionados. (E) Ampliación del área dentro del rectángulo blanco en D. En F) se observan cortes de retina de estos mutantes de ND teñidos con azul de toluidina que presentan variación en el número normal de fotorreceptores al comparar con

C. Las flechas blancas y las cabezas de flechas indican omatidios con menos o más fotorreceptores de lo normal, respectivamente. La barra indica 100 μm (A,D), 20 μm (B,E). Imagen obtenida de Giagtzoglou *et al.*, 2013.

La ND retinal observable en el ojo compuesto de diversos mutantes de *Drosophila* generalmente es acompañada de alteraciones funcionales que pueden investigarse por registros de ERG, comparando moscas mutantes con moscas WT (denominadas a partir de los Objetivos de este Capítulo como w^+) (ver el ejemplo de la **Figura 23**). El ERG de *Drosophila* contiene tres potenciales: 1) potencial ON que muestra la respuesta al estímulo (On transient, **Figura 23**); 2) potencial del receptor (Receptor potential, **Figura 23**); y 3) potencial OFF, que ocurre al cesar el estímulo (Off transient **Figura 23**).

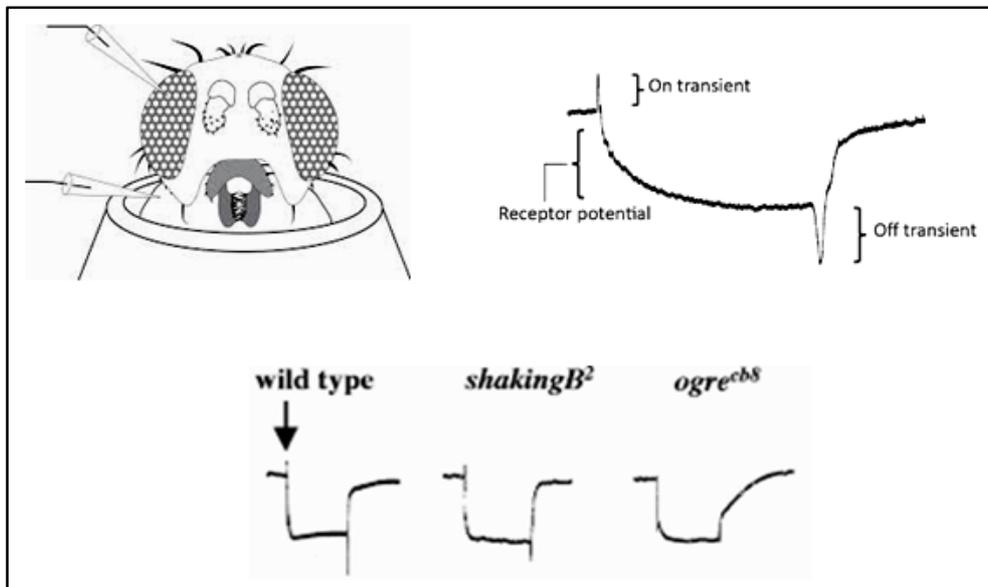


Figura 23. ERGs del ojo compuesto de *Drosophila*. Arriba a la izquierda se muestra la disposición de los electrodos colocados en la mosca para obtener los registros ERG. Arriba a la derecha se muestra un patrón de registro ERG normal con sus tres componentes característicos: potencial On, Off y del receptor. Abajo se muestra un ERG de mosca WT y dos ejemplos de ERG con alteraciones causadas por mutaciones en los genes *shaking* u *ogre*. (Imágenes adaptadas de Vilinsky *et al.*, 2012 y Curtin *et al.*, 2002).

3. Variaciones en el contenido de dopamina y su asociación con neurodegeneración

En los animales, la DA es un neurotransmisor clave para modular la locomoción y la actividad general (Yamamoto & Seto, 2014). En *Drosophila*, algunos mutantes de ND como los mutantes *parkin* presentan niveles reducidos de DA debido a la

disminución de la síntesis de ésta en las neuronas dopaminérgicas o a la reducción del número de dichas células.

Existen publicaciones informando sobre grandes reducciones en los niveles de DA en mutantes *w* (Borycz *et al.*, 2008; Sitaraman *et al.*, 2008), pero que lamentablemente no informan sobre la edad ni el sexo de las moscas estudiadas, ni el momento del día cuando las muestras fueron obtenidas. Considerar estos tres factores podría resultar relevante dado que el gen *w* se ubica en el cromosoma sexual X y que está comprobado que los niveles de DA en *Drosophila* fluctúan a lo largo de su vida (Neckameyer *et al.*, 2000), así como a lo largo del día (Gonzalo-Gómez *et al.*, 2012).

4. Problemas de locomoción y reducción en el largo de vida en condiciones normales y de estrés como indicios de neurodegeneración en mutantes de *Drosophila*

Muchos mutantes de ND en *Drosophila*, presentan problemas de locomoción (revisado en Jaiswal *et al.*, 2012). El ensayo de locomoción más frecuentemente empleado en *Drosophila* es el ensayo de “climbing” (Figura 24), que mide la actividad motora parcialmente dependiente de DA (Riemensperger *et al.*, 2013).

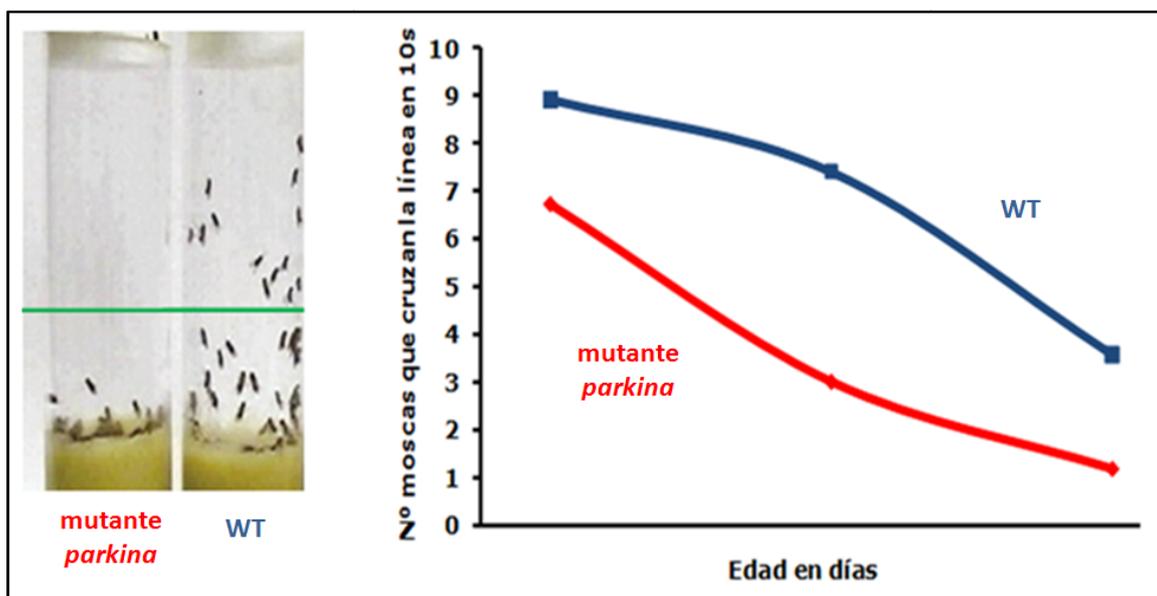


Figura 24. Ensayos de locomoción (climbing) en *Drosophila* para detectar mutantes de neurodegeneración. La figura muestra un ejemplo ilustrativo de resultados de este ensayo para mutantes de ND *parkin* y para moscas WT. A la izquierda se observa claramente que los mutantes *parkin* presentan menor movilidad que las moscas WT ya que al inducir un reflejo geotáxico negativo éstas no sobrepasan la línea verde ubicada

a 8 cm de la base de los tubos. Además, como se observa en el ejemplo de la izquierda, donde se grafica el número de moscas de cada genotipo que sobrepasan la línea verde a tres edades, el deterioro en esta habilidad es progresivo ya que aumenta con la edad de manera más marcada en los mutantes de ND.

Los fenotipos neurodegenerativos en *Drosophila* y el resto de los organismos, también se caracterizan por un acortamiento significativo en el largo de vida de los individuos que padecen la patología respecto a los individuos control (ej.: Lessing & Bonini, 2009; Jaiswal *et al.*, 2012). El ensayo de medición del largo de vida es empleado rutinariamente en *Drosophila* para comparar individuos WT y mutantes, tomando una reducción en el largo de vida como otro posible indicio de ND (**Figura 25**).

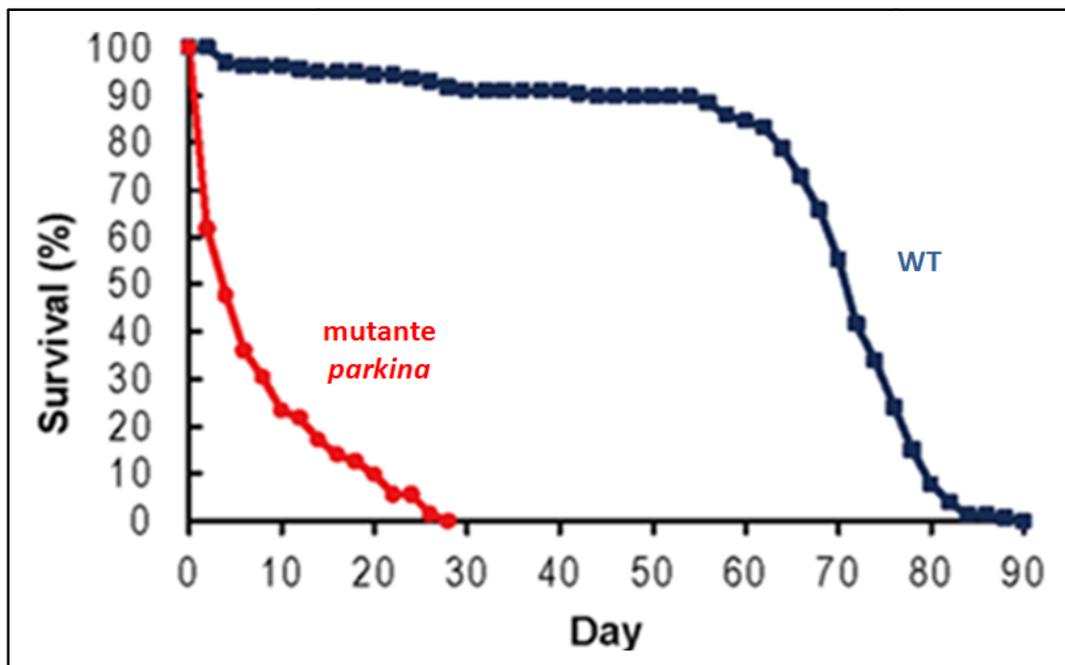


Figura 25. Ensayos de largo de vida en *Drosophila* para detectar mutantes de neurodegeneración. La figura muestra un ejemplo ilustrativo de resultados de este ensayo para mutantes de ND *parkin* y para moscas WT observándose claramente que los mutantes de ND viven significativamente menos que los controles.

Por último, al igual que en otros organismos, los mutantes de *Drosophila* que sufren ND tienen mucha menor tolerancia que las moscas WT a diversas formas de estrés como puede ser la falta de comida o el exceso calórico, la exposición a temperaturas relativamente bajas o altas, o a agentes oxidantes como el paraquato y el peróxido de hidrógeno (Brown *et al.*, 2009; Gruenewald *et al.*, 2009; Landis *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012; Cobb & Cole, 2015; Kim *et al.*, 2015).

HIPÓTESIS CAPÍTULO II

Los mutantes nulos para el gen *w* de *Drosophila* sufren ND.

OBJETIVO GENERAL CAPÍTULO II

Investigar si los mutantes w^- de *Drosophila* sufren ND.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO II

1. Analizar la histología y fisiología del ojo de mutantes w^- de *Drosophila* en comparación con moscas w^+ para determinar si los mutantes presentan degeneración retinal.
2. Analizar el contenido de DA de mutantes w^- en comparación con el de moscas w^+ .
3. Analizar si los mutantes w^- tienen deficiencias en la locomoción respecto a las moscas w^+ .
4. Analizar si los mutantes w^- mantenidos en condiciones estándar o sometidos a diversos tratamientos de estrés tienen alterado su largo de vida en comparación a las moscas w^+ .
5. Analizar si la expresión de una copia *mini- w^+* en un contexto mutante w^- rescata el fenotipo de ojo normal.

METODOLOGÍA CAPÍTULO II

1. Cepas de *Drosophila* y condiciones de laboratorio

Para los diferentes experimentos presentados en este capítulo se utilizaron machos y/o hembras vírgenes de *Drosophila* de las siguientes cepas: w^{1118} , w^1 , $mini-w^+$ en un contexto genómico w^{1118} ($w^{1118};\{P[w[+mc]=UAS-GFP.S65T]\}IT10$), y dos cepas w^+ : Oregon R (<http://flybase.org/reports/FSsn0000276.html>) y Vallecas (Morata & García-Bellido, 1973). Las moscas fueron criadas en condiciones estándar: 25°C, ciclos de 12:12 horas de luz:oscuridad y medio de cultivo estándar. Para la separación de sexos los individuos fueron anestesiados con óxido nítrico (Inject+Matic Sleeper) o con CO₂.

2. Histología retinal

Los cortes histológicos de retina fueron obtenidos a partir de hembras vírgenes de los genotipos descritos anteriormente y se estudiaron tres edades: 5, 15 y 30 días (n=5 por genotipo y edad). Las moscas fueron anestesiadas y decapitadas en una gota de solución salina sobre un portaobjetos. La proboscis fue extirpada para facilitar la entrada del fijativo a la cápsula quitinosa de la cabeza que rodea al cerebro y los ojos. La fijación del tejido se realizó por inmersión de las cabezas durante la noche en una solución fría de tampón fosfato salino PBS 0.1 M conteniendo 2.5% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído (pH 7.3). Posteriormente las cabezas fueron lavadas repetidas veces en PBS y post-fijadas en 0.5% de tetróxido de osmio durante 1 hora. Las muestras fueron lavadas en agua y sometidas a una deshidratación progresiva con etanol al 50%, 70%, 80%, 90% y dos veces 100% en intervalos de 10 minutos y dos pasajes por acetona de 20 minutos cada uno. Las cabezas fueron entonces impregnadas en resina (AGAR 100, AGAR Scientific) y colocadas finalmente en moldes conteniendo resina pura que luego fue polimerizada durante dos días a 60°C. Usando un ultramicrotomo RMX MT-X y cuchillas de vidrio se hicieron cortes histológicos de 1 µm de espesor. Estos cortes fueron realizados siempre en la misma región y profundidad del ojo. Fueron posteriormente montados con medio DPX (Sigma) en portaobjetos limpios y teñidos con una solución borácica de azul de toluidina al 0.1%

para ser observados al microscopio (Olympus IX81) y fotografiados (cámara Olympus DP71). Las microfotografías fueron procesadas mediante Adobe Photoshop.

3. Medición de lagunas

Analizamos la presencia de lagunas dentro de los cortes histológicos de retinas provenientes de tres hembras vírgenes de las cepas w^{1118} y w^+ de 5, 15 y 30 días de edad. Para cada genotipo y edad, registramos el número de lagunas, medimos su área y calculamos el área promedio de lagunas (μm^2). Las moscas w^+ nunca presentaron lagunas. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATISTICA (7.0 Version, StatSoft, Inc.). El test de Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.*, 1968) fue usado para corroborar el supuesto de distribución normal de las muestras y el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974) para corroborar el supuesto de homogeneidad de varianzas de las muestras. En aquellos casos donde confirmamos ambas condiciones, usamos el test paramétrico de ANOVA de una vía (número de lagunas, w^+ 30 días (d) vs w^{1118} 30d). En el resto de los casos empleamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) (número y area de lagunas, w^{1118} 5d vs w^{1118} 15d vs w^{1118} 30d) y el test de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947) como análisis *post-hoc*, o directamente el test de Mann-Whitney (área de lagunas, w^{1118} 30d vs w^+ 30d).

4. Mediciones del tamaño y número de rabdómeros

Para cuantificar el número de fotorreceptores se registró la presencia de los rabdómeros R1-R7 y se midió su diámetro observable en cada corte histológico (ejemplo en la **Figura 21**) en hembras vírgenes de las cepas w^{1118} y w^+ de 5 y 30 días de edad (n=3 de cada genotipo y edad, 6 omatidios contiguos por mosca). Los resultados de las mediciones fueron comparados estadísticamente (STATISTICA 7.0 Version, StatSoft, Inc.), usando el test de normalidad Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.*, 1968), el test de homocedasticidad de Levene (Brown & Forsythe, 1974) y posteriormente el test paramétrico de ANOVA de dos vías (diámetro de rabdómeros R1-R7 entre diferentes genotipos: w^+ 5d vs w^{1118} 5d y w^+ 30d vs w^{1118} 30d; o entre diferentes edades de un mismo genotipo, w^+ 5d vs w^+ 30d y w^{1118} 5d vs w^{1118} 30d). Para los análisis *post-hoc* empleamos el test exacto de Fisher o el test de Bonferroni.

También calculamos el porcentaje de omatidios con los siete rabdómeros (el número total de rabdómeros que pueden ser observados a este nivel de la retina en moscas control), a partir de cortes histológicos de retina obtenidos de tres hembras vírgenes de las cepas w^{1118} y w^+ de 5 y 30 días de edad, a partir de tres hembras vírgenes de las cepas w^1 y $mini-w^+$ de 30 días de edad (cerca de 200 omatidios por genotipo y edad). El test de Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.*, 1968) fue usado para corroborar el supuesto de distribución normal de las muestras y el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974) para corroborar el supuesto de homogeneidad de varianzas de las muestras. En aquellos casos donde confirmamos ambas condiciones, usamos el test paramétrico de ANOVA de dos vías para analizar si existían diferencias significativas en el porcentaje de omatidios con siete rabdómeros entre genotipos de la misma edad (w^+ 5d vs w^{1118} 5d y w^+ 30d vs w^{1118} 30d) y entre diferentes edades de un mismo genotipo (w^+ 5d vs w^+ 30d y w^{1118} 5d vs w^{1118} 30d). Para los análisis *post-hoc* empleamos el test exacto de Fisher o el test de Bonferroni. De no cumplirse ambos supuestos, empleamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) (w^+ 30d vs w^{1118} 30d vs w^1 30d) y el test de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947) como análisis *post-hoc*.

5. Electroretinogramas

Para estos experimentos, realizados en colaboración con los Dres. Angel Caputi y Pedro Aguilera (IIBCE), se usaron moscas hembras vírgenes de dos genotipos (w^{1118} y w^+) y dos edades (5 y 30 días; n=4 por cada genotipo y edad). Las moscas fueron inmovilizadas por frío y colocadas dentro de una punta de micropipeta de 1 ml, tamaño adecuado para que la cabeza de la mosca quede fija y expuesta. Se introdujo luego dentro de ese soporte, hasta tocar el abdomen de la mosca, un pequeño tapón de algodón embebido en solución salina, que estabiliza el cuerpo de la mosca dentro de la punta de pipeta y actúa como electrodo de referencia. Luego se colocó la preparación bajo un microscopio (Axioscope, Zeiss) y se esperó unos 10 minutos de adaptación antes de comenzar la estimulación con luz y el registro del ERG mediante electrodos de vidrio rellenos con solución salina. El electrodo activo se colocó sobre la córnea del ojo derecho y el de referencia tocando el cuerpo de la mosca (ver ejemplo **Figura 23**). Se estimuló la córnea con 50 pulsos rectangulares de luz LED

blanca (15 mA) de 130 milisegundos de duración cada uno, separados por intervalos de 5 segundos. El voltaje del electrodo fue amplificado usando Axoclamp 2B (Axon Instruments) y registrado de manera continua a 20 kHz con el programa Pclamp (Axon Instruments). Finalmente, se promediaron por genotipo y edad los registros post-estímulo de cada mosca y se solaparon en un único trazo de registro para obtener una mejor comparación visual. Los resultados fueron analizados con el test de rangos de Willcoxon (Wilcoxon, 1945).

6. Medición del contenido de dopamina por HPLC

Estos experimentos requirieron análisis de DA por High Performance Liquid Chromatography (HPLC) a cargo del servicio de HPLC del IIBCE, bajo la responsabilidad del Dr. Juan Andrés Abín. Se analizaron cerebros de hembras w^+ y mutantes w^{1118} de 5 y 30 días de edad (n=15 cabezas por genotipo y edad). Congelamos las moscas en nitrógeno líquido, las decapitamos por agitación fuerte con vórtex y almacenamos las cabezas a -70°C hasta ser analizadas por el servicio. Posteriormente las cabezas de cada muestra se homogeneizaron en 250 μl de ácido perclórico frío y se procesaron de acuerdo a la literatura (Borycz *et al.*, 2008). Se centrifugaron los homogeneizados por 15 minutos a 15.000 g y se tomaron 10 μl de sobrenadante de cada muestra para ser inyectados en la columna de HPLC (C18(2) 100Ax2.0 mm; tamaño de partícula de 3 μm ; Phenomenex, Luna) a través de una válvula (Rheodyne, Modelo 2175). El sistema de cromatografía se compone de una unidad de desgasificación (DGU-20A5R, Shimadzu), una bomba binaria de HPLC (#1525, Waters) y un detector electroquímico con control de temperatura (#2465, Waters). La fase móvil se compone de ácido monocloroacético 0.1 M, octil sulfato de sodio 0.69 mM, EDTA 7 μM a pH 3 y 6% acetonitrilo (vol/vol). El buffer se filtró (filtro Millipore 0.2 μm), desgasificó y bombeó a través del sistema a una tasa de flujo de 0.3 ml/minuto. La DA fue detectada a un potencial de oxidación de +650 mV vs Ag/AgCl. La columna analítica y el flujo celular electroquímico fueron mantenidos a 35°C . Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa STATISTICA (7.0 Version, StatSoft, Inc.).

7. Ensayo de locomoción (climbing)

Para los ensayos de climbing usamos hembras vírgenes y machos de las cepas w^{1118} y w^+ de 5, 15, 25 y 30 días de edad. Se analizaron $n=30-50$ moscas por genotipo, sexo y edad, separadas en tubos de 10 individuos por condición. Este ensayo se basa en un robusto reflejo de geotaxis negativa (las moscas se mueven en dirección contraria al vector gravitacional de la Tierra cuando son molestadas). Cuando se obliga a una mosca a caer hacia el fondo del tubo de cultivo por medio de un golpe suave (se golpea el fondo del tubo sobre la mesa de trabajo) las moscas comienzan inmediatamente a trepar por la pared del tubo hacia su borde superior, lo cual permite detectar eventuales deficiencias en la capacidad para trepar. Las moscas fueron mantenidas durante los 30 días del experimento en medio de cultivo fresco, cambiándolas a un tubo nuevo cada cinco días. Primero se agitaron los tubos con moscas de cada muestra (10 réplicas por condición) ocho veces consecutivas para hacer caer las moscas al fondo de los tubos antes de que comenzaran a trepar. Diez segundos después se registró el número de moscas que habían trepado hasta atravesar una línea marcada a 8 cm de la base del tubo (ver ejemplo **Figura 24**). Este procedimiento fue repetido 10 veces para cada tubo, dejando un intervalo de 1 minuto entre cada registro. Las diez medidas por tubo fueron promediadas para la representación gráfica de los resultados (por genotipo, sexo y edad) y para ser comparadas estadísticamente. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATISTICA (7.0 Version, StatSoft, Inc.). El test de Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.*, 1968) fue usado para corroborar el supuesto de distribución normal de las muestras y el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974) para corroborar el supuesto de homogeneidad de varianzas de las muestras. En aquellos casos donde confirmamos ambas condiciones (análisis de hembras), usamos el test paramétrico de ANOVA de dos vías para analizar si existían diferencias significativas en la habilidad de trepar entre genotipos de la misma edad (w^+ 5d vs w^{1118} 5d, w^+ 15d vs w^{1118} 15d, w^+ 25d vs w^{1118} 25d y w^+ 30d vs w^{1118} 30d) y entre diferentes edades de un mismo genotipo (w^+ 5d vs w^+ 15d vs w^+ 25d vs w^+ 30d y w^{1118} 5d vs w^{1118} 15d vs w^{1118} 25d vs w^{1118} 30d). Para los análisis *post-hoc* empleamos el test exacto de Fisher o el test de Bonferroni. De no cumplirse ambos supuestos (análisis de machos) empleamos el test no paramétrico de

Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) (w^+ 5d vs w^{1118} 5d, w^+ 15d vs w^{1118} 15d, w^+ 25d vs w^{1118} 25d y w^+ 30d vs w^{1118} 30d y w^+ 5d vs w^+ 15d vs w^+ 25d vs w^+ 30d y w^{1118} 5d vs w^{1118} 15d vs w^{1118} 25d vs w^{1118} 30d). El test de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947) se usó como análisis *post-hoc*.

8. Ensayos de largo de vida

Utilizamos hembras vírgenes y machos de las cepas w^{1118} y w^+ seleccionados inmediatamente tras la eclosión. Se emplearon entre 20 y 100 moscas por genotipo y sexo separadas en tubos de 10 individuos por condición. Para el experimento de 25°C n=100; para el resto de los análisis con tratamiento previo de inductores de estrés, ver detalle en la **Sección 9**. Las moscas fueron mantenidas durante todo el experimento en medio de cultivo fresco, cambiándolas a un tubo nuevo cada cinco días para mantenerlas en buenas condiciones. Se contabilizó diariamente el número de moscas muertas por tubo hasta la muerte de todos los individuos en los tubos de cada condición y genotipo. Para cada genotipo, sexo y condición experimental, calculamos los valores de vida media (edad en que muere el 50% de las moscas). Los resultados fueron registrados en tablas Excel y graficados por genotipo, sexo y ensayo de estrés. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATISTICA (7.0 Version, StatSoft, Inc.). El test de Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.*, 1968) fue usado para corroborar el supuesto de distribución normal de las muestras y el test de Levene (Brown & Forsythe, 1974) para corroborar el supuesto de homogeneidad de varianzas de las muestras. En aquellos casos donde confirmamos ambas condiciones usamos el test paramétrico de ANOVA de dos vías para analizar si existían diferencias en la vida media entre genotipos y condición de tratamiento. Para los análisis *post-hoc* empleamos el test exacto de Fisher o el test de Bonferroni.

9. Ensayos de estrés: dieta enriquecida en azúcar, ayuno y tratamiento con los agentes oxidantes paraquato y peróxido de hidrógeno

Se comparó la tolerancia a diversas formas de estrés en machos y hembras vírgenes de las cepas w^{1118} y w^+ , colectadas en el primer día de vida. Las moscas de cada genotipo y sexo fueron mantenidas en tubos de aproximadamente 10 moscas cada uno. Para el ensayo de suplementación de dextrosa en la dieta (n=60 moscas por

genotipo y sexo), las moscas fueron colocadas en tubos con comida conteniendo un filtro de papel embebido en una solución acuosa de dextrosa al 5%. Para el ensayo de ayuno (n=60 moscas por genotipo y sexo), las moscas fueron colocadas en tubos sin comida conteniendo un filtro de papel embebido en agua para evitar que tuvieran sed o se desecaran. Para los tratamientos con los agentes oxidantes paraquato o peróxido de hidrógeno (n=50 moscas y n=20 moscas por genotipo, sexo y concentración de paraquato o peróxido de hidrógeno, respectivamente), las moscas fueron primero sometidas a ayuno durante la noche previa al inicio del experimento (Wang *et al.*, 2008), tras lo cual fueron colocadas en tubos conteniendo un filtro de papel embebido en una solución acuosa de dextrosa al 5% con distintas concentraciones de paraquato (2 mM, 10 mM ó 20 mM) o de peróxido de hidrógeno (0.5% ó 5%). Para cada tubo (10 moscas) se calculó la vida media por tratamiento, genotipo y sexo, parámetro que fue comparado estadísticamente usando el test paramétrico de ANOVA de dos vías. Para los análisis *post-hoc* empleamos el test exacto de Fisher o el test de Bonferroni.

10. Neutralización óptica de la córnea

Para monitorear la organización retinal en moscas de la cepa w^{1118} , $mini-w^+$ y w^+ de 30 días de edad, empleamos el método de neutralización óptica de la córnea siguiendo los protocolos originales descritos por Franceschini & Kirschfeld, 1971, y Franceschini *et al.*, 1981, para observar los rabdómeros. Este método emplea la luz transmitida de un microscopio óptico para iluminar los rabdómeros dentro de los omatidios en su parte proximal. Dicha luz los atraviesa y luego se refleja por la parte distal del fotoreceptor, permitiendo su visualización. Los pasos básicos de esta técnica son los siguientes: anestesia y decapitación de las moscas; montaje de las cabezas en un portaobjetos con una gota de esmalte de uñas transparente; iluminación de los ojos bajo un microscopio invertido (Olympus IX81) y visualización de sus rabdómeros con el objetivo 40x. Tomamos fotografías de las muestras con una cámara digital anexada al microscopio (Olympus DP71) y las procesamos mediante el programa de análisis de imágenes Adobe Photoshop.

RESULTADOS CAPÍTULO II

A continuación resumiré los principales resultados correspondientes a este capítulo de la tesis, en relación al orden de los objetivos específicos que expuse anteriormente. Quisiera destacar que estos resultados fueron publicados en *Frontiers in Neuroscience* (Ferreiro *et al.*, 2018, se adjunta al final de la tesis). Muchas de las imágenes presentadas a continuación son parte de esa publicación por lo que mantuve el idioma inglés, respetando la versión original.

1. Dos mutaciones del gen *white* de *Drosophila* causan una degeneración retinal progresiva

A continuación, presentaré los resultados publicados originalmente en una única figura, desglosados en paneles (**Figura 26A-F, 26G, 26H-I, 26J y 26K**) para facilitar la visualización detallada de estos resultados.

La **Figura 26A-F** muestra los resultados de los cortes histológicos realizados en moscas mutantes w^- y w^+ de 5, 15 y 30 días de edad. Se empleó la cepa mutante w^{1118} que tiene una mutación nula del gen w , siendo éste el mutante mayormente empleado en la construcción de moscas transgénicas. Se analizaron tres edades para determinar si el fenotipo se agrava con la edad, característica que define a todas las neurodegeneraciones. Se observó que ya a la edad de 5 días los mutantes w^{1118} exhiben un fenotipo moderado de degeneración retinal con una desorganización del patrón regular característico y con algunas lagunas que por su forma y tamaño probablemente reflejan la pérdida de algunos omatidios (**Figura 26D**). Este fenotipo, nunca observado en las moscas control (**Figura 26A-C**), se agrava a medida que los mutantes envejecen (15d y 30d), observándose una mayor desorganización de la estructura general de la retina y lagunas progresivamente más grandes (ver asteriscos negros en la **Figura 26E, F** y el área promedio de las lagunas en función de la edad en la **Figura 26G**). En las moscas mutantes w^{1118} de más edad se observó que algunas de las lagunas se encuentran ocupadas por un material acidófilico semejante a una cicatriz glial (señaladas con asteriscos blancos en la **Figura 26F**).

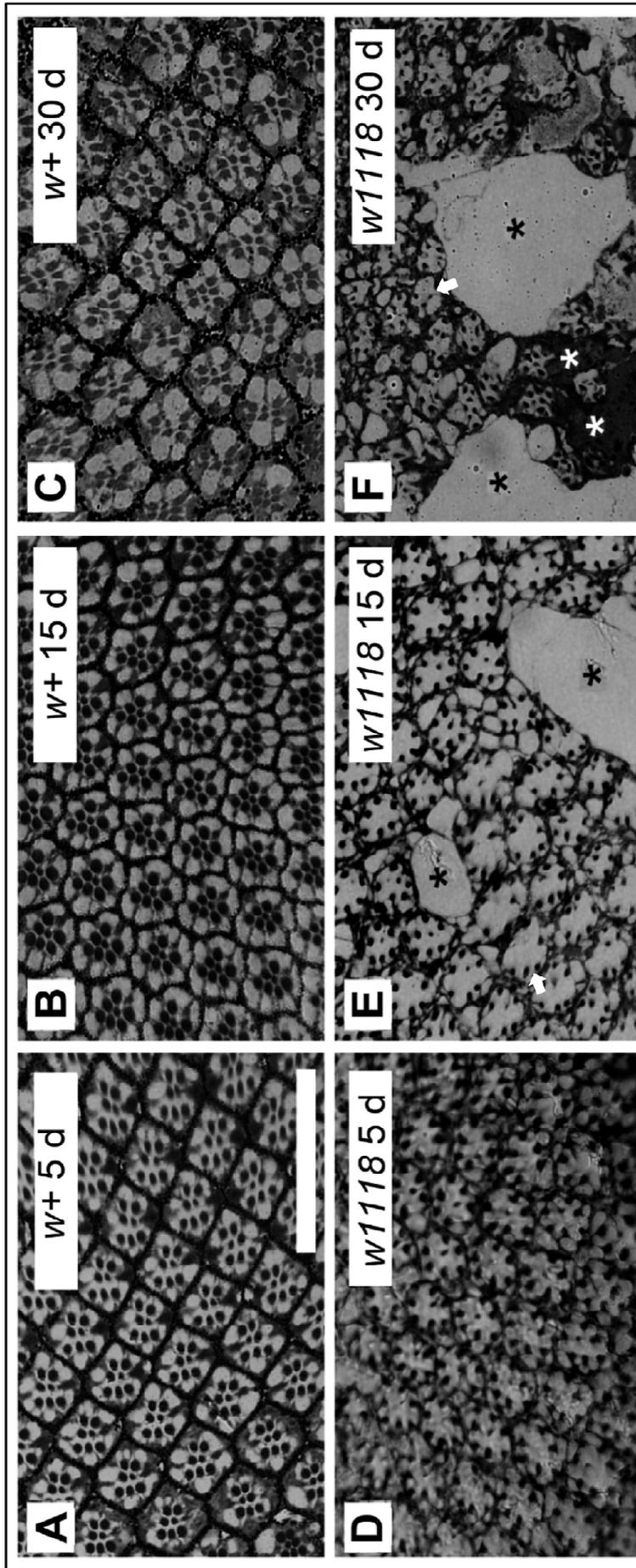


Figura 26 A-F (página anterior). Los mutantes w^{1118} de *Drosophila melanogaster* presentan degeneración retinal progresiva. Los cortes histológicos de retina obtenidos de moscas w^+ (A-C) y mutantes w^{1118} (D-F) de 5, 15 y 30 días de edad muestran que los mutantes w^{1118} sufren una degeneración retinal progresiva. A 5 días de edad (D) ya se observa que la retina de los mutantes presenta una desorganización moderada del patrón geométrico de omatidios, que aumenta a 15 (E) y 30 (F) días. En estas últimas edades algunos omatidios carecen de uno o más rabdómeros (flechas blancas en E y F) e incluso se observan espacios vacíos o lagunas que denotan la falta de omatidios completos (asteriscos negros en E y F) y que en algunos casos parecen estar ocupados por glía (asteriscos blancos en F). En todos los paneles se usó la misma magnificación (ver la escala mostrada en A que representa 40 μm).

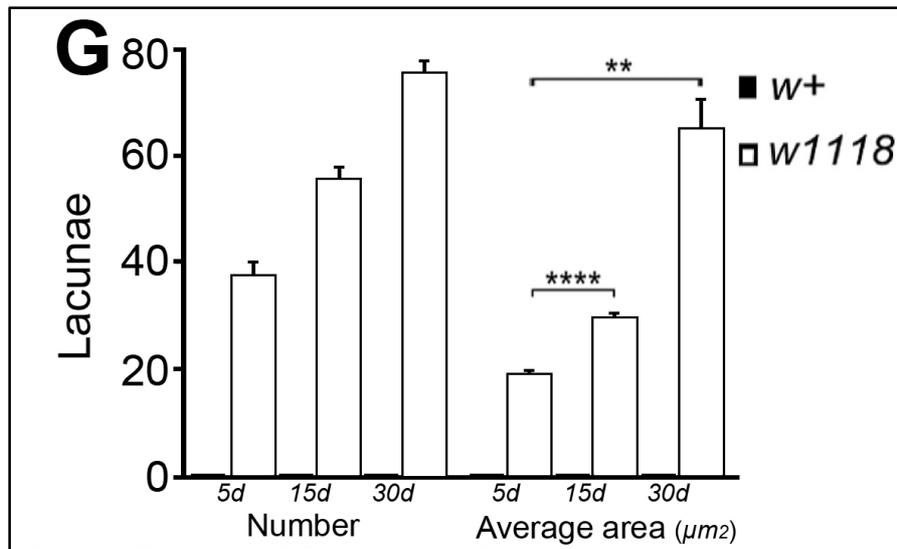


Figura 26 G. Los mutantes w^{1118} presentan degeneración retinal progresiva. (G) Representación gráfica del número y tamaño de las lagunas encontradas exclusivamente en los mutantes w^- . El número de lagunas muestra una tendencia a aumentar con la edad (w^{1118} 5d vs 15d vs 30d, test de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$), mientras que su tamaño aumenta de manera significativa con la edad (test de Kruskal-Wallis, *post-hoc* usando test de Mann-Whitney, w^{1118} 5d vs 15d, **** $p < 0,0001$; w^{1118} 5d vs 30d ** $p < 0,01$). Las barras indican el error estándar de la media (s.e.m.).

Además de estar frecuentemente asociados a una desorganización del tejido (ver el ejemplo de la **Figura 21**), los procesos degenerativos en la retina pueden incluir desaparición de fotorreceptores por apoptosis. Por este motivo se decidió inicialmente usar los cortes histológicos para contar el número de fotorreceptores. En el transcurso de esos estudios se observó que el tamaño de los rabdómeros parecía estar disminuído en la retina mutante w^- , especialmente en las edades más avanzadas, por lo cual se decidió medir su diámetro, obteniendo así datos sobre un parámetro que

generalmente no es estudiado porque demanda mucho tiempo. Descubrimos que el tamaño de estos rabdómeros se reduce con la edad en ambos genotipos (w^+ 5d vs 30d y w^{1118} 5d vs 30d, $***p < 0,001$ y $**p < 0,01$). En ambas edades, los rabdómeros del mutante son más pequeños que los de las moscas normales (w^{1118} vs w^+ a 5d y 30d, $***p < 0,001$ y $**p < 0,01$, **Figura 26H**). También encontramos que mientras que en las moscas WT todos los omatidios tenían una dotación completa de fotoreceptores R1-R7, ésta estaba reducida en el 60% de los omatidios de las moscas mutantes w^{1118} , siendo el porcentaje de omatidios con la totalidad de fotoreceptores observables a los 5 días $w^+ = 99,5\%$ vs $w^{1118} = 40\%$ y a los 30 días $w^+ = 96\%$ vs $w^{1118} = 44\%$ (**Figura 26I**).

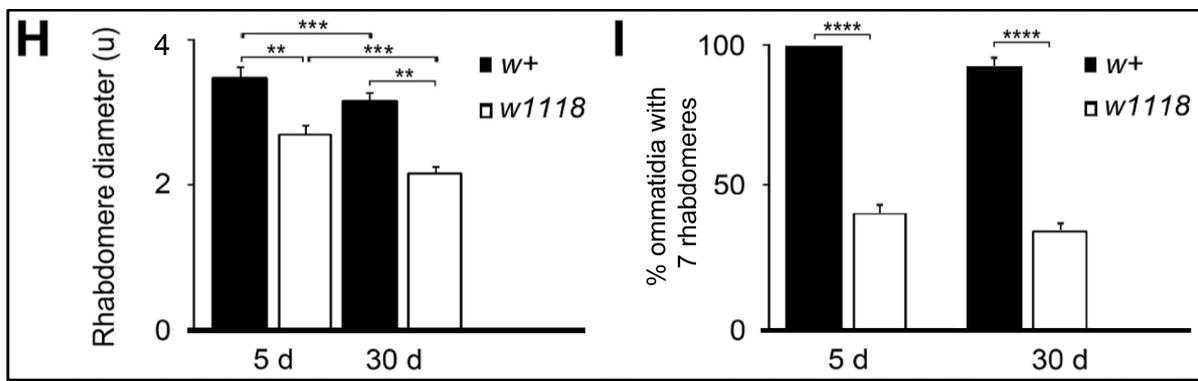


Figura 26 H-I. Los mutantes w^{1118} presentan degeneración retinal progresiva. (H) El panel muestra el gráfico correspondiente al diámetro medio de los rabdómeros R1 a R7 (en $\mu\text{m} \pm \text{s.e.m.}$) de hembras w^+ (Vallecas) y w^{1118} de 5 y 30 días de edad. El tamaño de estos rabdómeros se reduce con la edad en ambos genotipos (w^+ 5d vs 30d y w^{1118} 5d vs 30d, ANOVA de dos vías, Bonferroni *post-hoc*, $***p < 0,001$ y $**p < 0,01$). En ambas edades, los rabdómeros del mutante son más pequeños que los de las moscas control (w^{1118} vs w^+ a 5d y 30d, ANOVA de dos vías; Bonferroni *post-hoc*, $***p < 0,001$ y $**p < 0,01$). Las barras indican el s.e.m. (I) Representación gráfica del porcentaje de omatidios que presentan 7 rabdómeros en hembras w^+ y w^{1118} de 5 y 30 días de edad. Los mutantes w^{1118} de ambas edades tienen significativamente menos omatidios con 7 rabdómeros respecto a las moscas control de la misma edad (w^{1118} vs w^+ a 5d y 30d, w^{1118} 5d vs 30d y w^+ 5d vs 30d, ANOVA de dos vías, $p < 0,0001$; *post-hoc* test de Fisher, $****p < 0,0001$). No existieron diferencias significativas en el número de omatidios con 7 rabdómeros entre diferentes edades de un mismo genotipo. Las barras indican el s.e.m.

También analizamos un segundo alelo mutante (w^1) a una edad avanzada (**Figura 26J-K**). La manifestación de un mismo tipo de fenotipo en dos alelos de un determinado gen refuerza la idea de que la falta de este gen es responsable del fenotipo mutante, porque disminuye la probabilidad de que el fenotipo observado inicialmente se deba a otros factores genéticos. Los sectores con omatidios faltantes o

lagunas también se observaron en los mutantes w^1 aunque con menor frecuencia, probablemente porque se trata de un alelo hipomorfo, mientras que el w^{1118} constituye una mutación nula, que debería causar fenotipos más graves (ver asteriscos negros en la **Figura 26J**).

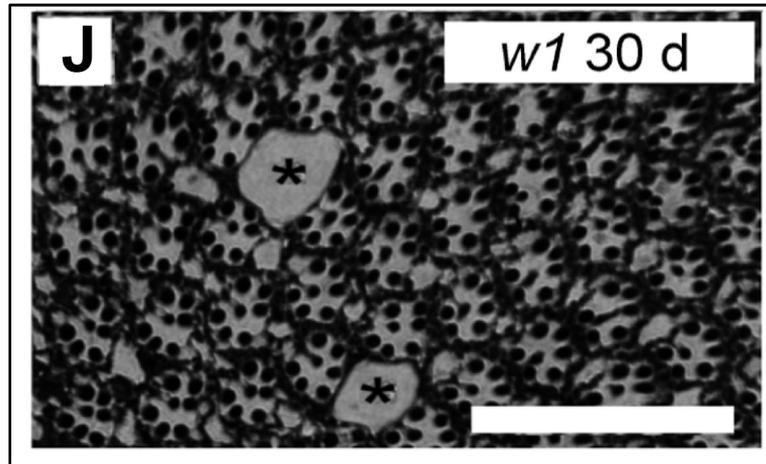


Figura 26 J. Los mutantes w^1 presentan degeneración retinal. (J) Los cortes histológicos de retina obtenidos de moscas mutantes w^1 de 30 días de edad muestran un fenotipo degenerativo similar al de los mutantes w^{1118} , aunque más leve. Se observaron también espacios vacíos o lagunas que denotan la falta de omatidios completos (asterisco negro). La escala representa 40 μm .

A diferencia de lo observado en mutantes w^{1118} (**Figura 26I**), los mutantes w^1 de 30 días tienen un número similar de omatidios con 7 rabdómeros respecto a las hembras w^+ de la misma edad (w^{1118} vs w^+ vs w^1 a 30d, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, **Figura 26K**). En contraste, los mutantes w^1 de 30d presentan un número y diámetro de lagunas similar a los mutantes w^{1118} de la misma edad (w^{1118} 30d vs w^1 30d, $p > 0,05$, **Figura 26K**).

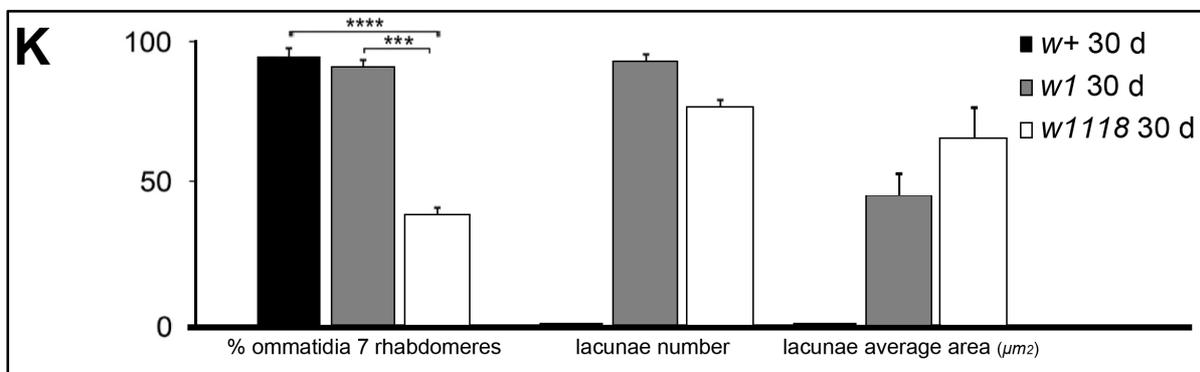


Figura 26 K. Los mutantes w^1 presentan degeneración retinal. (K) A diferencia de lo observado en mutantes w^{1118} , los mutantes w^1 de 30 días tienen un número similar de

omatidios con 7 rabdómeros respecto a las hembras w^+ de la misma edad (w^{1118} vs w^+ vs w^1 a 30d, ANOVA de una vía, $p < 0,0001$; Bonferroni *post-hoc*, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$). Los mutantes w^1 de 30d presentan un número y diámetro de lagunas similar a los mutantes w^{1118} de la misma edad (w^{1118} 30d vs w^1 30d, ANOVA de una vía y test de Mann-Whitney, respectivamente, $p > 0,05$). Las barras indican el s.e.m.

2. Las mutaciones en white afectan la función retinal

El fenotipo degenerativo observado en la retina de los mutantes, con desorganización y pérdida de fotorreceptores nos indujo a investigar la hipótesis de que la mutación en w debería afectar negativamente la función retinal. Esto puede ser analizado por medio de ERG (Belušič, 2011).

Existen publicaciones previas de patrones de ERG anormales en mutantes w^- de *Drosophila* (Stark & Wasserman, 1972; Pak & Lidington, 1974; Wu & Wong, 1977; Belušič, 2011), pero que no explicitan ni la edad ni el sexo de las moscas empleadas en los experimentos y a menudo se estudiaron en combinación con otras mutaciones. Además, en esos estudios no se informa sobre la edad de las moscas analizadas y nuestros resultados histológicos exigían investigar la posibilidad de que el ERG de los mutantes w^- se agravase con la edad, por lo que realizamos ERGs en hembras w^+ y mutantes w^{1118} de 5 y 30 días de edad (**Figura 27**).

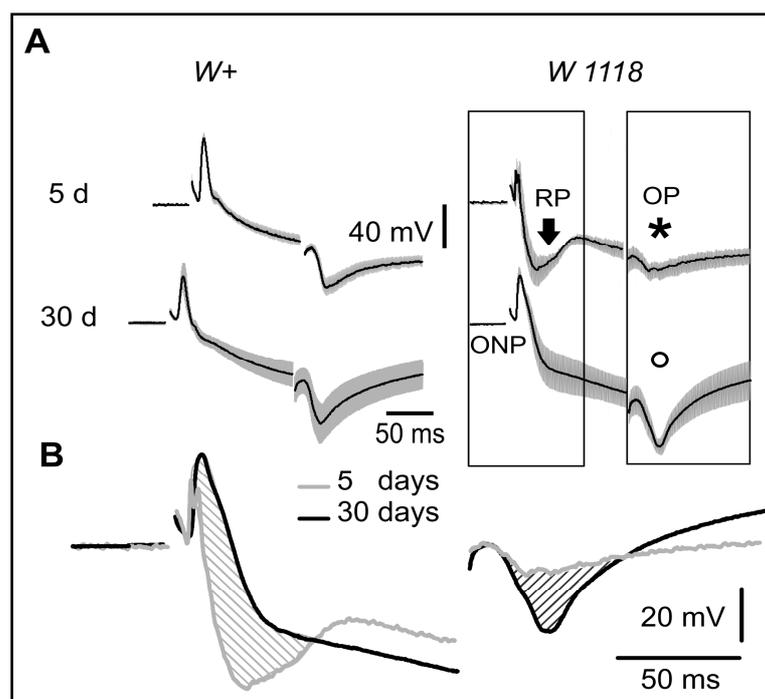


Figura 27 (página anterior). Los mutantes w^{1118} presentan un electroretinograma atípico. (A) Cada panel muestra el ERG de cuatro moscas de los genotipos w^+ y w^{1118} de 5 (5d) y 30 días (30d). ONP: potencial ON; RP: potencial del receptor; OP: potencial OFF. La flecha negra muestra la respuesta masiva (RP) de los fotorreceptores de los mutantes w^{1118} de 5 días, ausente en los mutantes de 30 días. La amplitud del OP de moscas mutantes w^{1118} de 5 días es menor que la de los w^+ de la misma edad (asterisco negro, comparar paneles superiores), pero no entre las moscas de 30 días (círculo blanco, comparar paneles inferiores). (B) Comparación del promedio de respuestas ERG en las moscas mutantes w^{1118} de 5 y 30 días, mostrando las principales diferencias electrofisiológicas debido a la edad y la ND: la reducción en el RP (panel izquierdo, área rayada en gris) y la recuperación de la OP (panel derecho, área rayada en gris). Las barras verticales indican el s.e.m. en los puntos donde las muestras fueron comparadas estadísticamente.

El ERG de moscas w^+ y mutantes w^- usualmente se diferencia en la forma y duración del potencial del receptor (RP), observándose una gran depolarización en los mutantes. Esto indica una mayor respuesta de los fotorreceptores a la luz debido a la ausencia de pigmentos (revisado en Belušič, 2011). Nuestros resultados confirman que el RP de moscas w^- es mayor que el de moscas w^+ de 5 días, producto de esta gran depolarización, señalada con una flecha en la parte derecha del panel superior de la **Figura 27A** ($p < 0.05$). Esta diferencia no se observa en las moscas de 30 días (**Figura 27A**, paneles inferiores izquierdo y derecho). También detectamos diferencias en el potencial Off (OP) entre moscas w^+ y mutantes de 5 días, siendo éste mucho menor en magnitud en los mutantes w^- (ver asterisco que compara la parte izquierda y derecha de los paneles superiores de la **Figura 27A**; $p < 0.05$). Esta diferencia no se observa en las moscas de 30 días (**Figura 27A**, paneles inferiores). Debido a que en los mutantes w^- , el potencial On (ONP) se solapaba con el RP no fue posible comparar este potencial.

El análisis ERG también reveló un efecto de la edad en ambos genotipos (5 días vs 30 días, comparar entre sí las partes superiores e inferiores de los paneles izquierdo y derecho de la **Figura 27A**). Los principales efectos de la edad observados en los mutantes w^- fueron: 1) compensación del RP en las moscas viejas en comparación a las jóvenes (**Figura 27B**, panel izquierdo); y 2) aumento del OP con la edad (**Figura 27B**, panel derecho; $p < 0.05$).

3. Las mutaciones en white tienden a disminuir los niveles de dopamina y alteran la locomoción

Los resultados preliminares de nuestras mediciones del contenido de DA mediante HPLC muestran una tendencia de menores niveles de DA en los cerebros de los mutantes w^{1118} respecto a los w^+ a los 30 días de edad (**Figura 28**). Esta tendencia también se observó en moscas mutantes de 45 y 60 días. Se analizará un mayor número de muestras de cada tipo para ver si se detectan diferencias significativas que confirmen lo mostrado por esta tendencia.

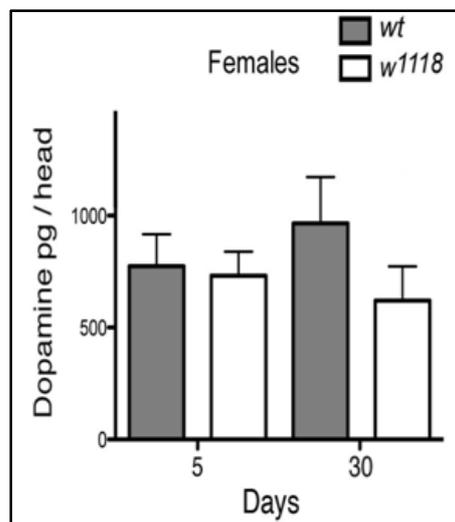


Figura 28. Los mutantes w^{1118} muestran una tendencia a niveles reducidos de DA. Gráfico del contenido de medio de DA (pg/cabeza) medido por HPLC, promediando 5 muestras de hembras w^+ y w^{1118} de 5 y 30 días de edad (n=12-15 por genotipo y edad). Las líneas representan el s.e.m.

Como mencioné en la introducción de este capítulo, el ensayo de "climbing" es uno de los ensayos *in vivo* más usados para definir ND en *Drosophila* (ver ejemplo en **Figura 24**). Por esta razón, decidimos emplear este ensayo de locomoción para analizar si existían diferencias en la habilidad de trepar de los mutantes w^{1118} respecto a moscas controles w^+ del mismo sexo y edad. Empleamos hembras vírgenes y machos de las cepas w^{1118} y w^+ de 5, 15, 25 y 30 días de edad (**Figura 29A, B**). En el caso de las hembras w^{1118} , encontramos que aquellas de 30 días de edad tienen un deterioro significativo de su habilidad de trepar respecto a las hembras w^+ de la misma edad (**Figura 29A**). En el caso de los machos w^{1118} , encontramos que aquellos de más edad (25 y 30 días) tienen un deterioro significativo de su habilidad de trepar respecto a los

machos w^+ de las mismas edades (**Figura 29B**). Esta tendencia de los mutantes w^{1118} a menores índices de locomoción se observa también en ambos sexos a edades más tempranas (**Figura 29A, B**).

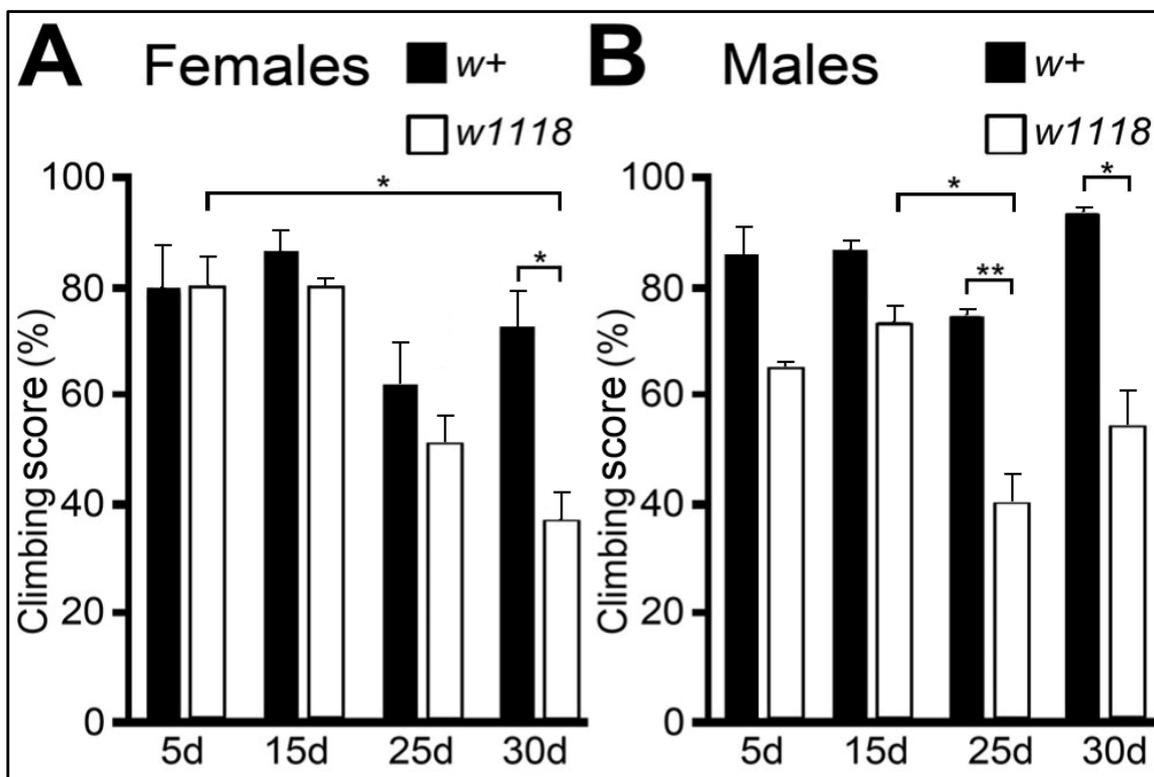


Figura 29. Los mutantes w^{1118} muestran un deterioro progresivo de la locomoción. Los registros de los ensayos de “climbing” se expresan en los gráficos como el porcentaje de moscas (A, hembras; B, machos) de cada genotipo (moscas w^+ de la cepa Vallecas o w^{1118}) que sobrepasan la línea trazada a 8 cm de la base de los tubos, analizadas a cuatro edades (5, 15, 25 y 30 días). Las moscas mutantes de más edad trepan menos que las moscas w^+ independientemente del sexo. Análisis estadístico: w^{1118} vs w^+ a 5d, 15d, 25d y 30d; w^{1118} 5d vs 15d vs 25d vs 30d y w^+ 5d vs 15d vs 25d vs 30d; ANOVA de dos vías o test de Kruskal-Wallis * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Las barras indican el s.e.m.

4. Las mutaciones en el gen white reducen el largo de vida y la tolerancia al estrés

Como mencioné en la introducción de este capítulo, el ensayo de largo de vida es uno de los métodos más usados para definir la existencia de un fenotipo neurodegenerativo. Este parámetro fue medido en hembras y machos de las cepas w^+ y w^{1118} a temperatura y dieta estándar (25°C) (**Figura 30A, B**), así como en moscas sometidas a varios tratamientos de estrés: dieta enriquecida en azúcar (**Figura 30C, D**), en ayuno (**Figura 30E, F**) y tratamiento con agentes oxidantes: paraquato (**Figura 30G**,

H) y peróxido de hidrógeno (**Figura 30I, J**). En la mayoría de estos ensayos encontramos que los mutantes w^{1118} viven menos respecto a las moscas w^+ . A continuación, presentaré los resultados publicados originalmente en una única figura, desglosados en paneles (**Figura 30A-B, 30C-D, 30E-F y 30G-J**) para facilitar la visualización detallada de estos resultados.

En los ensayos a 25°C con condiciones de cultivo estándar, observamos un acortamiento significativo del largo de vida total y la vida media de las hembras w^{1118} respecto a las hembras w^+ (vida media w^{1118} vs w^+ , 47 vs 65 días, $p < 0,01$; **Figura 30A**). En los machos esta diferencia no fue significativa (**Figura 30B**).

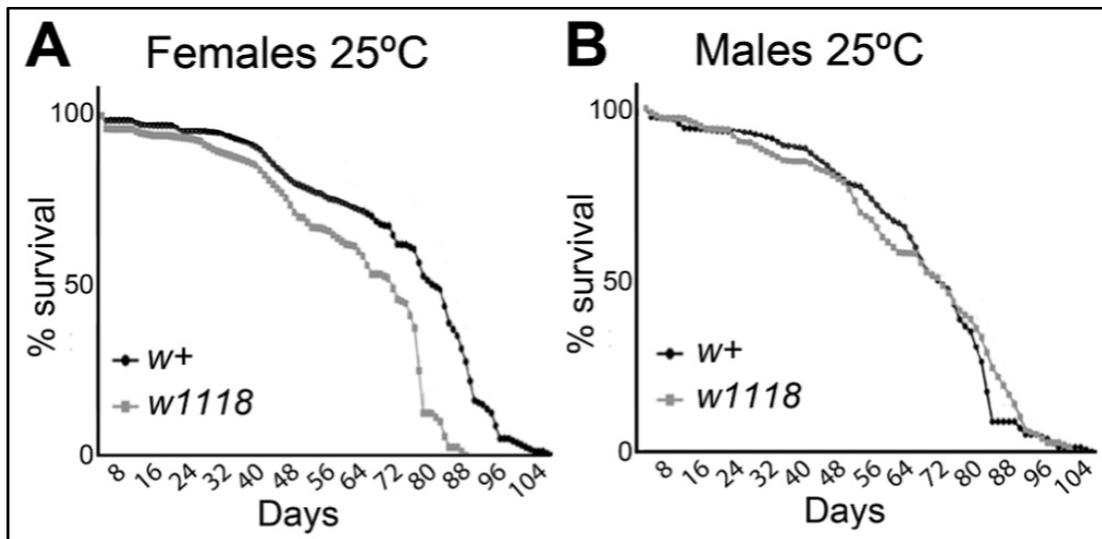
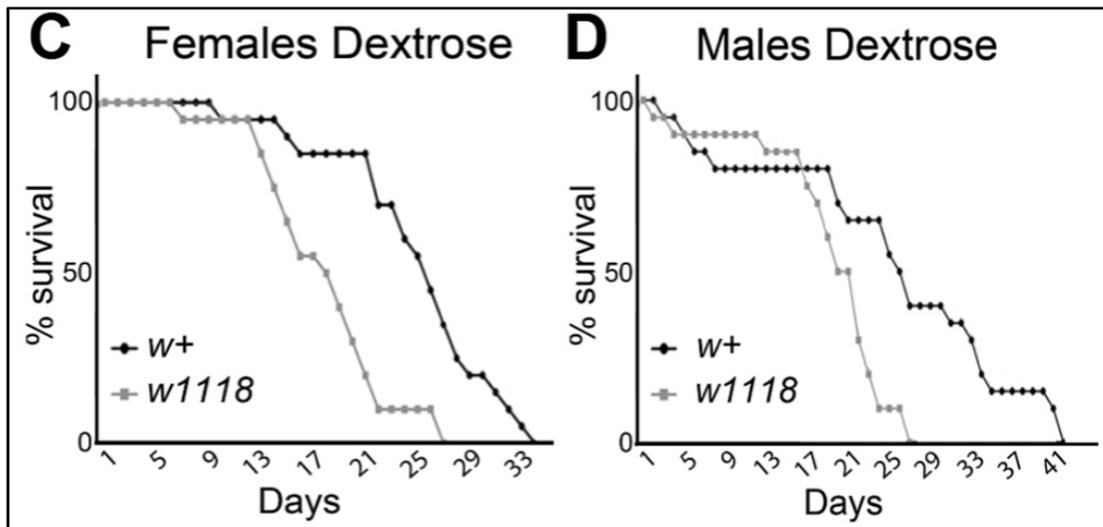


Figura 30 A-B. Los mutantes w^{1118} viven menos que las moscas w^+ . Representación gráfica del largo de vida total de moscas w^+ y w^{1118} mantenidas en condiciones normales de cultivo a 25°C.

Coincidiendo con lo reportado en la literatura (revisado en Ristow & Schmeisser, 2011), observamos que las moscas sometidas a una dieta rica en dextrosa viven menos que las alimentadas con comida estándar, independientemente de su sexo o genotipo (comparar **Figura 30C** con **A** y **Figura 30D** con **B**). Más importante aún, encontramos que los mutantes w^- eran significativamente menos resistentes a una dieta enriquecida en azúcar respecto a las moscas w^+ . En estos experimentos, la vida media de las hembras fue w^{1118} vs w^+ , 18 vs 26 días ($p < 0,0001$; **Figura 30C**) mientras que en los machos fue de 20 vs 26 días ($p < 0,0001$; **Figura 30D**).



Finalmente, también realizamos ensayos de largo de vida en hembras y machos w^+ y w^{1118} sometidos a estrés oxidativo causado por una exposición a paraquato o H_2O_2 en la dieta a diferentes concentraciones (**Figura 30G-J**). Los mutantes w^{1118} fueron menos resistentes a ambos tratamientos respecto a las moscas w^+ . El tratamiento con paraquato acortó la vida media de las hembras w^{1118} a todas las concentraciones empleadas [vida media w^{1118} vs w^+ : 56 vs 112 horas ($p < 0,05$) a 20mM; 72 vs 128 horas ($p < 0,05$) a 10mM y 192 vs 320 horas ($p < 0,001$) a 2 mM, **Figura 30G**]. Este tratamiento también acortó la vida media de los machos w^{1118} a dos de las concentraciones empleadas [vida media w^{1118} vs w^+ : 56 vs 168 horas ($p < 0,05$) a 10 mM y 80 vs 296 horas ($p < 0,001$) a 2mM, **Figura 30H**]. Por su parte, el tratamiento con H_2O_2 acortó significativamente la vida media de las hembras w^{1118} cuando empleamos una concentración de 0,5% (w^{1118} vs w^+ : 264 vs 320 horas, $p < 0,05$; **Figura 30I**).

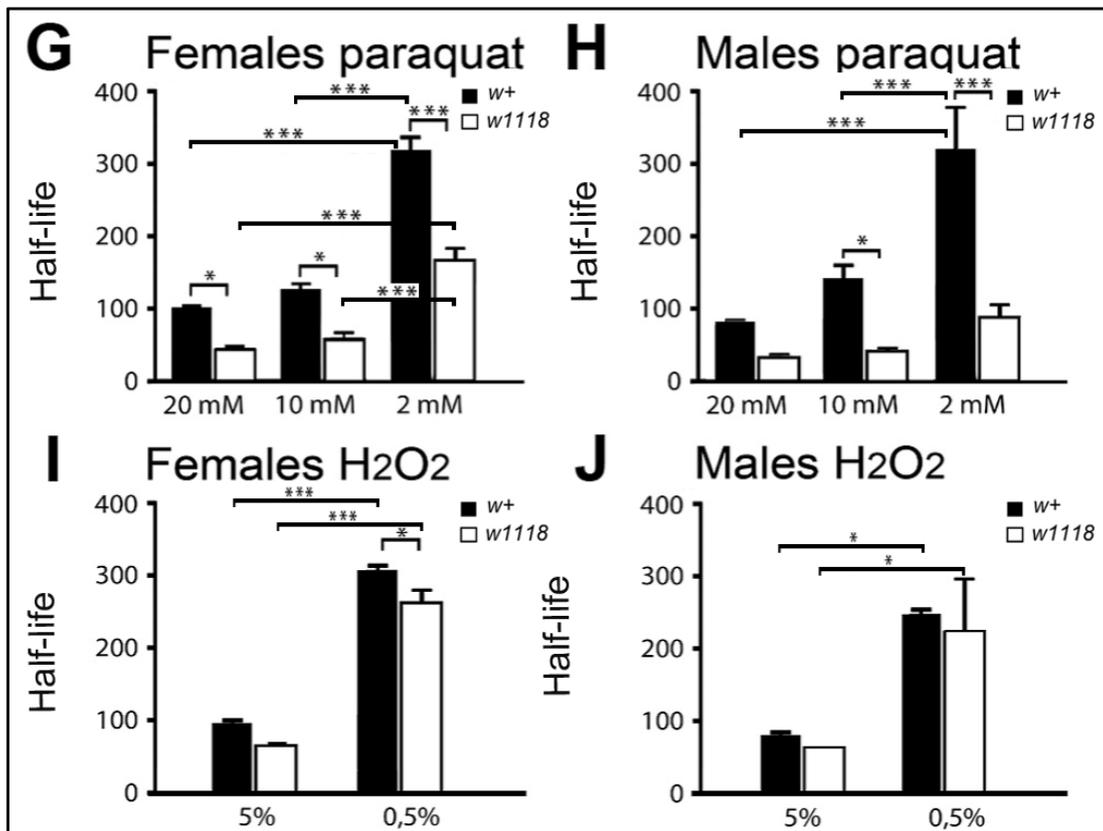


Figura 30 G-J. Los mutantes w^{1118} son menos tolerantes al estrés que las moscas w^+ . Representación gráfica de la vida media (tiempo donde se registra un 50% de supervivencia) de moscas w^+ y w^{1118} mantenidas bajo condiciones de estrés oxidativo causado por administración en la dieta de distintas concentraciones de paraquato 20mM, 10mM y 2mM (G-H) o H_2O_2 5% y 0,5% (I-J). El ensayo estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías, test de Bonferroni como *post-hoc*, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Las barras indican el s.e.m.

5. La expresión del transgen *mini-white*⁺ en los mutantes *white* rescata el fenotipo de degeneración retinal

La mayoría de las cepas transgénicas de *Drosophila* son construidas mediante inyección del ADN transgénico en embriones de la cepa w^{1118} . El transgen así inyectado contiene asimismo la secuencia codificadora para una versión casi completa y funcional del gene *w*, llamada *mini-w*⁺, que funciona como reportero de la integración efectiva de la construcción de interés. Es decir, las moscas resultantes de los embriones inyectados, que tengan ojos rojos son aquellas que han incorporado el transgen. Para investigar si la expresión de *mini-w*⁺ en moscas w^{1118} de 30 días de edad rescata la estructura normal de la retina además del color de ojos, empleamos cortes histológicos como los ilustrados en la **Figura 26** y adicionalmente usamos el método de neutralización óptica de la córnea (Franceschini & Kirschfeld, 1971; Franceschini *et al.*, 1981). Este método tiene la ventaja que permite visualizar la auto-fluorescencia de los rabdómeros al ser excitados por la luz sin necesidad de tinciones. Así, se pueden observar en menos tiempo y sin manipulaciones la eventual falta de omatidios o rabdómeros y las variaciones generales de sus estructuras.

Los experimentos de histología y neutralización óptica de la córnea demostraron que a los 30 días de edad, cuando en las moscas mutantes w^{1118} se observaba un fenotipo de degeneración retinal muy evidente y fuerte, las moscas w^{1118} -*mini-w*⁺ no solo tienen ojos de color rojo sino también una histología retinal normal similar al w ⁺ (**Figura 31**). Ambos métodos mostraron que en las moscas w^{1118} -*mini-w*⁺ no se observa ni desorganización de la estructura retinal, ni falta de omatidios o fotoreceptores dentro de los omatidios.

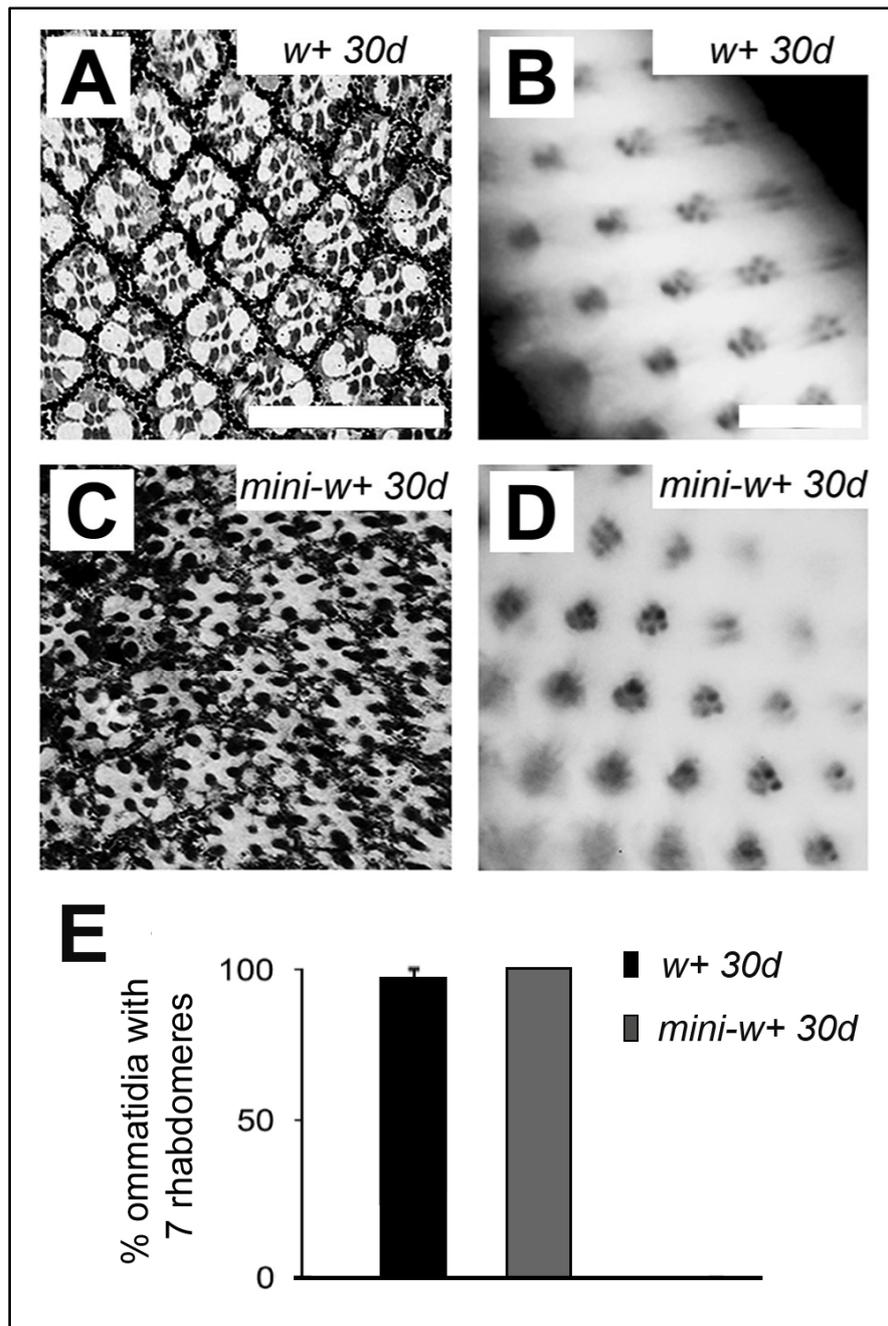


Figura 31. La expresión del transgen *mini-white*⁺ en los mutantes *w*¹¹¹⁸ rescata el fenotipo de degeneración retinal. Los cortes histológicos de retina obtenidos de moscas *w*⁺ de 30 días de edad (A) y de moscas transgénicas *mini-w*⁺ construídas en un contexto genético *w*¹¹¹⁸ de 30 días de edad (C) muestran que estas últimas presentan toda la dotación de ommatidios y rhabdómeros con una organización similar a los controles (comparar con los cortes de mutantes *w*⁻, Figura 26F y J). (B, D) Imágenes de retinas de moscas *w*⁺ (B) y moscas *mini-w*⁺ (D) obtenidas por el método de neutralización óptica de la córnea. Con ambos métodos se observa que la expresión de *mini-w*⁺ en un contexto *w*⁻ rescata el fenotipo de ND. La escala representa 20 μ m. (E) Representación gráfica del porcentaje de ommatidios que presentan 7 rhabdómeros en moscas *w*⁺ y *mini-w*⁺ de 30 días de edad, donde se observa que no existen diferencias significativas entre ambos genotipos (test de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

Al comienzo de esta tesis, existían varias publicaciones en las que se reportan los fenotipos neurológicos de los mutantes w de *Drosophila* (Zhang & Odenwald, 1995; Anaka *et al.*, 2008; Hoyer *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Krstic *et al.*, 2013; Xiao & Robertson, 2016; Campbell & Nash, 2001; Diegelmann *et al.*, 2006; Anaka *et al.*, 2008; Sitaraman *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2014; Titlow *et al.*, 2014). También existían estudios que sugerían una posible vinculación entre la falta de w y la ND (Scherzer *et al.*, 2003; Ambegaokar & Jackson, 2010; Shieh & Bonini, 2011). Pese a ello, todavía no se había demostrado empíricamente, o al menos postulado explícitamente, que la falta de función del gen w podría causar ND.

En este capítulo demostramos que los mutantes w^{1118} de *Drosophila* presentan un fenotipo de degeneración retinal progresiva (**Figura 26**). La observación del mismo fenotipo en un segundo alelo w^1 refuerza la idea de que el fenotipo degenerativo realmente se debe a una falta de expresión del gen w . El fenotipo es menos acusado en este segundo alelo, probablemente debido a que se trata de un alelo hipomorfo causado por la inserción de un transposon Doc cerca del inicio de transcripción del promotor del gen w (<http://flybase.org/reports/FBal0018074.html>), mientras que el alelo w^{1118} es un alelo nulo, que surge de la delección del extremo 5' del promotor del gen w (<http://flybase.org/reports/FBal0018186.html>). Presumimos por tanto que, mientras que en el mutante w^1 podría existir cierta transcripción del gen w que generara una expresión residual, en el mutante w^{1118} la expresión de la proteína White está totalmente impedida.

Estos resultados son decisivos en cuanto a la definición de un fenotipo neurodegenerativo, puesto que la retina es un tejido neural y se estudia por tanto como caso específico y también como modelo general de ND (ver introducción de este capítulo). El resto de los ensayos realizados son congruentes con ese resultado principal ya que las patologías neurodegenerativas casi siempre están asociadas a una cortamiento del largo de vida, una reducción de la resistencia al estrés en general y al daño oxidativo en particular y a la aparición de deficiencias motoras.

Como mencioné en la introducción de este capítulo, al momento de esta tesis ya existían publicaciones que reportaban que una condición de iluminación constante podía generar degeneración retinal en mutantes w^- de *Drosophila* (Shoup, 1966; Wu & Wong, 1977; Schraermeyer & Dohms, 1993; Lee & Montell, 2004; Bulgakova *et al.*, 2010; Belušič, 2011). Sin embargo, dichas condiciones de luz no son naturales y no representan las condiciones de 12:12 horas de luz:oscuridad a las que normalmente están expuestas las moscas en la mayoría de los experimentos. Los resultados resumidos en este capítulo y publicados recientemente (Ferreiro *et al.*, 2018) demuestran por primera vez que la degeneración retinal ocurre en los mutantes w^- incluso en ciclos estándar de luz:oscuridad. Más importante aún, nuestros resultados revelan por primera vez la naturaleza progresiva de esta ND.

Shoup (1966) demostró mediante microscopía electrónica e inmunohistoquímica que los mutantes w^- que presentaban degeneración retinal a causa de una iluminación constante, presentaban organelos anormales similares a lisosomas. Varios años más tarde, otros autores demostraron que los gránulos de pigmento del ojo tenían un origen lisosomal (Schraermeyer & Dohms, 1993). Posteriormente fue demostrado que la autofagia de la rodopsina activada tiene un rol neuroprotector frente a la degeneración retinal inducida por la luz en *Drosophila* (Midorikawa *et al.*, 2010). Al presente, existen diversas evidencias que vinculan varias patologías neurodegenerativas con anomalías en la vía de los lisosomas y la autofagia (Nixon, 2013; Ingemann & Kirkegaard, 2014; Fraldi *et al.*, 2016). Además, como ya mencioné también en la introducción de este capítulo, existen evidencias de que la mutación w^{1118} agrava la degeneración retinal producida por la expresión transgénica de una copia mutada de la proteína Tau humana, lo que también puede ser explicado por un funcionamiento anormal de la vía de los lisosomas y la autofagia (Ambegaokar & Jackson, 2010).

El aumento que observamos en el potencial de membrana de los fotorreceptores de la retina de mutantes w^- (**Figura 27**) es congruente con estudios previos (Belušič, 2011) y la explicación más simple es que en ausencia de pigmentos en el mutante todos los omatidios son expuestos a la luz sea cual sea el ángulo de incidencia sobre el ojo. En cambio, la reducción del potencial a edades más avanzadas

se explicaría por la progresiva hipotrofia y desaparición de los rabdómeros en el mutante.

Nuestros resultados también muestran una locomoción deficiente, que se agrava con la edad, en los mutantes w^- respecto a los w^+ (**Figura 29**). Esto también es característico de muchos mutantes de ND tanto de *Drosophila* como de otros organismos y coincide con reportes previos de problemas de locomoción en mutantes deficientes de DA (Riemensperger *et al.*, 2011). La tendencia que observamos de menores niveles de DA en los mutantes w^- no es perfectamente congruente con publicaciones previas que informan sobre una disminución de la DA de alrededor del 50% en los mutantes (Borycz *et al.*, 2008; Sitaraman *et al.*, 2008). En nuestro estudio encontramos una tendencia a la baja, no significativa, en todas las edades examinadas y esperamos confirmarla en el futuro mediante la realización de nuevos experimentos con un mayor número de muestras.

La reducción significativa que observamos en el largo de vida de los mutantes w^- criados en condiciones normales y bajo estrés (**Figura 30**) también coincide con lo reportado y esperable para mutantes de genes asociados a ND. La menor tolerancia de los mutantes w^- a diferentes formas de estrés estaría reflejando un fenotipo de degeneración fisiológicamente más complejo que no solo se limita a la retina, sino quizás también a otras áreas en el cerebro y el resto de los tejidos donde se expresa el gen *w*. White no solo se expresa en el ojo, sino también a grandes niveles en el sistema excretorio y a bajos niveles en el cerebro y otros tejidos (Chintapalli *et al.*, 2007). La evidencia experimental indica que al menos en los órganos excretores, que se sabe intervienen en la respuesta al estrés, White actúa como transportador de GMP cíclico (GMPC) por lo que podría ser importante para la regulación de varias funciones biológicas mediadas por GMPC (ej. Evans *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2014).

Existen varias evidencias experimentales adicionales a nuestros resultados, que reportan otros defectos neurológicos presentes en los mutantes w^{1118} , lo que indicaría que White probablemente tiene otras funciones adicionales a la del transporte de pigmentos visuales, importantes para el correcto funcionamiento del cerebro y otros tejidos de *Drosophila*.

Finalmente, mediante nuestros experimentos de expresión del transgen *mini-w⁺* en mutantes *w¹¹¹⁸*, logamos el rescate histológico del fenotipo de ND retinal (**Figura 31**). Esto, sumado al hallazgo del fenotipo retinal también en mutantes *w¹*, refuerza la idea de que es la falta de expresión del gen *w* lo que causa la degeneración retinal observada en esta tesis. Por razones de tiempo no analizamos si la expresión del transgen *mini-w⁺* también logra rescatar fenotipos extraretinales, tarea que requeriría un tiempo que excede con creces el adjudicado a este capítulo, pero indudablemente quienes elijan profundizar en la relación entre White y ND deberían investigar si la expresión de *mini-w⁺* también puede disminuir o eliminar el efecto negativo de la mutación *w¹¹¹⁸* en la movilidad, la resistencia al estrés y el largo de vida.

No sería necesariamente esperable que la expresión de *mini-w⁺* en un contexto *w¹¹¹⁸* rescatara todos los fenotipos mutantes como aquellos comportamentales (ej. locomoción), ya que la acción de White en estos procesos podría ser bastante compleja. Las cepas *mini-w⁺* tienen un rango de colores de ojos que están determinados por la posición en el genoma donde se insertó la copia del transgen (revisado en Silicheva *et al.*, 2010). Se ha sugerido que el promotor *w* funciona como una trampa de potenciadores génicos (enhancer trap 5' y 3'). Una trampa de potenciadores es un fragmento de ADN que contiene una secuencia de un gen reportero a 3' de un promotor que es capaz de integrarse al azar en el genoma. Su integración cerca de un potenciador permite la expresión de un nuevo ARNm que codifica para el gen reportero. El gen reportero es entonces expresado en las células donde el potenciador se encuentra activo (http://www.informatics.jax.org/glossary/enhancer_trap). Los potenciadores atrapados cercanos al gen *w* estimularían diferencialmente la transcripción de *mini-w⁺* dependiendo del sitio de inserción del transgen *mini-w*, pudiendo explicar la falta de rescate de ciertos fenotipos comportamentales por el efecto positivo o negativo de potenciadores externos (revisión en Silicheva *et al.*, 2010). Por ejemplo, Krstic y col. (Krstic *et al.*, 2013) encontraron que las mutaciones del gen *w* afectan el comportamiento de cortejo de los machos de *Drosophila*. Mostraron que los machos *w¹¹¹⁸* mantenidos en oscuridad pierden su preferencia por las hembras y que este fenotipo no es rescatado por la expresión de *mini-w⁺*. Estos autores sugieren que si

bien *mini-w⁺* se expresa completamente en el ojo de las moscas transgénicas, carecería de los potenciadores necesarios para su expresión en el SN.

Nuestros resultados advierten a la comunidad de *Drosophila* sobre la necesidad de evitar el uso exclusivo de los mutantes *w⁻* como control parental o como control "*w⁺*" respecto a cepas de moscas transgénicas usadas en experimentación, principalmente en áreas de estudio relacionadas con la ND/NP. De confirmarse en un futuro un papel de White en la función normal de los lisosomas tal como sugería anteriormente, sus mutaciones podrían afectar a varios tejidos y tener consecuencias negativas en funciones biológicas como el mantenimiento de la retina, el control de la reposición de proteínas y, más en general, en la resistencia de las moscas al estrés. Los mutantes *w¹¹¹⁸* podrían convertirse por tanto en una herramienta importante para el estudio de la relación funcional entre la vía de los lisosomas, la autofagia y la formación de nanofilamentos durante la ND.

CAPÍTULO III

VALIDACIÓN DE GENES CANDIDATOS A NEUROPROTECCIÓN: LA SEÑALIZACIÓN POR ACETIL-COA



INTRODUCCIÓN CAPÍTULO III

Este capítulo se basa en los genes identificados en el Capítulo I (**Figura 32**). Al inicio de nuestro análisis, el 5% de los 633 genes con niveles de expresión anormalmente altos o bajos en el mutante *sall* ya habían sido validados experimentalmente por otros autores como asociados a ND y/o NP en *Drosophila* y/o humanos.

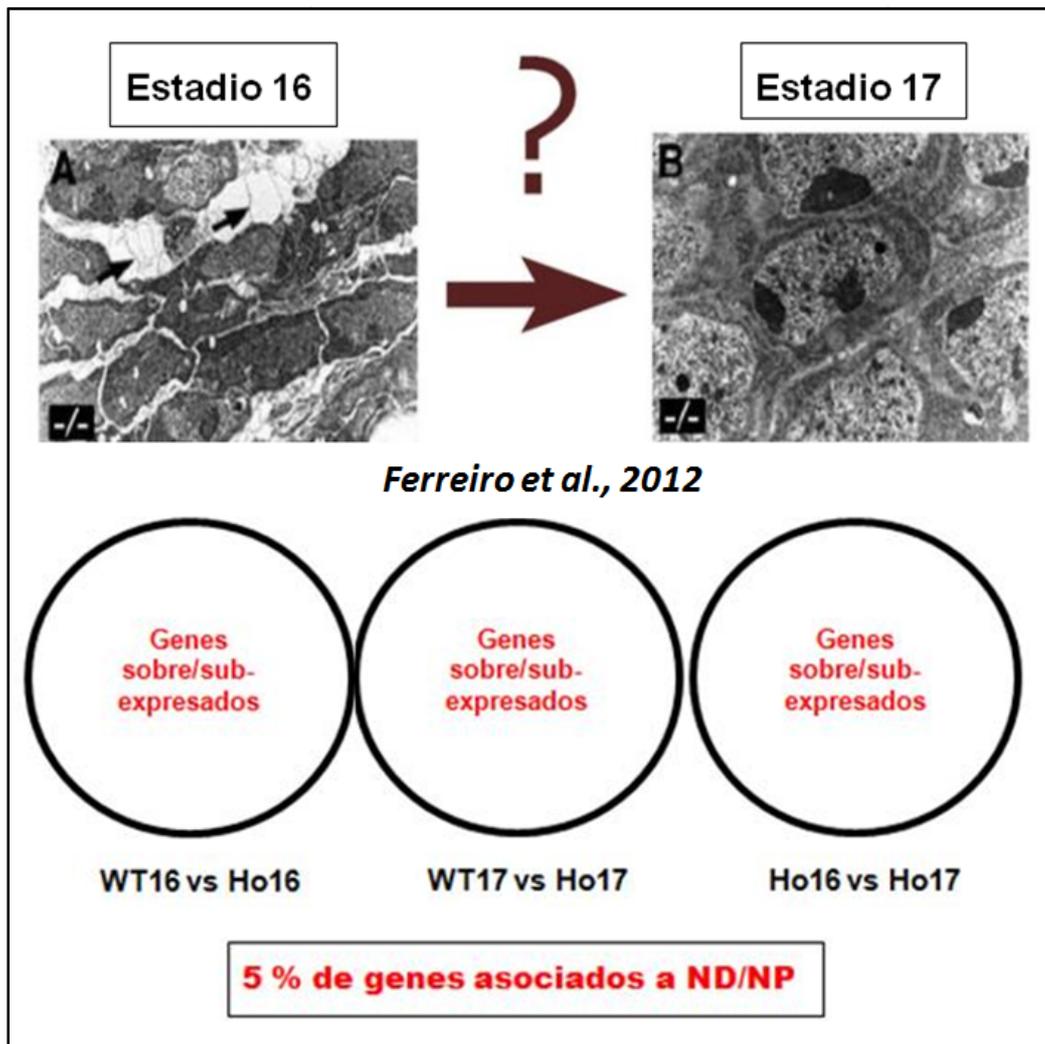


Figura 32. Esquema que resume los principales resultados del Capítulo I a partir de los cuales se plantearon la hipótesis y objetivos de este Capítulo III. El número de genes que presentaron expresión diferencial mRNA-Seq significativa en el segundo genotipo respecto al primero de cada comparación genotípica indicada en el esquema fue el siguiente: WT16 vs Ho16= 190 genes sobre-expresados y 26 genes sub-expresados; WT17 vs Ho17= 163 genes sobre-expresados y 97 genes sub-expresados; Ho16 vs Ho17= 781 genes sobre-expresados y 416 genes sub-expresados.

En el momento en que se hizo dicho análisis, el total de genes asociados a ND o NP en *Drosophila* representaban cerca del 2% del total del genoma. El hecho de que esos genes constituyeran el 5% de nuestra lista permitía concluir que la misma estaba “enriquecida” en ese tipo de genes y que era muy probable que incluyera otros genes implicados en ND/NP los cuales no habían sido todavía relacionados con estas funciones. A partir de aquí, denominaré a estos genes como “genes candidatos a neuroprotectores”. En esta terminología, la palabra “candidato” indica que les adjudicamos suficiente probabilidad de tener relevancia funcional en procesos de NP como para proponer un programa experimental dirigido a investigar esa hipótesis.

El concepto de gen candidato ha sido ampliamente aplicado tanto en *Drosophila* como en otros modelos animales para caracterizar funciones biológicas de genes regulados diferencialmente en diversos análisis genómicos. Una de las estrategias más usadas para validar genes candidatos en *Drosophila*, incluye el empleo del método binario GAL4-UAS (Brand & Perrimon, 1993), que permite tanto silenciar como sobre-expresar genes candidatos para luego validarlos por métodos *in vitro* y/o *in vivo*. En el caso de estudios que pretendan determinar una asociación de genes candidatos con ND, se realizan frecuentemente el tipo de ensayos que usamos en el Capítulo II de esta tesis para definir la asociación del gen *w* con ND. Con la misma aproximación se puede investigar si un gen candidato tiene función neuroprotectora. Por ejemplo, usando el sistema GAL4-UAS se puede sobre-expresar el gen candidato en una mosca con ND causada por mutación en *parkin* y luego medir si eso elimina o al menos reduce el fenotipo degenerativo (“rescate”). Emplear esta aproximación para los más de 600 genes de nuestra lista de candidatos no es viable debido al tiempo requerido para los análisis, por lo que el primer paso que dimos fue seleccionar un número reducido de genes candidatos.

Describiré aquí los criterios usados para seleccionar los genes candidatos, luego presentaré el estudio monográfico de los genes seleccionados y por último presentaré los resultados del trabajo experimental.

El proceso de selección de los genes candidatos a neuroprotectores derivó en la selección final de tres genes, *ACC*, *CG10932* y *CG4586*, que fueron validados *in vivo* mediante los ensayos de largo de vida y climbing introducidos en el Capítulo II. Estos

genes pertenecen a la vía del acetil-CoA y el metabolismo de los ácidos grasos (AG) (Figura 33).

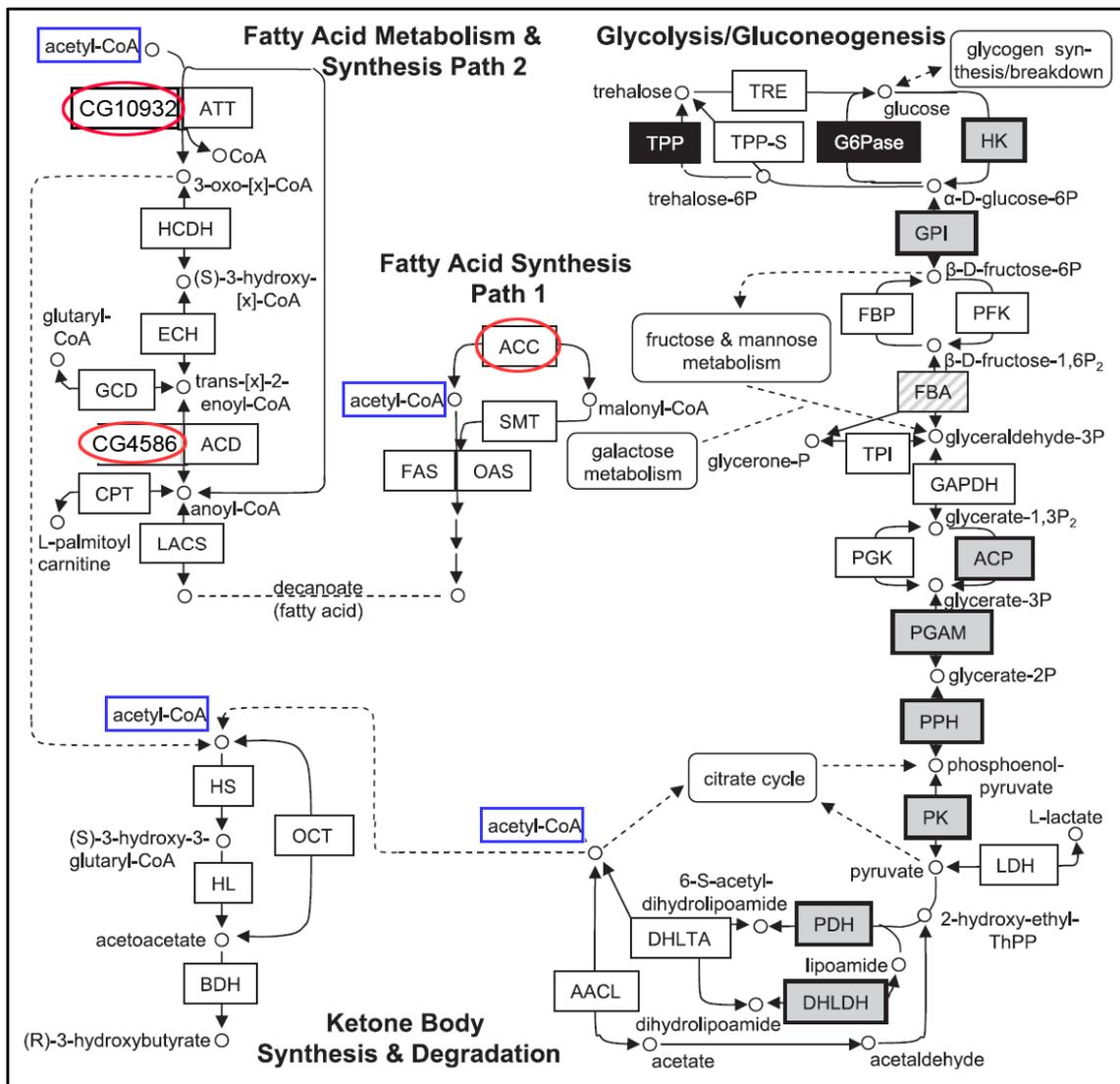


Figura 33. Vías metabólicas en las que están implicados los tres genes candidatos ACC, CG10932 y CG4586. La imagen muestra las vías metabólicas para la síntesis y metabolismo de AG, síntesis y degradación de cuerpos cetónicos y la glucólisis/gluconeogenesis. Los círculos rojos señalan los tres genes candidatos; el acetil-CoA está recuadrado en azul. Abreviaciones (respetando el nombre original en inglés): AACL, acetoacetate-CoA ligase; AAT, acetyl-CoA acetyl transferase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACD, acyl-CoA dehydrogenase; ACOX, acyl-CoA oxidase; ACP, acylphosphatase; ATT, acetyl-CoA acyl transferase; BDH, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase; CPT, carnitine O-palmitoyl transferase; DHLDH, dihydrolipoamide dehydrogenase; DHLTA, dihydrolipoamide S-acetyltransferase; ECH, enoyl-CoA hydratase; FAS, fatty acid synthase; FBA, fructose bisphosphate aldolase; FBP, fructosebisphosphatase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GCD, glutaryl-CoA dehydrogenase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; HCDH, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; HK, hexokinase; HL, hydroxymethylglutaryl-CoA lyase; HS, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; LACS, long-

chain-fatty-acid-CoA ligase; LDH, L-Lactate dehydrogenase; OAS, 3-oxoacyl synthase; OCT, 3-oxoacid-CoA transferase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PFK, 6-phosphofruktokinase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; PPH, phosphopyruvate hydratase (enolase); SMT, S-malonyl transferase; TPI, triose-phosphate isomerase; TPP, trehalose-6-phosphate phosphatase; TPP-S, trehalose-6-phosphate phosphatase/trehalose-6-phosphate synthase fusion; TRE, trehalase. Adaptado de Kunieda *et al.*, 2006.

El acetil-CoA es un metabolito crucial para la supervivencia. El acetil-CoA mitocondrial deriva principalmente del catabolismo de la glucosa (glucólisis) y la β -oxidación de AG y es oxidado en el ciclo de Krebs para la producción de ATP (revisado en Pietrocola *et al.*, 2015). También puede producirse en el citosol como precursor normal de la síntesis de AG o colesterol, o a partir de la glutamina cuando la glucólisis está bloqueada, durante la hipoxia o cuando existen defectos mitocondriales (revisado en Pietrocola *et al.*, 2015). El acetil-CoA también interviene en la regulación génica (revisado en Menzies *et al.*, 2016): en el núcleo es empleado por las enzimas histona-acetiltransferasas (HAT) para la acetilación de histonas u otras proteínas, proceso normalmente asociado a la activación génica (revisado en Shen *et al.*, 2015). Los niveles de acetil-CoA fluctúan en respuesta a nutrientes y hormonas y en condiciones de crecimiento o estrés celular (ej. Tubbs & Garland, 1964; Smith *et al.*, 1978; Reibel *et al.*, 1981), influyendo por tanto también en procesos biológicos como el crecimiento celular, el ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis (Bracha *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).

El gen ACC (<http://flybase.org/reports/FBgn0033246.html>) codifica para la enzima Acetil-CoA-carboxilasa (ACC) que cataliza la carboxilación del acetil-CoA a malonil-CoA (**Figura 33**), molécula de señalización para la secreción de insulina desde los islotes β -pancreáticos en vertebrados y sensor cerebral del apetito (Loftus *et al.*, 2000). El malonil-CoA es el sustrato limitante para la síntesis de AG de cadena larga en el citosol e inhibidor de la β -oxidación de AG en la mitocondria por inhibición de la Carnitina palmitoyltransferasa-I (CPT1) (**Figura 33**) (revisado en Zu *et al.*, 2013). La enzima ACC es activada por citrato e inhibida por AG de cadena larga y por la fosforilación reversible por la enzima Protein-kinasa-activada por AMP (AMPK), (ej. Kim, 1997; Hardie *et al.*, 2003; Tong & Harwood, 2006). La AMPK se activa en

respuesta a un aumento en la proporción AMP/ATP generado por un estrés metabólico inducido, por ejemplo, por ejercicio físico, ayuno o hipoxia (revisado en Kinnunen *et al.*, 2016). En *Drosophila* ACC es un gen importante para el desarrollo del sistema respiratorio, el almacenamiento de AG en el cuerpo graso (tejido adiposo) y la actividad muscular (Parvy *et al.*, 2012). Interviene en la regulación celular de proteínas, respuesta celular al estímulo por sucrosa, regulación de la vía de señalización Wnt y Notch, entre otros (Sasamura *et al.*, 2013). Uno de los principales genes homólogos humanos es el gen ACC1.

El gen CG10932 (<http://flybase.org/reports/FBgn0029969.html>) codifica para la enzima Acetil-CoA-acetil-transferasa que cataliza dos reacciones reversibles, la síntesis de dos moléculas de acetil-CoA a partir del procesamiento del acetoacetil-CoA y la síntesis de acetil-CoA y propionil-CoA a partir del procesamiento del 2-metil-acetoacetil-CoA (**Figura 33**). Es activa en mitocondrias principalmente del cuerpo graso y en menor medida en el SN. También funciona en peroxisomas (Faust *et al.*, 2012). Interviene en la síntesis y β -oxidación de AG, el metabolismo del piruvato y el sueño, entre otros procesos biológicos. Su homólogo humano es el gen ACAT1.

El gen CG4586 (<http://flybase.org/reports/FBgn0029924.html>) codifica para la enzima Acetil-CoA-acetil-oxidasa con actividad acil-CoA oxidasa y deshidrogenasa. En *Drosophila* esta enzima actúa principalmente en mitocondrias del cuerpo graso y en menor medida en el SN. También actúa en peroxisomas, donde consume oxígeno y libera ROS en forma de peróxido a partir de la conversión de acetil-CoA en trans-enoil-CoA en el segundo paso en la vía de β -oxidación de AG (**Figura 33**) (Faust *et al.*, 2012). Uno de sus principales homólogos humanos es el gen ACOX1.

Para investigar la hipótesis de que los genes seleccionados confieren NP, usamos el sistema GAL4-UAS para silenciar esos genes o sobre-expresarlos en moscas que sufren un fenotipo neurodegenerativo causado por una mutación en *parkin*. Los cruces se planificaron de modo que pudiésemos expresar los candidatos a nivel neuronal o glial. Si el gen confiere NP se espera observar una reducción del efecto de la mutación en un fondo mutante para *parkin*.

El gen *parkin* interviene en la regulación del ciclo celular, tráfico de vesículas, formación de agregados proteicos y autofagia (revisado en Lionaki *et al.*, 2015;

Requejo-Aguilar & Bolaños, 2016). Codifica para la enzima Parkin que tiene actividad E3 ubiquitina-ligasa y que normalmente se encuentra inactiva en el citoplasma (Chaugule *et al.*, 2011; Trempe *et al.*, 2013). En *Drosophila* y mamíferos, Parkin es activada por fosforilación por la proteína “Kinasa 1 inducida por PTEN” (PINK1), ingresando juntas a la mitocondria en respuesta a la depolarización de la membrana mitocondrial interna (Matsuda *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2010; Vives-Bauza *et al.*, 2010; Ziviani *et al.*, 2010). Parkin propicia la ubiquitinación de proteínas mitocondriales de superficie, marcándolas para su posterior degradación en el proteasoma y, junto con PINK1, regula la autofagia selectiva de mitocondrias dañadas (revisado en Lionaki *et al.*, 2015). Este proceso se da en condiciones normales a niveles basales para el mantenimiento celular y también es promovido por señales de estrés, como por ejemplo, el daño oxidativo, la hipoxia y la falta de nutrientes (revisado en Lionaki *et al.*, 2015).

Las mutaciones en el gen *parkin* se encuentran asociadas a PD, segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en humanos, caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra que produce síntomas clínicos que incluyen bradikinesia, temblor en reposo y rigidez (Polymeropoulos *et al.*, 1996; Dauer & Przedborski, 2003). Los mutantes nulos para el gen *parkin* de *Drosophila*, son de los más empleados como controles positivos en experimentos de validación de genes con potencial vinculación a procesos de ND, ya que presentan fenotipos bien definidos como por ejemplo defectos mitocondriales, apoptosis muscular, menor número de células y más pequeñas, vida media más corta e hipersensibilidad al estrés oxidativo (revisado en Lu & Vogel, 2009). La falta de función del gen *parkin* también produce cambios en el metabolismo celular (Requejo-Aguilar & Bolaños, 2016). Por ejemplo, aumenta la glicólisis, reduce la respiración mitocondrial y la expresión de muchas proteínas mitocondriales como la piruvato deshidrogenasa (PDH) que cataliza la conversión de piruvato en acetil-CoA (revisado en Requejo-Aguilar & Bolaños, 2016), por lo que el empleo de estos mutantes también sirve para el estudio de desórdenes metabólicos entre los que se incluyen los neurometabólicos.

Quiero mencionar finalmente que, durante el desarrollo de esta tesis, el número inicial de los genes de nuestra lista asociados a ND/NP fue en notable

incremento hasta llegar a representar más de un 30% de nuestra lista inicial, frente al 4% que actualmente representan dentro del genoma completo de *Drosophila*. Por lo tanto, nuestra lista de genes candidatos se encuentra ampliamente enriquecida en genes presuntamente implicados en ND/NP.

HIPÓTESIS CAPÍTULO III

Dado el enriquecimiento inicial de nuestra lista de genes candidatos (Capítulo I) en genes empíricamente asociados a ND y/o NP, propusimos la hipótesis de que dicha lista contiene genes con función neuroprotectora aún no conocida, denominados “genes candidatos a NP”.

OBJETIVO GENERAL CAPÍTULO III

Seleccionar e investigar la función neuroprotectora de algunos de los "genes candidatos a NP" identificados a partir del análisis de mRNA-Seq de los mutantes *sall* en el estadio 17 de reversión de la ND (Ferreiro *et al.*, 2012).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO III

1. Seleccionar genes candidatos de interés prioritario para el objetivo general.
2. Validar la expresión diferencial de los genes candidatos seleccionados mediante qPCR.
3. Confirmar la expresión de los genes candidatos seleccionados en el tejido nervioso de *Drosophila*.
4. Determinar si la falta de función de los genes candidatos seleccionados causa ND.
5. Determinar si la sobre-expresión de los genes candidatos confiere NP en moscas mutantes para el gen *parkin*.
6. Repetir la búsqueda en la bibliografía y bases de datos de *Drosophila* para actualizar la lista completa de genes asociados a ND y/o NP y analizar su enriquecimiento en nuestra lista al presente.

METODOLOGÍA CAPÍTULO III

1. Selección de genes candidatos a neuroprotección

El primer paso fue seleccionar de la lista de 633 genes candidatos [Capítulo I, **Tabla Suplementaria 6**, *WT16 vs Ho16 + WT17 vs Ho17 + (Ho16 vs Ho17)-(WT16 vs WT17)*] un número de genes suficientemente reducido como para poder abordar su estudio. Con este objetivo diseñé y apliqué una serie de ocho filtros consecutivos, en base a una serie de parámetros considerados relevantes. Para ello realicé una búsqueda exhaustiva de la literatura asociada a estos genes y estudié las bases de datos de genes de *Drosophila* de libre acceso que presentaran información actualizada principalmente acerca de su expresión génica, interacción génica y proteica, ontología génica, herramientas transgénicas disponibles, enfermedades asociadas a *Drosophila* o humanos, tales como NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), FLYBASE (<http://flybase.org>), VDCR(<https://stockcenter.vdrc.at>), FLYMINE (<http://flymine.org>), STRING (<http://string-db.org>), STITCH(<http://stitch.embl.de>), FLY-FISH (<http://fly-fish.cabr.utoronto.ca>) o DROIDB (<http://droidb.org>), entre otras.

2. Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes candidatos en embriones y en el SNC de moscas adultas

Para la validación por qPCR de los niveles de expresión de los genes candidatos se seleccionaron muestras de embriones WT16, WT17, Ho16 y Ho17, independientes de las usadas para la secuenciación mRNA-Seq. Se extrajo el ARN de dichos embriones, se retrotranscribió a ADNc y se purificó para emplear como molde en las qPCRs, siguiendo los mismos protocolos ya descritos (Capítulo I). Se diseñaron mediante primerBLAST, siguiendo las mismas indicaciones descritas en el Capítulo I, varios juegos de primers específicos que pudieran amplificar regiones comunes a todas las variantes de transcritos posibles de los genes candidatos seleccionados (**Tabla 6**). Esto se realizó porque *a priori* no sabíamos cuál de estas variantes se encuentra sobre- o sub-representada en los estadios de ND y/o NP de nuestro modelo *sall*.

Para la validación por qPCR de la expresión de los candidatos en el SNC de moscas adultas, se disecaron 15-20 hembras WT de 5 días de edad y se les extrajo el

cerebro siguiendo el método descrito por el video publicado por el Dr. Qingxuan Song (<https://www.youtube.com/watch?v=aGcnJeqEVEk>). Brevemente, se anestesiaron las moscas, se pasaron 30 segundos por etanol absoluto y luego por tampón fosfato salino (PBS 1X). Bajo lupa se disectaron los cerebros, sujetando la cabeza con pinzas desde la probóscide, eliminando el resto del cuerpo y luego quitando la cutícula de la cabeza desde la posición de los ojos. Una vez liberados los cerebros, se eliminaron las tráqueas y sacos de aire que los rodean. Posteriormente se extrajo su ARN, se retrotranscribió a ADNc y se purificó éste para emplearlo como molde en las qPCRs siguiendo los mismos protocolos ya descritos (Capítulo I). Se emplearon los mismos primers específicos diseñados anteriormente para los genes candidatos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Oligonucleotidos empleados para el análisis por qPCR de genes candidatos

GEN			PRIMERS	
SÍMBOLO	NOMBRE	CG ID	FORWARD	REVERSE
<i>RpL32</i>	<i>Ribosomal protein L32</i>	CG7939	5'-CCTTCCAGCTTCAAGATGACCATCC-3'	5'-ATCCGTAACCGATGTTGGGCATCAG-3'
ACC	<i>Acetyl-coA carboxylase</i>	CG11198	5'-CTAAACAAGGGCACACGCAG-3' 5'-CGGTCACTGCAGTAGCCATC-3'	5'-CTCTCGCTGGAGAACTGGAC-3' 5'-TGGAGCAATAGGAGGCTTGC-3'
CG10932	CG10932	CG10932	5'-GTTTTTCGATGGCCTCTGCGA-3' 5'-GAAGTTGTGGTGGTTTCGGC-3'	5'-CGATCTCCGGCTTCTCTTC-3' 5'-CGTGGTGCAGCATAATTGG-3'
CG12129	CG12129	CG12129	5'-AAGGAGTCAGCAAATGGCGA-3' 5'-TTGTTACAGACACTTCGGT-3'	5'-GGTCTTCTCTATGCGGC-3' 5'-TCGCCATTGCTGACTCCTT-3'
<i>Jheh3</i>	<i>Juvenile hormone epoxide hydrolase 3</i>	CG15106	5'-CCAAGCCGGAGTTCAAGGAT-3' 5'-CGGCAATCGGAGATCGATGA-3'	5'-CGCCAGTAGTCCACAAACT-3' 5'-CAGGTAATTGCCGCCAGT-3'
<i>Taldo</i>	<i>Transaldolase</i>	CG2827	5'-GACACCAAGAAGAGCGTGGA-3' 5'-CCACGGATGCCACCACTAAT-3'	5'-CGAGAAAAGGAGCGTCAGGT-3' 5'-CTCCACGCTCTTCTGGTGT-3'
CG11334	CG11334	CG11334	5'-CAACATGAAGATCGCAGCCG-3' 5'-ACGGCGGTCAACATGAAGAT-3'	5'-GCACGGTTATCGGCAATGTC-3' 5'-CGGTCGCGTCCAGAAATCTA-3'
CG4586	CG4586	CG4586	5'-CCACCATTGCCACCAGGTAT-3' 5'-CTGAACACCCCAACGCAAAG-3'	5'-GTTGCGTCTTTTCGTGCTTT-3' 5'-AACGGTTCGTGTCTCTC-3'
<i>EMC8-9</i>	<i>EMC8-9</i>	CG3501	5'-TGTGCGACTACAAGTCTCG-3' 5'-TTGATATTCCACGCGCCAA-3'	5'-ACTAATCCTTCCGTTCCGGC-3' 5'-TCTTGTGCACCTGTTGTCTG-3'
<i>dunce</i>	CG32498	CG32498	5'-TACATCGTCCACCCGCTATG-3' 5'-AGAGCATGATACCGCCTTCG-3'	5'-CTGTCCTCTGCGGATTCTC-3' 5'-TTCGGCGAGTTCTCTGAT-3'
CG6415	CG6415	CG6415	5'-CTCACCGTCTTCCACCAACGA-3' 5'-CTCCAATGCGGCGATGAAAG-3'	5'-CTTTCATCGCCGATTGGAG-3' 5'-GACATTGGGGATTCCAGCCA-3'

3. Análisis de la expresión de los genes candidatos en el SNC mediante hibridación *in situ* en cerebro de larva

Se realizaron hibridaciones *in situ* en cerebros WT de larvas de tercer estadio (L3), empleando sondas específicas sentido (S) y antisentido (AS) marcadas con digoxigenina (DIG) que construimos para los genes candidatos seleccionados, partiendo de la colección de clones EST de *Drosophila*.

3.1. Construcción de sondas

Para 8 de los 9 genes candidatos a ser analizados mediante hibridación *in situ*, se amplificó el ADN de plásmidos que contenían sus secuencias de cADN a partir de diversos clones de la colección EST de *Drosophila* (Expressed Sequence Tag; DGC, *Drosophila* Gene Collection del BDGP, Berkeley *Drosophila* Genome Project), cuya información se resume en la **Tabla 7**. Los ESTs de todos los genes seleccionados se encontraban clonados en el vector pOT2 que presenta resistencia al Cloranfenicol, por lo que los clones fueron crecidos en medio LB conteniendo dicho antibiótico. Cada clon fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* para confirmar la calidad del ADN. La identidad de cada EST se confirmó por secuenciación de sus plásmidos.

Tabla 7. Clones EST de *Drosophila* empleados para generar sondas de genes candidatos

GEN	CG	EST (tamaño total)	DGC1	Vector (tamaño total)	Primer F/R
<i>ACC</i>	CG11198	GH12002 (7838 pb)	UG.58 D7	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
<i>Jheh3</i>	CG15106	LD35885 (1574 pb)	UG.45 D12	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
<i>Taldo</i>	CG2827	LD23608 (1111 pb)	UG.14 F9	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
CG11334	CG11334	GH08894 (1455 pb)	UG.42 E4	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
CG4586	CG4586	LD40103 (2235 pb)	UG.36 B8	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
<i>EMC8-9</i>	CG3501	SD01117 (821 pb)	UG.20 D7	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
<i>dnc</i>	CG32498	GH12916 (2186 pb)	UG.42 H6	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6
CG6415	CG6415	GH04419 (1260 pb)	UG.42 C5	pOT2 (1665 pb)	T7/SP6

EST (Expressed Sequence Tag); DGC (*Drosophila* Gene Collection del BDGP, Berkeley *Drosophila* Genome Project); Primer F (forward); Primer R (reverse). Las siglas denotan el nombre de la librería, obtenidas de: LD (embrión de 0-22 hs); GH (cabeza de adulto); SD (línea celular Schneider S2).

Para el gen *CG12129*, debido a que no contábamos con el clon EST correspondiente, realizamos PCRs convencionales con primers específicos (**Tabla 6**), empleando como molde ADNc de muestras de embriones WT17 en una dilución 1/100. El producto de amplificación se corrió en un gel de agarosa en TAE al 1%, teñido con bromuro de etidio y la banda específica se extrajo del gel empleando el kit Mi Gel extraction (Metabion) siguiendo instrucciones del fabricante. Luego empleamos el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) para clonar el producto de PCR. La reacción de ligación se incubó por 30 minutos a 23°C y se almacenó a -20°C. Se transformaron células competentes XL1-Blue (Agilent Technologies), siguiendo el protocolo del fabricante. Al día siguiente se chequearon los transformantes por PCR convencional con primers Forward y Reverse de *CG12129* combinados con los primers del vector de clonación T7 y T3, empleando como molde una colonia de bacterias blanca por cada reacción de amplificación.

A partir de los clones obtenidos para el gen *CG12129* y los ESTs para los otros 8 genes candidatos, se realizaron preparaciones de ADN plasmídico (kit MIDI Quiagen). Se tomaron 2 ml de cada cultivo líquido LB y se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 segundos. Se descartaron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en 200 µl de Buffer E1. Posteriormente cada tubo se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en 200 µl de Buffer E2. Luego se agregaron 200 µl de Buffer E3 y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. Los sobrenadantes de cada muestra fueron transferidos a 500 µl de isopropanol y centrifugados a 4°C a máxima velocidad por 25 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y se lavaron los pellets con 300 µl de etanol al 80% y centrifugación a 4°C a máxima velocidad por 5 minutos. Se descartaron los sobrenadantes, se secaron los pellets al aire y se resuspendieron en 30 µl de agua destilada. Las muestras de ADN correspondiente a cada gen candidato se verificaron en geles de agarosa TAE al 0.8% teñidos con bromuro de etidio para confirmar la presencia del plásmido con el inserto de cada gen y se cuantificaron mediante nanodrop.

3.2. Síntesis y marcaje de sondas

Los ADNs plasmídicos de los 9 genes candidatos se usaron para transcribir y marcar con DIG sondas de ARN específicas S y AS para estos genes. Para ello, primero se linearizaron los plásmidos en cada muestra adicionando a cada reacción 1 µg de ADN, 1 µl de una enzima de restricción específica para cada caso (**Tabla 8**), 2 µl de buffer 10X específico para cada enzima, completando el volumen a 20 µl con H₂O milli-Q estéril y finalmente incubando las reacciones 1 hora o toda la noche (ON) a 37°C en un termobloque. Los tamaños de bandas esperados en cada caso a partir de las linearizaciones (**Tabla 8**) se chequearon en geles de agarosa. Posteriormente, se inactivaron las digestiones a 65°C durante 20 minutos a excepción de la reacción con *SpeI* que se inactivó a 80°C.

Tras la linearización, se sintetizaron y marcaron las sondas AS y S para cada gen candidato empleando el kit DIG RNA Labeling (Roche). Cada reacción contenía 5 µl de ADN linearizado (aproximadamente 250 ng), 8 µl de H₂O milli-Q estéril, 2 µl de DIG RNA Labeling mix, 2 µl de buffer de transcripción 10X, 1 µl de inhibidor de ARNasa y 2 µl de la ARN polimerasa correcta para sintetizar las sondas S (polimerasa T7) o las sondas AS (polimerasa Sp6 o T3 en el caso del gen *CG12129*). Estas reacciones se incubaron 2 horas en un termobloque a 37°C. Todas las reacciones se chequearon en geles de agarosa. Los tamaños en pares de bases esperados de cada sonda S y AS para cada gen candidato se resumen en la **Tabla 8**. Se pararon las reacciones añadiendo 2 µl de ADNasa libre de ARNasas e incubando por 15 minutos en termobloque a 37°C. Posteriormente se añadieron: 2 µl de EDTA (0.2 M, pH8), 2.5 µl de LiCl y 75 µl de etanol absoluto frío. Las mezclas se dejaron precipitando ON a -20°C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 4°C durante 20 minutos a 14000 rpm. Se descartaron los sobrenadantes y se añadieron 100 µl de etanol al 70% frío a cada tubo. Se centrifugaron las muestras otros 10 minutos a 4°C y 14000 rpm, se descartaron nuevamente los sobrenadantes, se dejaron secar los pellets, se resuspendieron éstos en 50 µl de H₂O milli-Q estéril y se almacenaron a -20°C.

Tabla 8. Linearización de plásmidos para construir las sondas de *in situ* de genes candidatos

Miniprep	GEN	CG	1 µg (en µl)	ER		Fragmento a usar (en pb)		Tamaño de sonda (en pb)	
				AS	S	AS	S	AS	S
1	ACC	CG11198	3.7	EcoRI+ EcoRV	XhoI	400	3743	400	2181*
2	CG12129	CG12129	1.3	NotI	SpeI	4157	4157	267	266
3	Jheh3	CG15106	6.7	EcoRI	XhoI	3177	2751	1573*	1189*
4	Taldo	CG2827	8.4	EcoRI	XhoI	2326	2736	722	472
5	CG11334	CG11334	5.4	EcoRI	XhoI	3080	3080	1476*	1518*
6	CG4586	CG4586	7.2	EcoRI	XhoI	3245	2762	164	1200
7	dnc	CG32498	7	EcoRI	XhoI	3811	3811	2207*	2249*
8	CG6415	CG6415	7.36	EcoRI	XhoI	2392	2885	788	1323*
9	EMC8-9	CG3501	9	EcoRI	XhoI	2446	2446	842*	884*

* Se realizaron posteriormente PCRs para obtener tamaños de sondas más pequeños. AS: sonda antisentido; ER: enzima de restricción; pb: pares de bases; S: sonda sentido.

En algunos casos donde las digestiones con enzimas de restricción resultaban en tamaños de sondas mayores a 1200 pares de bases (*, **Tabla 8**) se probó también a realizar la síntesis y marcaje de las sondas empleando como molde reacciones de PCR, realizadas sobre los productos de digestión, empleando los primers SP6 y Foward de cada gen para la síntesis de las sondas AS y los primers T7 y Reverse de cada gen para la síntesis de las sondas S (**Tabla 9**). En esos casos, los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa y la banda correspondiente a la sonda se purificó del gel empleando el kit mi-Gel Extraction (Metabion) siguiendo las instrucciones del fabricante, previo a seguir con el protocolo de marcaje.

Tabla 9. Construcción mediante PCR de las sondas de *in situ* de genes candidatos

GEN	CG	PRIMERS		Tamaño de sonda obtenida por PCR (en pb)	
		SP6/FORWARD	T7/REVERSE	AS	S
<i>ACC</i>	CG11198		5'-AATACGACTCACTATAG-3' 5'-CTCTCGCTGGAGAACTGGAC-3'		332
<i>Jheh3</i>	CG15106	5'-ATTTAGGTGACACTATA-3' 5'-CCGCAATCGGAGATCGATGA-3'	5'-AATACGACTCACTATAG-3' 5'-CAGGTAATTGTCCCGCCAGT-3'	1200	480
<i>CG11334</i>	CG11334	5'-ATTTAGGTGACACTATA-3' 5'-ACGGCGGTCAACATGAAGAT-3'	5'-AATACGACTCACTATAG-3' 5'-CGGTCGCGTCCAGAAATCTA-3'	1000	500
<i>dnc</i>	CG32498	5'-ATTTAGGTGACACTATA-3' 5'-AGAGCATGATACCGCCTTCG-3'	5'-AATACGACTCACTATAG-3' 5'-TTCGGCGAGGTTCTCCTGAT-3'	400	1800
<i>CG6415</i>	CG6415		5'-AATACGACTCACTATAG-3' 5'-CTTTCATCGCCGATTGGAG-3'		450
<i>EMC8-9</i>	CG3501	5'-ATTTAGGTGACACTATA-3' 5'-TTGATATTCCACGCGGCAA-3'	5'-AATACGACTCACTATAG-3' 5'-ACTAATCCTTCCCGTTTCGGC-3'	765	257

AS: sonda antisentido; ER: enzima de restricción; pb: pares de bases; S: sonda sentido. El tipo de fuente “negrita” se emplea para indicar los primers SP6 y T7 que se combinaron con los primers Forward y Reverse, respectivamente, diseñados para cada gen.

Todas las sondas obtenidas y marcadas con DIG fueron cuantificadas mediante nanodrop previo a las hibridaciones *in situ* de cerebros de larvas L3 WT. La sonda AS para el gen *ACC* no pudo sintetizarse y marcarse efectivamente por ninguno de los métodos ensayados por lo que no se realizaron hibridaciones *in situ* para este gen.

3.3. Disección de cerebros de larvas

Se siguió el protocolo de Wu y Luo, 2006. Se colectaron 200-300 larvas L3 WT de la pared de los tubos de cultivo, con un pincel mojado en PBT 1X (50 ml 1X PBS + 250 µl 20% Tween-20). Se pasaron a placas con PBT frío y mediante pinzas y agujas se removieron sus cerebros, tirando desde el tercio ventral de la pared abdominal de las larvas y manteniéndolas sujetas por el gancho bucal. Se separaron del cuerpo de la larva los cerebros, sujetos a los ganchos bucales y se almacenaron en etanol frío hasta las hibridaciones *in situ*.

3.4. Hibridación *in situ*

Se sacaron todas las muestras de cerebro de larvas L3 WT del etanol frío y se lavaron 8 veces durante 5 minutos en metanol con agitación. Posteriormente se

lavaron durante 5 minutos en una mezcla 1:1 de metanol: H₂O y luego 2 minutos en H₂O. Se guardaron a -20°C por 10 minutos en una mezcla de 80% acetona en H₂O. Se lavaron 2 veces durante 5 minutos en PBT 1X con agitación, se fijaron durante 20 minutos en paraformaldehído al 4% y se hicieron 5 lavados de 5 minutos en PBT 1X. Posteriormente se bloquearon durante 10 minutos con agitación en una mezcla 1:1 de PBT 1X y solución de hibridación con esperma de salmón (50% formamida desionizada, 5X SSC, 100 µg/ml de ADN de salmón, 50 µg/ml de heparina, 0.1% Tween 20, H₂O). Luego se lavaron las muestras en solución de hibridación con esperma de salmón durante 10 minutos a 55°C y se pre-hibridaron a 55°C por 1 hora en la misma solución fresca. Se separaron las muestras para hibridar con las diferentes sondas S y AS para los 8 genes candidatos (alrededor de 20 cerebros de larvas L3 para cada condición). Se desnaturalizaron todas las sondas 5 minutos a 80°C (1-3 µl de sonda para una concentración de 2 ng/µl en 100 µl de solución de hibridación con esperma de salmón) y se dejaron 10 minutos en hielo. Se hibridaron las muestras con cada sonda S y AS para cada gen candidato ON a 55°C en cámara húmeda. Al segundo día de hibridación, se lavaron las muestras 2 veces por 20 minutos a 60°C en solución de hibridación sin esperma de salmón, 4 veces por 20 minutos a 60°C en una mezcla 1:1 de solución de hibridación sin esperma de salmón:PBT y 2 veces por 20 minutos a TA en PBT. Finalmente, todas las muestras se incubaron en una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-Digoxigenina-AP, Fab fragments (Roche) en PBT, ON a 4°C. Al tercer día de hibridación, se lavaron las muestras 4 veces por 20 minutos en PBT, 3 veces por 5 minutos en Buffer 3 (NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, Tris HCl pH 9.5 100 mM, 0.1% Tween 20), agregando en el último lavado 3 µl de NBT (Roche) y 2.3 µl de BCIP (Roche) por ml de Buffer 3. Las muestras se incubaron en oscuridad, chequeando el desarrollo de color cada 5 minutos bajo lupa. Las reacciones AS y S para cada gen se frenaron con 2 lavados de 5 minutos en PBT 1X, en el momento específico en que se observó desarrollo de color en cada una de las reacciones AS. Las muestras se almacenaron en PBS 1X a 4°C hasta el momento del montaje en portaobjetos con una gota de glicerol al 80% para observar y fotografiar con el microscopio.

4. Cepas y cruces de moscas transgénicas para el silenciamiento y la sobre-expresión de los genes candidatos

Para los experimentos de silenciamiento génico de los tres candidatos finales (*ACC*, *CG10932* y *CG4586*) a nivel pan-neuronal, dopaminérgico, colinérgico y glial (**Figura 34**), se cruzaron moscas transgénicas con secuencias GAL4 unidas a un promotor pan-neuronal (*elav-GAL4*, Bloomington #8765), dopaminérgico (*TH-GAL4*, Bloomington #8848), colinérgico (*cha-GAL4*, Bloomington #6798) o glial (*repo-GAL4*, Bloomington #7415), con moscas UAS-ARNi específicas para cada gen candidato obtenidas del VDCR: *ACC* #8105/GD; *CG10932* #107027/KK y #16099/GD; *CG4586* #21886/GD. Se construyeron los siguientes genotipos experimentales: *elav-GAL4/UAS-ARNi-ACC*; *TH-GAL4/UAS-ARNi-ACC*; *cha-GAL4/UAS-ARNi-ACC*; *+/UAS-ARNi-ACC;repo-GAL4/+*; *elav-GAL4/UAS-ARNi-CG4586*; *TH-GAL4/UAS-ARNi-CG4586*; *cha-GAL4/UAS-ARNi-CG4586*; *+/UAS-ARNi-CG4586;repo-GAL4/+*; *elav-GAL4/UAS-ARNi-CG10932¹⁰⁷⁰²*; *TH-GAL4/UAS-ARNi-CG10932¹⁰⁷⁰²⁷*; *cha-GAL4/UAS-CG10932¹⁰⁷⁰²⁷*; *+/UAS-ARNi-CG10932¹⁰⁷⁰²⁷;repo-GAL4/+*; *elav-GAL4/UAS-ARNi-CG10932¹⁶⁰⁹⁹*; *TH-GAL4/UAS-ARNi-CG10932¹⁶⁰⁹⁹*; y *+/UAS-ARNi-CG10932¹⁶⁰⁹⁹;repo-GAL4/+*.

Para los experimentos de sobre-expresión pan-neuronal, dopaminérgica y colinérgica de los genes *ACC* y *CG10932* en un contexto mutante de ND *parkin*, se utilizaron la cepa *UAS-ACC* (gentilmente cedida por el Dr. Parvy, Parvy *et al.*, 2012) y la cepa *UAS-CG10932* (Flyorf #F000986; Bischof *et al.*, 2013) y se cruzaron con las cepas *elav-GAL4*, *TH-GAL4* y *cha-GAL4* (**Figura 34**). Se obtuvieron los siguientes genotipos experimentales: *elav-GAL4/UAS-ACC;parkin*; *TH-GAL4/UAS-ACC;parkin*; *cha-GAL4/UAS-ACC;parkin*; *elav-GAL4/+;parkin/UAS-CG10932*; *TH-GAL4/+;parkin/UAS-CG10932*; y *cha-GAL4/+;parkin/UAS-CG10932*.

Todas las cepas empleadas fueron mantenidas con medio de cultivo estándar a temperatura ambiente de 25°C y en un régimen de luz controlado en ciclos de 12:12 horas de luz:oscuridad.

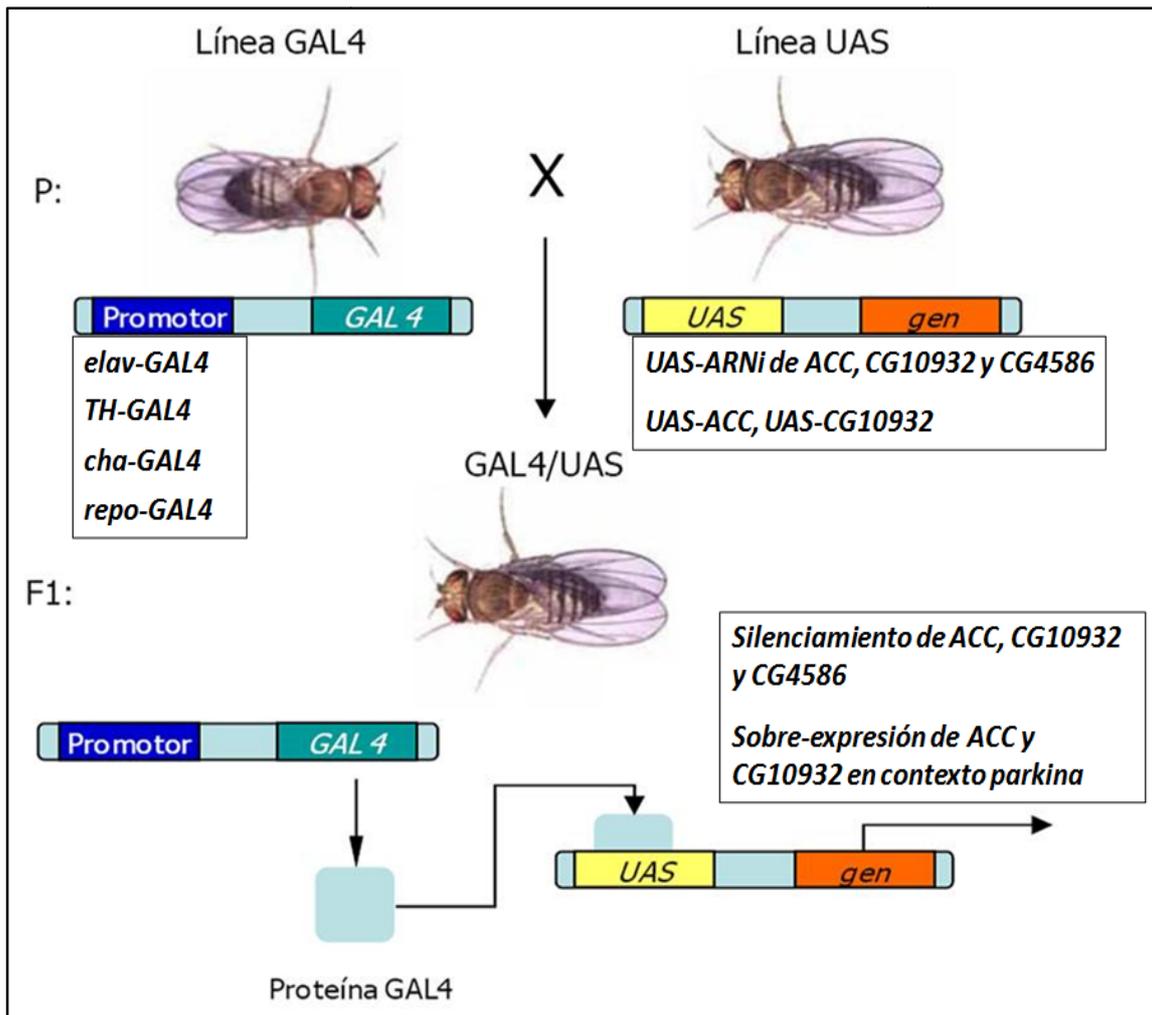


Figura 34. Silenciamiento y sobre-expresión de genes candidatos para los ensayos de validación *in vivo*. Esquema de cruces de cepas transgénicas GAL4 y UAS para el silenciamiento pan-neuronal, dopaminérgico, colinérgico y glial de los genes ACC, CG4586 y CG10932 y la sobre-expresión pan-neuronal, dopaminérgica y colinérgica de ACC y CG10932. (Imagen adaptada de <http://slideplayer.es/slide/3413453/>).

5. Medición del largo de vida

Se empleó básicamente el mismo protocolo descrito en el Capítulo II (Figura 25). Se colocaron 100 hembras vírgenes recién emergidas de cada genotipo (cepas experimentales ARNi de los genes candidatos con los diversos GAL4, mutantes *parkin* solos o que sobre-expresaban los genes candidatos ACC o CG10932, además de sus respectivos controles parentales) en tubos de cultivo, cada uno con aproximadamente 20-25 individuos, en condiciones estándar. En cada tubo se registró cada dos días el número de moscas muertas y se transfirieron a un tubo fresco el resto de las moscas hasta la muerte de todos los individuos. Se ingresaron los datos en tablas Excel y se

construyeron gráficos. Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa STATISTICA (7.0 Version, StatSoft, Inc.).

6. Ensayos de locomoción (climbing)

Se empleó el mismo protocolo general descrito en el Capítulo II (**Figura 24**). Brevemente, usamos machos de 5, 15 y 25 días de edad, de las cepas ARNi de los genes candidatos *ACC* y *CG10932* con los diversos GAL4, mutantes *parkin* solos o que sobre-expresaban los genes candidatos *ACC* o *CG10932*, además de sus respectivos controles parentales. Se analizaron 50 moscas por genotipo y edad, separadas en tubos de 10 individuos por condición. Las moscas fueron mantenidas durante los días del experimento en medio de cultivo fresco, cambiándolas a un tubo nuevo cada dos días para mantenerlas en buenas condiciones. Los tubos con moscas de cada muestra, 5 réplicas por condición, se golpearon contra la mesa varias veces consecutivas, para hacer caer las moscas al fondo de los tubos antes de que comenzaran a trepar. Diez segundos después se registró el número de moscas que trepaban y atravesaban una línea marcada a 8 cm de la base de cada tubo. Se repitió este procedimiento para cada tubo 10 veces, dejando un intervalo de un minuto entre cada medición. Todos los experimentos fueron filmados y posteriormente analizados. Los datos obtenidos fueron ingresados en tablas Excel, graficados por genotipo y edad y comparados estadísticamente mediante el programa STATISTICA (7.0 Version, StatSoft, Inc.).

RESULTADOS CAPÍTULO III

1. Selección de genes candidatos a neuroprotectores

Se partió de la lista inicial de 633 genes candidatos, que eran aquellos genes expresados diferencialmente de manera significativa en las comparaciones genotípicas mRNA-Seq postuladas en el Capítulo I como relevantes para la búsqueda de genes neuroprotectores: *WT16 vs Ho16*; *WT17 vs Ho17* y (*Ho16 vs Ho17*)-(*WT16 vs WT17*). Tal como se indicó en el Capítulo I, planteamos la hipótesis de que aquellos genes expresados diferencialmente de manera significativa en la comparación *WT16 vs Ho16* se asociarían principalmente al proceso de ND (estadio 16) y que aquellos que lo hicieran en las comparaciones *WT17 vs Ho17* y (*Ho16 vs Ho17*)-(*WT16 vs WT17*) se asociarían principalmente al proceso de reversión de ND (estadio 17).

A continuación, se resumen los resultados de la aplicación de los ocho filtros secuenciales aplicados con el fin de seleccionar un número reducido de genes a validar experimentalmente.

1.1. Incongruencias en el patrón de expresión entre las tres comparaciones genotípicas de interés (Filtro 1)

Consistió en descartar aquellos genes que presentaban resultados contradictorios entre las comparaciones genotípicas. Por ejemplo, aquellos genes que no presentaban diferencias significativas en las comparaciones *WT16 vs Ho16*, *WT17 vs Ho17* y *WT16 vs WT17*, pero sí en *Ho16 vs Ho17*. Se descartaron 178 genes (**Figura 35 y Tabla Suplementaria 7**).

Figura 35 (página siguiente). Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 1. El gen *sugarless* ejemplifica un patrón congruente porque todas las comparaciones genotípicas coinciden en la disminución de su expresión en *Ho16* y *Ho17* y por tanto sobrepasó el Filtro 1. Sin embargo, el gen *Sec61beta* fue descartado porque los datos mostraron una incongruencia: el gen también debería haber mostrado una sub-expresión significativa en el *WT17* respecto al *WT16* o no debería haber mostrado diferencias significativas en la comparativa *Ho16 vs Ho17*. DE= Análisis de expresión diferencial de los resultados mRNA-Seq.

GENES INICIALES: 633					
Comparación genotípica DE					
Nombre del gen	WT16 vs Ho16	WT17 vs Ho17	Ho16 vs Ho17	WT16 vs WT17	Filtro 1
<i>sugarless</i>	<i>sub-expresado</i>	<i>sub-expresado</i>	sin diferencias	sin diferencias	ACEPTADO
<i>Sec61beta</i>	sin diferencias	sin diferencias	<i>sub-expresado</i>	sin diferencias	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 178					

1.2. Asociación previa demostrada a procesos de neurodegeneración/ neuroprotección en *Drosophila* (Filtro 2)

Consistió en descartar de los 455 genes resultantes del Filtro 1, aquellos genes que ya estaban asociados empíricamente a procesos de ND en *Drosophila* (5% de la lista, ver Capítulo I). Se descartaron 41 genes (**Figura 36** y **Tabla Suplementaria 8**).

GENES INICIALES: 455		
Nombre del gen	Asociación previa a ND/ NP	Filtro 2
<i>Heat-shock-protein-70Ba</i>	ej: Shukla <i>et al.</i> , 2014. <i>Hsp-70</i> suppresses paraquat-induced neurodegeneration by inhibiting JNK and caspase-3 activation in <i>Drosophila</i> model of Parkinson's disease. PLoS One. 2014 Jun 2;9(6):e98886.	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 41		

Figura 36. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 2. El gen *Hsp70Ba* fue descartado porque ya se había demostrado empíricamente su asociación con ND o NP en *Drosophila*.

1.3. Falta de expresión en el SN de *Drosophila* (Filtro 3)

Consistió en descartar de los 414 genes candidatos resultantes de la aplicación del Filtro 2, aquellos genes cuya expresión en el SN de *Drosophila* no había sido reportada en Flybase, ya que en ese caso tienen muchas menos posibilidades de

ejercer una función neuroprotectora respecto a los genes que sí se expresan en el SN. Se descartaron 196 genes (**Figura 37** y **Tabla Suplementaria 9**).

GENES INICIALES: 414		
Nombre del gen	Expresión SNC <i>Drosophila</i>	Filtro 3
CG11334	<i>Expression at moderate levels in the following post-embryonic organs or tissues: adult head, adult eye, larval central nervous system</i>	ACEPTADO
nimrod C4	Expression in other tissues or no information	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 196		

Figura 37. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 3. La aplicación del Filtro 3 permitió descartar al gen *nimrod C4* ya que según Flybase no existían datos sobre su expresión en el SN. Por el contrario, el gen *CG11334* fue seleccionado ya que estaba confirmado empíricamente que se expresa en el SN.

1.4. Ausencia de cepas transgénicas de *Drosophila* para sobre-expresar o inhibir su expresión (Filtro 4)

Este filtro consistió en descartar de los 218 genes candidatos resultantes de la aplicación del Filtro 3, aquellos genes para los que no existiesen cepas transgénicas, principalmente cepas necesarias para el silenciamiento génico, en los centros repositórios de cepas o reportadas en la literatura. Se descartaron 28 genes (**Figura 38** y **Tabla Suplementaria 10**).

GENES INICIALES: 218				
Nombre del gen	STOCKS	UAS_CONSTRUCT	RNAi	Filtro 4
CG10932	Bloomington 33534: w* P{EP}CG10932G917/FM7h 18777: w1118 PBac{WH}CG10932f04498 Harvard PBac{WH}CG10932f04498 VDRC v107027: P{KK100320}VIE-260B v16099: w1118; P{GD7132}v16099 v16957: w1118; P{GD7132}v16957/CyO	P{GD7132} P{KK100320}	DRSC - Results from RNAi screens. FBgn0029969 GenomeRNAi- 31695	ACEPTADO
CG14096	-	-	-	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 28				

Figura 38. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 4. El ejemplo muestra que mediante el Filtro 4 se descartó al gen *CG14096* ya que no existían stocks transgénicos de *Drosophila* para silenciarlo o sobre-expresarlo. El otro ejemplo, el gen *CG10932*, pasó el Filtro 4 ya que existían cepas de moscas transgénicas disponibles para realizar nuestros ensayos.

1.5. Falta de homología con genes humanos (Filtro 5)

Consistió en descartar de los 190 genes candidatos resultantes de la aplicación del Filtro 4, aquellos genes para los que no se hubieran identificado genes homólogos en humanos, ya que preferimos seleccionar genes potencialmente relevantes para la salud humana. Se descartaron 99 genes (**Figura 39 y Tabla Suplementaria 11**).

GENES INICIALES: 190		
Nombre del gen	Homologos en humanos	Filtro 5
dunce	<i>Hsap\PDE4B</i> <i>Hsap\PDE4D</i>	ACEPTADO
Cuticular protein 100A	-	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 99		

Figura 39. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 5. El ejemplo muestra que en el Filtro 5 se descartó al gen *Cuticular protein 100A* ya que no

existen homólogos humanos identificados. El otro ejemplo, el gen *dnc*, pasó el Filtro 5 ya que tiene dos genes homólogos en humanos.

1.6. Previa asociación demostrada a procesos de neurodegeneración/ neuroprotección de los genes homólogos humanos (Filtro 6)

Consistió en descartar de los 91 genes candidatos resultantes de la aplicación del Filtro 5, aquellos genes que presentan homólogos humanos confirmados empíricamente como asociados a procesos de ND, ya que esto restaría novedad y relevancia a nuestros hallazgos. Se descartaron 17 genes (Figura 40 y Tabla Suplementaria 12).

GENES INICIALES: 91				
Gen de <i>Drosophila</i>	Gen homólogo humano	Asociación previa a ND/ NP en humanos		Filtro 6
<i>CG40006</i>	<i>CD36</i>	<i>Degeneración retinal</i>	DisGeNET database	DESCARTADO
<i>CG42331</i>	<i>LPO</i>	<i>Enfermedad de Parkinson</i>	DisGeNET database	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 17				

Figura 40. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 6. El ejemplo muestra que el Filtro 6 permitió descartar los genes *CG40006* y *CG42331* ya que estaba empíricamente demostrada la asociación de sus homólogos humanos *CD36* y *LPO* con degeneración retinal y PD, respectivamente.

1.7. Falta de expresión de los genes homólogos humanos en el SN (Filtro 7)

Consistió en descartar de los 74 genes candidatos resultantes de la aplicación del Filtro 6, aquellos genes que presentaban homólogos humanos para los que no se ha reportado expresión en el SN. Al existir una alta conservación de genes entre ambas especies, la relevancia del gen en procesos de NP en humanos será menor si su gen homólogo no se expresa en el SN. Se descartaron 27 genes (Figura 41 y Tabla Suplementaria 13).

GENES INICIALES: 74				
Gen de <i>Drosophila</i>	Gen homólogo humano	Expresión SN humanos		Filtro7
CG6026	Hsap\KCNH8	Cerebro	UP_TISSUE database	ACEPTADO
CG6188	Hsap\GNMT	Pancreas Placenta	UP_TISSUE database	DESCARTADO
GENES DESCARTADOS: 27				

Figura 41. Ejemplo de descarte de genes candidatos por aplicación del Filtro 7. El Filtro 7 permitió descartar al gen *CG6188* ya que no estaba reportada la expresión en tejido nervioso para su homólogo humano, *GNMT*. Sin embargo, el gen *CG6026*, pasó el Filtro 7 ya que estaba confirmado empíricamente que su homólogo humano, el gen *KCNH8*, se expresa en el cerebro.

Mediante la aplicación consecutiva de los siete filtros mencionados se seleccionaron 47 genes candidatos a neuroprotectores (**Tabla 10**). Estos genes tienen relación mayormente con procesos de estrés oxidativo, mitocondria y regulación hormonal. Algunos de ellos no tienen aún asignada ninguna función biológica.

Tabla 10. Identidad de los 47 genes de *Drosophila* candidatos a neuroprotectores.

CG	Nombre	Símbolo	GO_Función molecular (reporte textual de Flybase)	GO_Proceso biológico (reporte textual de Flybase)
CG11198	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>	<i>ACC</i>	acetyl-CoA carboxylase activity ; ATP binding ; Gbiotin carboxylase activity ; metal ion binding	fatty acid biosynthetic process
CG2198	<i>Amalgam</i>	<i>Ama</i>	antigen binding	cell adhesion
CG9307	<i>Chitinase 5</i>	<i>Cht5</i>	chitinase activity ; chitin binding; cation binding	chitin catabolic process
CG10242	<i>Cytochrome P6a23</i>	<i>Cyp6a23</i>	electron carrier activity ; heme binding ; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	oxidation-reduction process
CG3972	<i>Cytochrome P450-4g1</i>	<i>Cyp4g1</i>	electron carrier activity ; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen ; heme binding	lipid metabolic process ; oxidation-reduction process
CG10248	<i>Cytochrome P450-6a8</i>	<i>Cyp6a8</i>	electron carrier activity ; alkane 1-monooxygenase activity ; heme binding	insecticide metabolic process ; lauric acid metabolic process ; response to caffeine ; oxidation-reduction process
CG32498	<i>dunce</i>	<i>dnc</i>	3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity	cyclic nucleotide metabolic process ; cAMP-mediated signaling ; courtship behavior ; learning ; olfactory learning ; behavioral response to ethanol ; locomotor rhythm ; reproduction ; synaptic transmission ; circadian rhythm ; mating behavior ; memory ; nonassociative learning ; oogenesis ; axon extension ; short-term memory ; conditioned taste aversion ; signal transduction

CG32180	<i>Ecdysone-induced protein 74EF</i>	<i>Eip74EF</i>	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	salivary gland cell autophagic cell death ; autophagy ; regulation of development, heterochronic ; regulation of transcription, DNA-dependent ; oogenesis
CG3132	<i>Ectoderm3</i>	<i>Ect3</i>	beta-galactosidase activity ; cation binding	autophagic cell death ; carbohydrate metabolic process
CG3501	<i>EMC8-9</i>	<i>EMC8-9</i>	-	-
CG2198	<i>Ganny-smith</i>	<i>granny-smith</i>	antigen binding	cell adhesion
CG11143	<i>Inos</i>	<i>Inos</i>	inositol-3-phosphate synthase activity	inositol biosynthetic process ; phospholipid biosynthetic process
CG15106	<i>Juvenile hormone epoxide hydrolase 3</i>	<i>Jheh3</i>	juvenile hormone epoxide hydrolase activity ; epoxide hydrolase activity ; G cis-stilbene-oxide hydrolase activity	juvenile hormone catabolic process ; response to toxin
CG32475	<i>Methuselah-like 8</i>	<i>mthl8</i>	G-protein coupled receptor activity	G-protein coupled receptor protein signaling pathway ; determination of adult lifespan ; response to stress
CG13608	<i>Mitochondrial ribosomal protein S24</i>	<i>mRpS24</i>	structural constituent of ribosome ; RNA binding	translation
CG31839	<i>Nimrod B2</i>	<i>nimB2</i>	-	mesoderm development
CG3479	<i>Outspread</i>	<i>osp</i>	-	-
CG2103	<i>Polypeptide GalNAc transferase 6</i>	<i>pgant6</i>	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity ;	oligosaccharide biosynthetic process
CG10072	<i>Sugarless</i>	<i>sgl</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase activity	segment polarity determination ; glycosaminoglycan biosynthetic process ; heparan sulfate proteoglycan biosynthetic process, polysaccharide chain biosynthetic process ; epithelial cell migration, open tracheal system ; cell surface receptor linked signaling pathway ; mesoderm migration involved in gastrulation ; Wnt receptor signaling pathway ; chondroitin sulfate biosynthetic process ; heart development ; smoothed signaling pathway ; fibroblast growth factor receptor signaling pathway ; olfactory behavior ; inter-male aggressive behavior ; mushroom body development ; oxidation-reduction process
CG2827	<i>Taldo</i>	<i>Taldo</i>	sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerontransferase activity	pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch ; pentose-phosphate shunt
CG6653	<i>Ugt86De</i>	<i>Ugt86De</i>	glucuronosyltransferase activity	metabolic process
CG10320	CG10320	CG10320	NADH dehydrogenase activity ;	RNA import into nucleus ; mitochondrial electron transport , NADH to ubiquinone
CG10863	CG10863	CG10863	alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity	oxidation-reduction process
CG10932	CG10932	CG10932	acetyl-CoA C-acetyltransferase activity	fatty acid biosynthetic process ; pyruvate metabolic process ; mitotic spindle organization
CG11334	CG11334	CG11334	translation regulator activity	translation ; wing disc development
CG12129	CG12129	CG12129	RNA binding ; catalytic activity	regulation of transcription, DNA-dependent
CG12256	CG12256	CG12256	serine-type endopeptidase activity	proteolysis
CG12929	CG12929	CG12929	-	-
CG13678	CG13678	CG13678	-	-
CG16704	CG16704	CG16704	serine-type endopeptidase inhibitor activity	-
CG18135	CG18135	CG18135	protein binding ; carbohydrate binding ; phospholipase C activity ; glycerophosphodiester phosphodiesterase activity	glycerol metabolic process ; lipid metabolic process ; intracellular signal transduction
CG30382	CG30382	CG30382	endopeptidase activity	response to DNA damage stimulus
CG3108	CG3108	CG3108	metallocarboxypeptidase activity ; zinc ion binding	proteolysis
CG31549	CG31549	CG31549	oxidoreductase activity	metabolic process
CG31751	CG31751	CG31751	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	-
CG3294	CG3294	CG3294	mRNA binding ; zinc ion binding ; nucleotide binding	nuclear mRNA splicing, via spliceosome
CG3419	CG3419	CG3419	mannosyltransferase activity	GPI anchor biosynthetic process

CG4017	CG4017	CG4017	metallocarboxypeptidase activity ; zinc ion binding	proteolysis
CG42343	CG42343	CG42343	-	-
CG4586	CG4586	CG4586	acyl-CoA oxidase activity ; acyl-CoA dehydrogenase activity ; flavin adenine dinucleotide binding	fatty acid beta-oxidation
CG5987	CG5987	CG5987	tubulin-tyrosine ligase activity	protein modification process
CG6026	CG6026	CG6026	-	-
CG6415	CG6415	CG6415	aminomethyltransferase activity	glycine catabolic process
CG6847	CG6847	CG6847	triglyceride lipase activity	lipid metabolic process
CG8111	CG8111	CG8111	-	-
CG9360	CG9360	CG9360	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	metabolic process
CG9449	CG9449	CG9449	acid phosphatase activity	phagocytosis, engulfment

1.8. Selección de genes asociados a la vía de *parkin* (Filtro 8)

Debido a la imposibilidad de validar 47 genes *in vivo* dentro del plazo de un doctorado, decidimos reducir aún más la lista de candidatos, usando búsquedas bibliográficas y bases de datos para analizar posibles interacciones directas o indirectas entre dichos genes. La **Figura 42** resume el resultado del análisis mediante STRING (<https://string-db.org/>) de posibles interacciones entre las proteínas codificadas por estos 47 genes. La **Figura 43** resume el resultado del análisis mediante STITCH (<http://stitch.embl.de/>) de posibles interacciones físicas o funcionales entre las proteínas codificadas por estos 47 genes y grupos químicos.

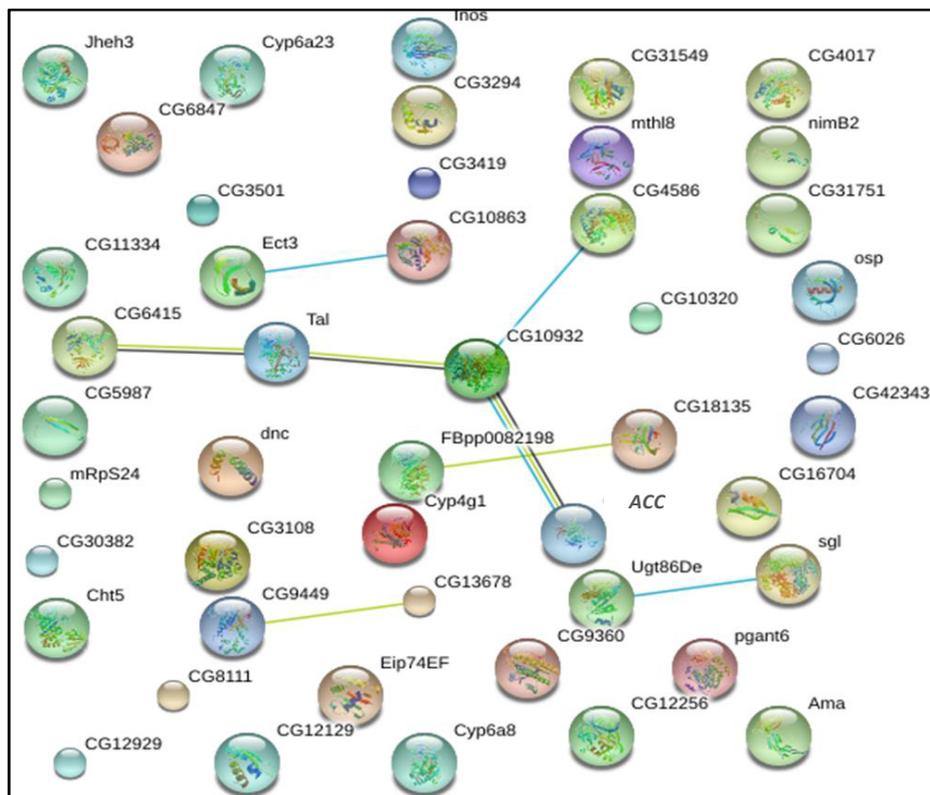


Figura 42 (página anterior). Análisis mediante el programa STRING de posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los 47 genes candidatos seleccionados. Las esferas representan proteínas. Su tamaño es mayor si hay información estructural asociada a la proteína. Los colores de las líneas representan el tipo de evidencia para predecir su asociación: verde ("neighborhood"-conservación), celeste (bases de datos), púrpura (experimental). Los grosores de las líneas representan el grado de confianza de la predicción de interacción. Se empleó un límite de confianza alto (0.7), que representa la probabilidad de que la interacción predicha exista en el mismo mapa metabólico de la base de datos KEGG.

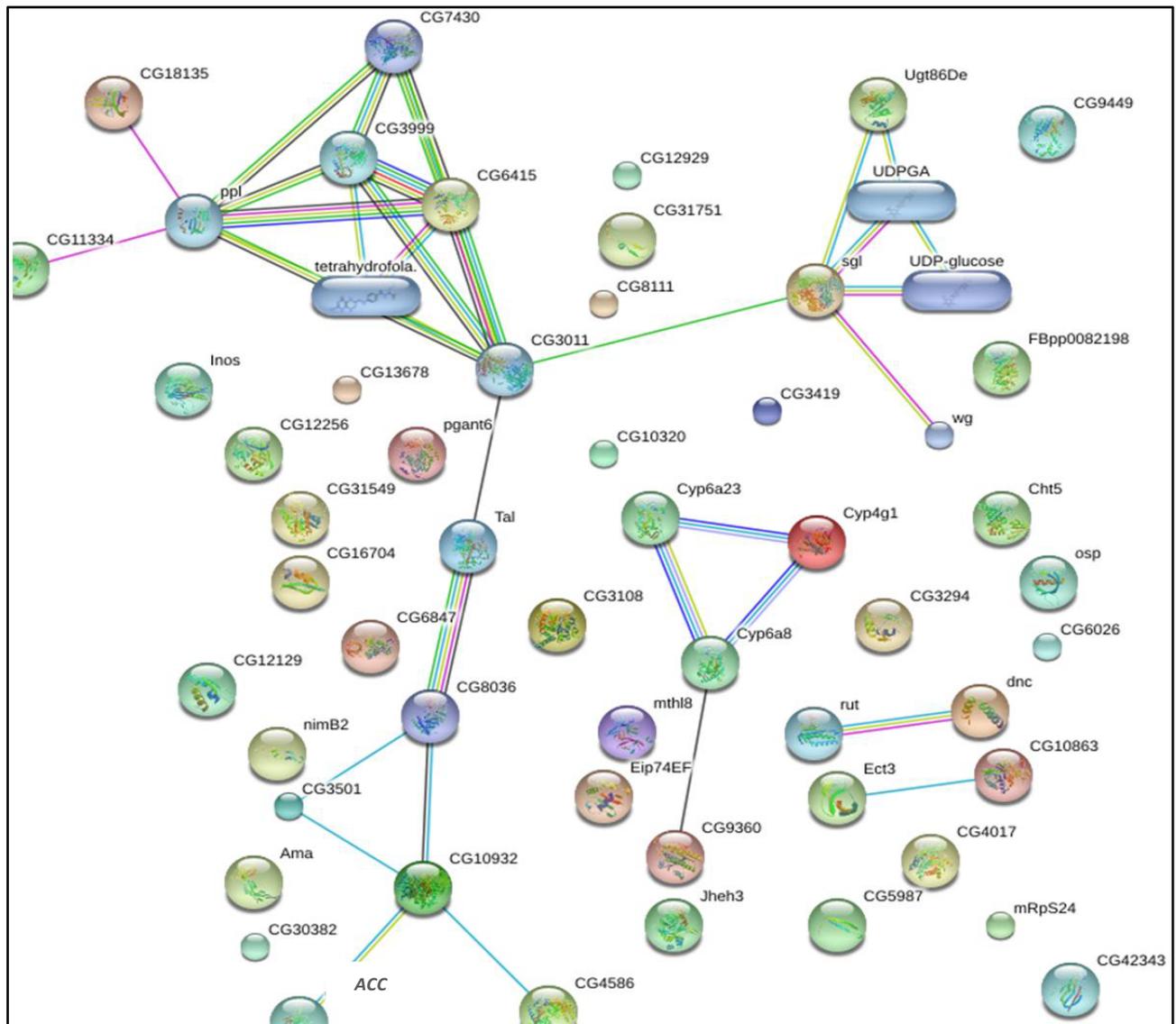
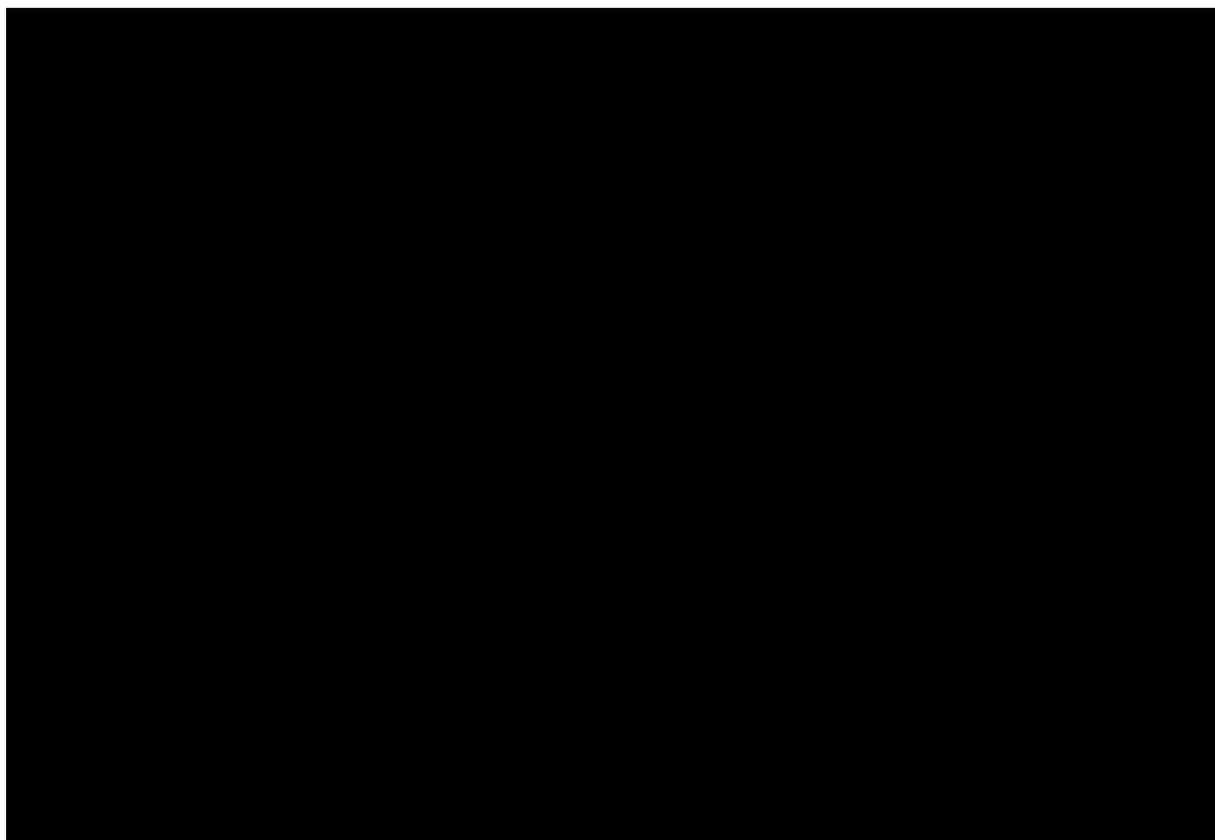


Figura 43. Análisis mediante el programa STITCH de posibles interacciones entre las proteínas codificadas por estos 47 genes y grupos químicos. Las esferas representan proteínas. Su tamaño es mayor si hay información estructural asociada a la proteína. Los colores de las líneas representan el tipo de evidencia para predecir su asociación: verde ("neighborhood"-conservación), celeste (bases de datos), púrpura (experimental), rojo (fusión), negro (co-expresión). Los grosores de las líneas representan el grado de confianza de la predicción de interacción. Se empleó un límite

de confianza alto (0.7), probabilidad que la interacción predicha exista en el mismo mapa metabólico de la base de datos KEGG.

Alternativamente, se tuvieron también en cuenta las interacciones entre dichos genes y otros genes asociados a ND/NP en *Drosophila* y/o humanos (**Figura Suplementaria 1**). En particular nos interesaba ponderar el grado de asociación de nuestros candidatos con genes de la vía de *parkin* y demás genes asociados a PD, ya que los mutantes en *parkin* serían empleados como control de ND en nuestros experimentos. De los 47 genes candidatos resultantes de la aplicación del Filtro 7, se seleccionaron finalmente 10 genes que por diversos análisis de interacción mostraban una asociación estrecha entre sí y una relación directa o indirecta (como máximo con un gen/proteína de separación) con genes o proteínas de la vía de *parkin* y demás genes asociados a PD (**Tabla 11, Figura 44, Tabla Suplementaria 14**). La **Tabla 11** resume los principales procesos biológicos donde intervienen estos 10 genes que fundamentalmente corresponden a la biosíntesis y oxidación de lípidos, a la producción de energía y cofactores como el ATP y el AMPc, a la transcripción y traducción de genes y a la vía del acetil-CoA.

Tabla 11. Identidad de los 10 genes candidatos seleccionados para su validación.



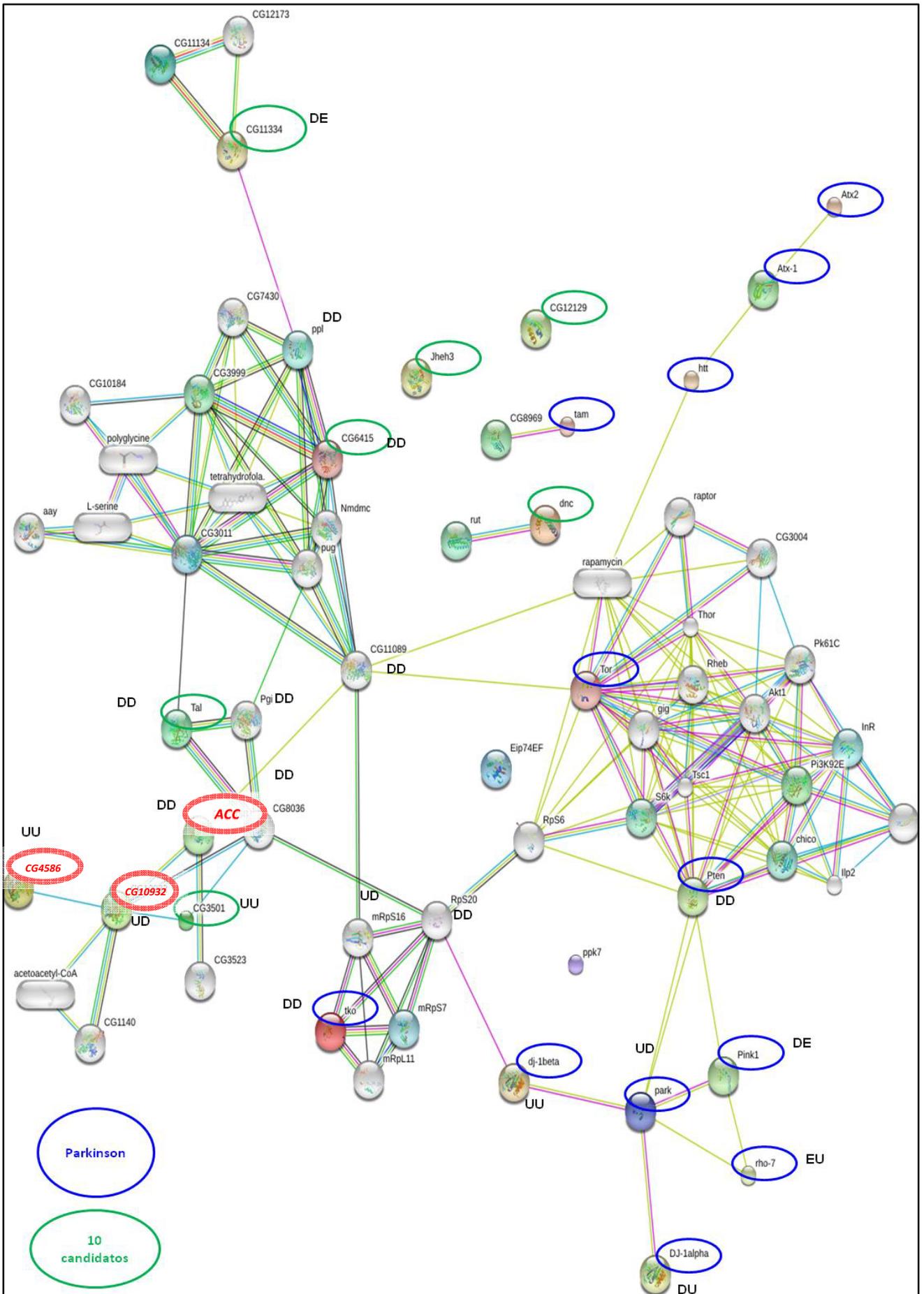


Figura 44 (página anterior). Análisis de interacción STRING y STITCH de los 10 genes de *Drosophila* seleccionados como candidatos a neuroprotectores para su validación.

Las esferas representan proteínas. Su tamaño es mayor si hay información estructural asociada a la proteína. Los 10 genes candidatos a neuroprotectores se encuentran marcados con círculos verdes. Los 3 genes de la vía del acetil-CoA se resaltan con círculos rojos. Se agregaron al análisis también los genes de la vía de *parkin* y PD (círculos en azul). Los colores de las líneas representan el tipo de evidencia para predecir su asociación: verde ("neighborhood"-conservación), celeste (bases de datos), púrpura (experimental), rojo (fusión), negro (co-expresión). Los grosores de las líneas representan el grado de confianza de la predicción de interacción. Se empleó un límite de confianza alto de 0.7, que es la probabilidad que la interacción predicha exista en el mismo mapa metabólico de la base de datos KEGG. Se agregó también una codificación resumiendo el resultado del análisis DE realizado a partir de los datos de secuenciación mRNA-Seq (Capítulo I), para las comparaciones genotípicas consideradas más relevantes para detectar potenciales genes neuroprotectores: *WT16 vs Ho16* y *WT17 vs Ho17*, siendo D (downregulated= sub-expresado) y U (upregulated= sobre-expresado) en el segundo genotipo de cada comparación respecto al primero. E (equal= igual) implica ausencia de diferencias significativas en la expresión del gen entre los genotipos comparados.

2. Validación mediante qPCR de los niveles de expresión mRNA-Seq de los genes candidatos

Con el fin de validar los valores obtenidos para cada uno de estos 10 genes en nuestro estudio mRNA-Seq, realizamos qPCRs de ARN extraído de embriones WT, Ho16 y Ho17. Analizamos en detalle los datos de expresión por mRNA-Seq y promediamos los valores obtenidos para cada uno en las diferentes secuenciaciones. Para representar gráficamente estos datos y compararlos con los resultados de las qPCRs, empleamos el método de normalización "gene counts S3/total counts". Observamos que el gen *CG10932*, si bien presenta diferencias significativas DE entre los mutantes Ho16 y Ho17 respecto a los WT de los mismos estadios, muestra perfiles de expresión normalizados muy similares entre los diferentes genotipos. Esto dificulta el análisis por qPCR, por lo que este gen no se usó para las siguientes validaciones y fue re-incorporado a la validación *in vivo*. Es más, como mostraré más adelante, junto a otros dos candidatos estrechamente relacionados funcionalmente, este gen adquirió un papel preponderante en este último capítulo de la tesis.

Los resultados de las qPCRs para los 9 genes candidatos analizados se muestran gráficamente en la **Figura 45** comparándolos con los resultados normalizados de la secuenciación mRNA-Seq. Ambos resultados se muestran normalizados por Ct y "gene

counts S3/total counts”, respectivamente, y relativizados a la muestra Ho16 que se empleó como punto de referencia (mutante de ND). Los resultados de ambos métodos mostraron buena coincidencia en cada uno de los 9 genes.

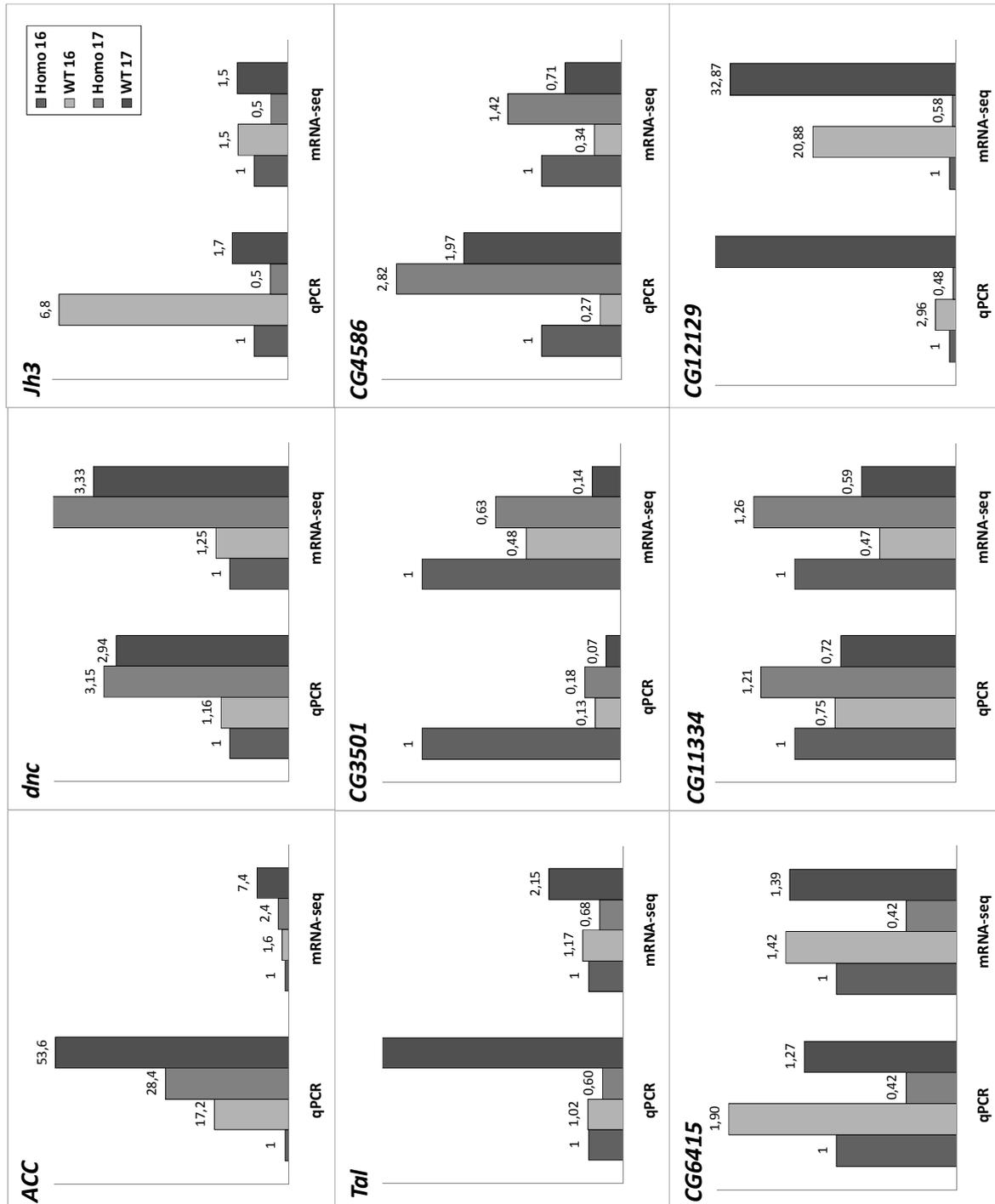


Figura 45. Resumen de la comparación entre los perfiles de expresión obtenidos mediante mRNA-Seq y los obtenidos mediante qPCRs. Los resultados de las qPCRs y de la secuenciación mRNA-Seq de embriones para los 9 genes candidatos analizados fueron normalizados por Ct y “gene counts S3/total counts”, respectivamente y

relativizados a la muestra Ho16. Las dos técnicas muestran tendencias similares relativas en cada uno de los genes analizados.

Dado que los ensayos *in vivo* se realizarían con moscas adultas, debíamos verificar si la expresión en embriones persistía en el SN de adultos. Para ello, realizamos qPCRs para cada uno de los 9 genes seleccionados a partir de ARNm aislado de cerebros WT adultos. Los resultados de estas qPCRs confirmaron la expresión de todos estos genes en el cerebro adulto y se muestran gráficamente en la **Figura 46**.

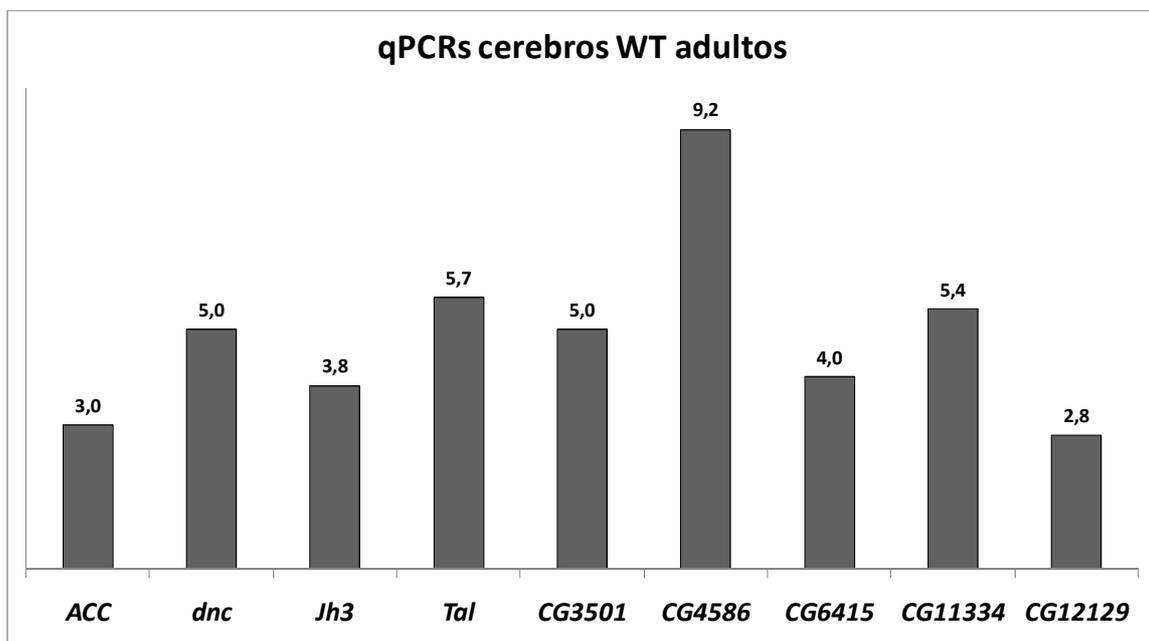


Figura 46. Expresión de los genes candidatos a neuroprotectores obtenidos mediante qPCRs a partir de cerebros WT de adultos de *Drosophila*. Los resultados de las qPCRs para los 9 genes candidatos analizados normalizados por Ct, confirman su expresión en el cerebro de mosca adulta.

3. Confirmación de la expresión de los genes candidatos en el SNC por hibridación *in situ* en cerebros de larva

Para completar el análisis de expresión en el SN de los 9 genes candidatos que fueron analizados por qPCR (**Figuras 45-46**), también se realizaron hibridaciones *in situ* en cerebros de larva WT de estadio L3. En el caso de ACC, fue imposible generar y marcar la sonda AS de hibridación, pero consideramos que las validaciones anteriores mediante qPCR confirmaron su expresión diferencial en los embriones analizados, así como su expresión en cerebros de mosca adulta, por lo que proseguimos con el análisis de este gen para su validación *in vivo*.

La **Figura 47** muestra un resumen de los resultados de las hibridaciones *in situ* en cerebros de larvas L3 WT para los 8 genes candidatos evaluados. Los resultados confirman la expresión de todos los candidatos en el SNC de *Drosophila*.

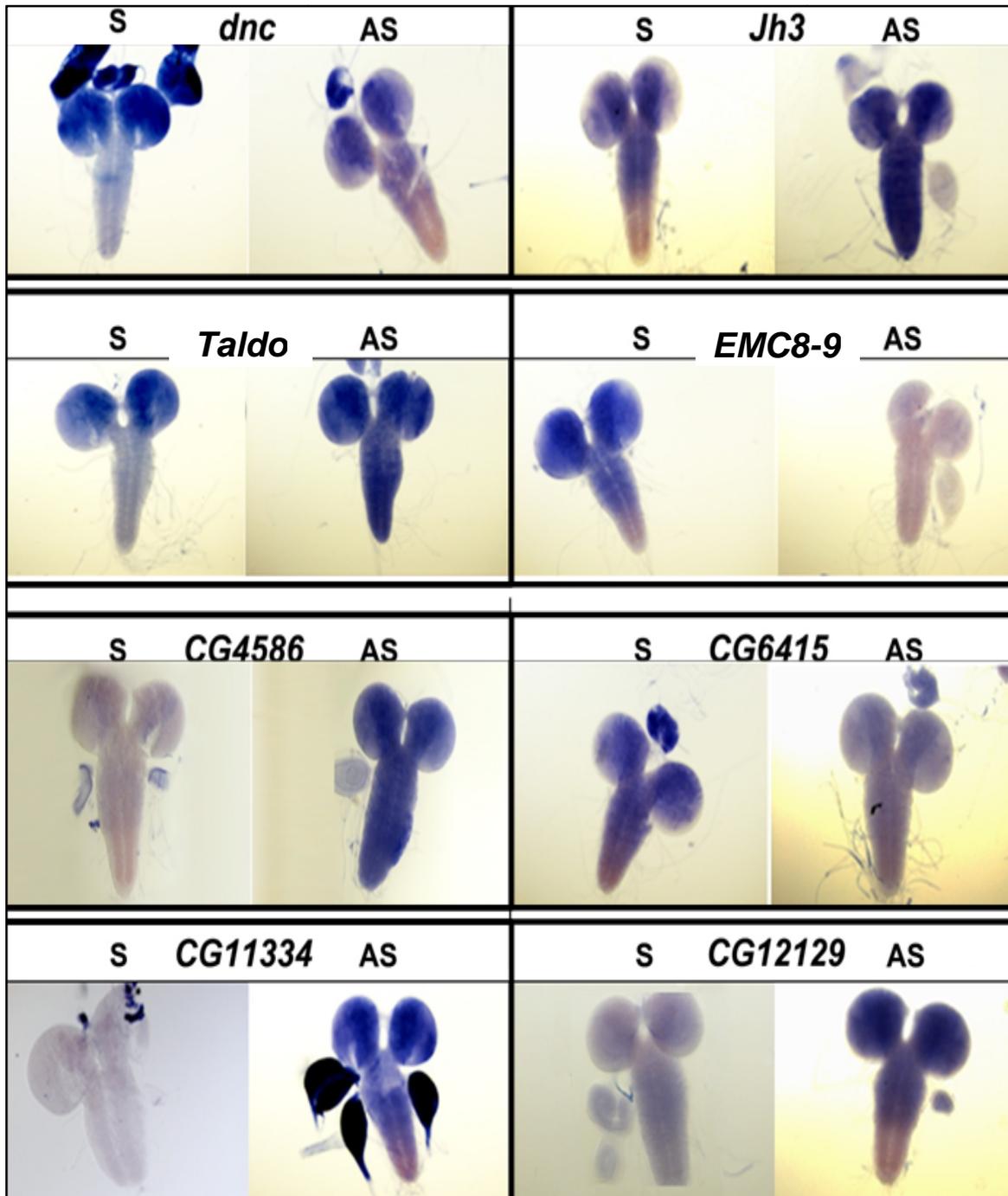


Figura 47. Resumen de resultados de las hibridaciones *in situ* en cerebros de larvas L3 WT con las ribosondas sentido (S) y antisentido (AS) para los genes candidatos. Las sondas AS permiten visualizar la expresión de los genes analizados en el SNC. Las sondas S se utilizaron como control, aunque en algunos casos también mostraron tinción, lo cual puede indicar la existencia de transcripción en la dirección antisentido en alguno de los genes (p. ej. *dnc*, *Jh3*, *Taldo*, *EMC8-9* o *CG6415*).

Los resultados de las hibridaciones *in situ* muestran distintos patrones de expresión dependiendo de cada gen analizado. Los genes *Jh3*, *Taldo*, *CG4586* y *CG6415* se expresan en todo el SNC. Los genes *dnc*, *CG11334* y *CG12129* se expresan principalmente en todo el cerebro y en una parte de la cadena ventral. No detectamos expresión del gen *EMC8-9*. Las sondas S se utilizaron como control, aunque en algunos casos también mostraron tinción, lo cual puede indicar la existencia de transcripción en la dirección antisentido en alguno de los genes (p. ej. *dnc*, *Jh3*, *Taldo*, *EMC8-9* o *CG6415*).

4. Validación *in vivo* de los tres genes candidatos a neuroprotectores vinculados a la vía de acetil-CoA: ACC, CG4586 y CG10932

En el transcurso de nuestro análisis descubrimos que 3 de los 10 genes candidatos seleccionados, *ACC*, *CG10932* y *CG4586*, pertenecían a la vía del acetil-CoA y el metabolismo de los ácidos grasos (AG) (**Figura 33**). Este resultado sugirió la hipótesis de que dicha vía estaría implicada en NP.

Empleamos el sistema de transgénesis GAL4-UAS para silenciar estos tres genes candidatos en todas las neuronas, en las neuronas dopaminérgicas, en las neuronas colinérgicas o en la glía (**Figura 34** y **Tabla Suplementaria 15**). También usamos este sistema para sobre-expresar los genes *ACC* y *CG10932* en todas las neuronas, en las neuronas dopaminérgicas o en las neuronas colinérgicas, en un contexto de ND en mutantes de *parkin* (**Figura 34** y **Tabla Suplementaria 16**).

Para determinar si se producían fenotipos asociados a ND o NP, usamos los ensayos de largo de vida y de locomoción (climbing). Los ensayos de largo de vida y de climbing permiten postular la existencia de un proceso neurodegenerativo cuando se registra reducción de largo de vida y de movilidad, o un efecto neuroprotector cuando el silenciamiento del gen candidato o su sobre-expresión en mutante *parkin*, resulta en alargamiento de la vida y mejoría de la movilidad.

4.1. Ensayos de largo de vida en moscas silenciadas para ACC, CG4586 o CG10932 y en moscas *parkin* con sobre-expresión de ACC y CG10932

Las **Figuras 48-50** muestran los resultados de los ensayos de largo de vida durante el silenciamiento de los tres genes candidatos y la sobre-expresión de ACC o CG10932. Estos ensayos fueron realizados en hembras y se contabilizó el número de moscas muertas por genotipo cada dos días desde el momento de su emergencia. En este capítulo, a diferencia del Capítulo II donde se presentan estos resultados en función de la vida media (tiempo transcurrido cuando sobrevive el 50% de las moscas con las cuales se inició el experimento), se optó por representar los resultados en porcentaje de supervivencia en el día 45 del experimento (% D45), ya que en base a la experiencia anterior, el largo de vida viene ya definido a esta edad.

4.1.1. El silenciamiento de ACC acorta el largo de vida mientras que su sobre-expresión conferiría neuroprotección

El silenciamiento pan-neuronal del gen ACC es letal embrionario, indicando la importancia de este gen durante el desarrollo del SN (**Figura 48A, Tabla Suplementaria 17**). Así mismo, el silenciamiento dopaminérgico de ACC reduce significativamente la supervivencia respecto al parental RNAi-ACC (39% vs 60%) (**Figura 48B, Tabla Suplementaria 17**). Sin embargo, su silenciamiento en las neuronas colinérgicas y en la glía no afectan la supervivencia (51% vs 60% y 72% vs 60%, respectivamente), aunque se observa una tendencia a la reducción y al aumento de la supervivencia, respectivamente (**Figura 48C-D, Tabla Suplementaria 17**).

La sobre-expresión pan-neuronal del gen ACC no afecta la supervivencia, aunque muestra una tendencia a aumentarla (45% vs 39%) (**Figura 48E, Tabla Suplementaria 17**). Coincidentemente, tanto la sobre-expresión dopaminérgica como la colinérgica de ACC aumentan significativamente la supervivencia respecto al parental UAS-ACC (70% vs 39% y 83% vs 39%, respectivamente) (**Figura 4FE-G, Tabla Suplementaria 17**). Este aumento en la supervivencia también se observa en los mutantes *parkin* a los que se les sobre-expresó el gen en estos mismos tipos neuronales (83% vs 61%, 80% vs 61% y 78% vs 61%; respectivamente, **Figura 48H, Tabla Suplementaria 17**).

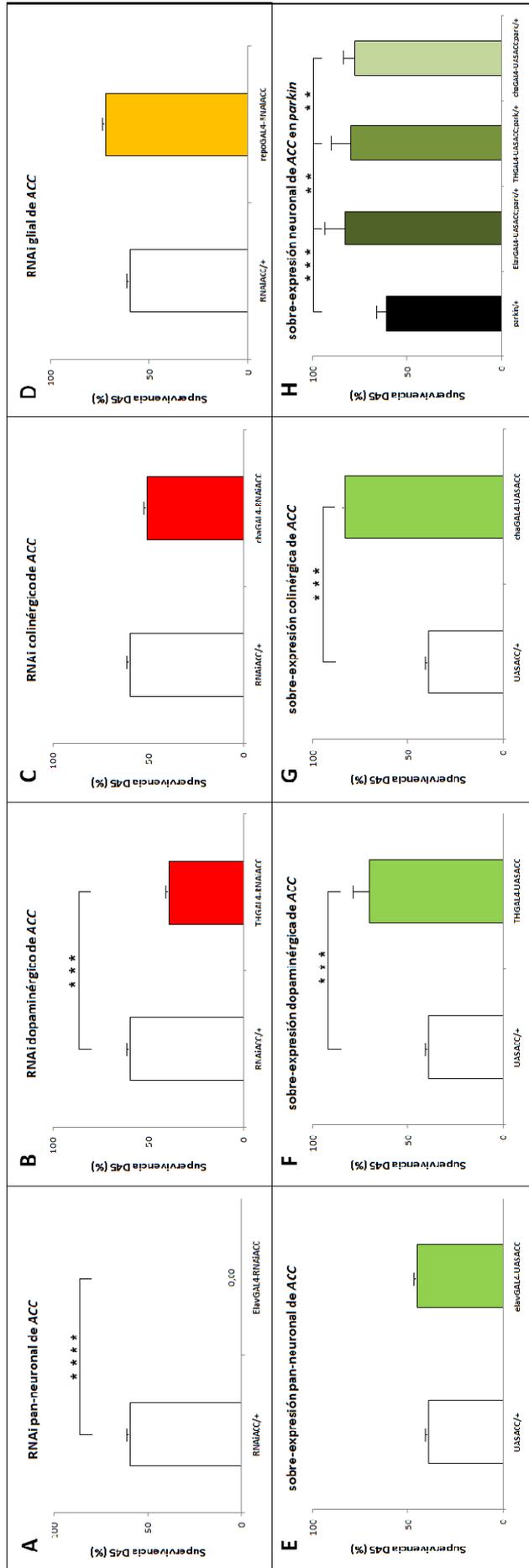


Figura 48 (página anterior). Resumen de resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento y sobre-expresión del gen ACC. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de largo de vida expresados en porcentaje de supervivencia al día 45 de experimento de cada genotipo. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia D45 mientras que en el eje X se muestran los diferentes genotipos: *RNAiACC*= parental *RNAiACC* (**A-D**); *elavGAL4-RNAiACC*= silenciamiento pan-neuronal de *ACC* (**A**); *THGAL4-RNAiACC*= silenciamiento dopaminérgico de *ACC* (**B**); *chaGAL4-RNAiACC*= silenciamiento colinérgico de *ACC* (**C**); *repoGAL4-RNAiACC*= silenciamiento glial de *ACC* (**D**); *UASACC*= parental *UASACC* (**E-G**); *elavGAL4-UASACC*= sobre-expresión pan-neuronal de *ACC* (**E**); *THGAL4-UASACC*= sobre-expresión dopaminérgica de *ACC* (**F**); *chaGAL4-UASACC*= sobre-expresión colinérgica de *ACC* (**G**); **H**) *parkin/+*=mutantes *parkin*; *elavGAL4-UASACC,parkin*= sobre-expresión pan-neuronal de *ACC* en mutantes *parkin*; *THGAL4-UASACC,parkin*= sobre-expresión dopaminérgica de *ACC* en mutantes *parkin*; *chaGAL4-UASACC,parkin*= sobre-expresión colinérgica de *ACC* en mutantes *parkin*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Las barras indican el s.e.m.

4.1.2. El silenciamiento y la sobre-expresión de *CG10932* en neuronas dopaminérgicas acortan el largo de vida mientras que la regulación de su expresión en neuronas colinérgicas conferiría neuroprotección

Coincidentemente con lo que observamos para *ACC*, tanto el silenciamiento pan-neuronal como el dopaminérgico del gen *CG10932* reducen significativamente la supervivencia respecto al parental *RNAi-CG10932* (64% vs 78% y 49% vs 78%, respectivamente) (**Figura 49 A-B, Tabla Suplementaria 17**). Su silenciamiento en las neuronas colinérgicas y en la glía no afectan la supervivencia (83% vs 78% y 73% vs 78%, respectivamente), aunque se observa una tendencia al aumento y la reducción de la supervivencia, respectivamente (**Figura 49C-D, Tabla Suplementaria 17**). Esta tendencia es opuesta a la observada para el silenciamiento colinérgico y glial de *ACC*.

La sobre-expresión pan-neuronal de *CG10932* tampoco afecta la supervivencia respecto al parental *UAS-CG10932* (66% vs 69%) (**Figura 49E, Tabla Suplementaria 17**). Sin embargo, su sobre-expresión dopaminérgica reduce significativamente la supervivencia (28% vs 69%) mientras que su sobre-expresión colinérgica la aumenta (88% vs 82%) (**Figura 49F-G, Tabla Suplementaria 17**). Esto podría explicar la falta de efecto de su sobre-expresión pan-neuronal. Al contrario de lo observado con la sobre-expresión de *ACC*, no observamos efectos de la sobre-expresión de *CG10932* en fondo mutante para *parkin* (**Figura 49H, Tabla Suplementaria 17**).

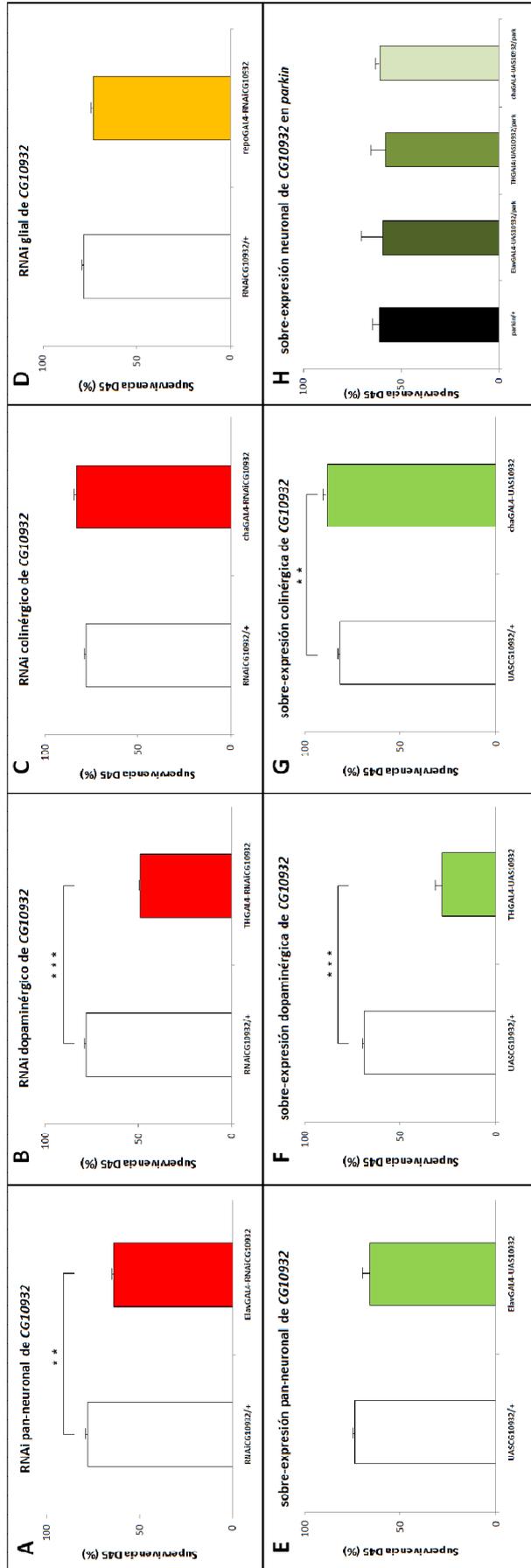
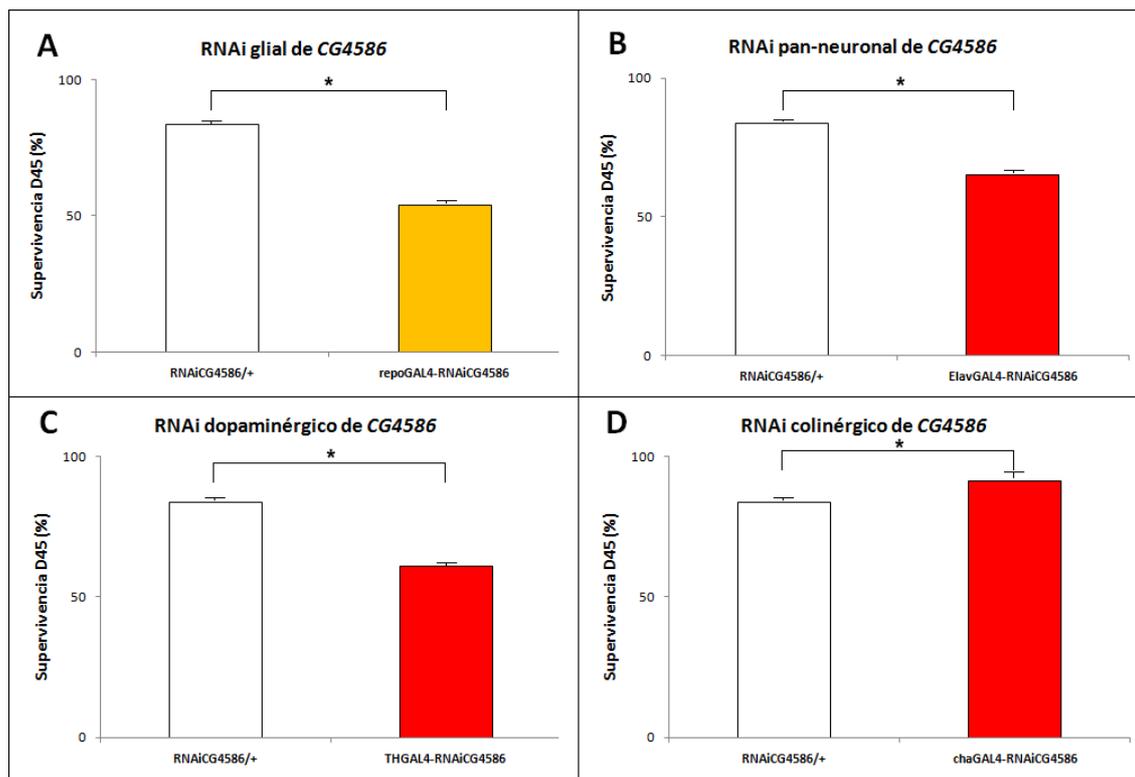


Figura 49 (página anterior). Resumen de resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento y sobre-expresión del gen *CG10932*. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de largo de vida expresados en porcentaje de supervivencia al día 45 de experimento de cada genotipo. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia D45 mientras que en el eje X se muestran los diferentes genotipos: *RNAiCG10932*= parental *RNAiCG10932* (**A-D**); *elavGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento pan-neuronal de *CG10932* (**A**); *THGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento dopaminérgico de *CG10932* (**B**); *chaGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento colinérgico de *CG10932* (**C**); *repoGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento glial de *CG10932* (**D**); *UASCG10932*= parental *UASCG10932* (**E-G**); *elavGAL4-UASCG10932*= sobre-expresión pan-neuronal de *CG10932* (**E**); *THGAL4-UASCG10932*= sobre-expresión dopaminérgica de *CG10932* (**F**); *chaGAL4-UASCG10932*= sobre-expresión colinérgica de *CG10932* (**G**); **H** *parkin/+*=mutantes *parkin*; *elavGAL4-UASCG10932,parkin*= sobre-expresión pan-neuronal de *CG10932* en mutantes *parkin*; *THGAL4-UASCG10932,parkin*= sobre-expresión dopaminérgica de *CG10932* en mutantes *parkin*; *chaGAL4-UASCG10932,parkin*= sobre-expresión colinérgica de *CG10932* en mutantes *parkin*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Las barras indican el s.e.m.

4.1.3. El silenciamiento glial y dopaminérgico de *CG4586* acorta el largo de vida mientras que su silenciamiento colinérgico conferiría neuroprotección

El silenciamiento glial, pan-neuronal o dopaminérgico del gen *CG4586* reducen significativamente la supervivencia respecto al control parental *RNAiCG4586* (54% vs 84%, 65% vs 84% y 61% vs 84%, respectivamente) (**Figura 50A-C, Tabla Suplementaria 17**). En cambio, su silenciamiento colinérgico aumenta significativamente la supervivencia (91% vs 84%) (**Figura 50D, Tabla Suplementaria 17**). Esto coincide con las diferencias y tendencias observadas para el silenciamiento del gen *CG10932*.

Figura 50 (página siguiente). Resumen de los resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento del gen *CG4586*. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de largo de vida expresados en porcentaje de supervivencia al día 45 de experimento de cada genotipo. El eje Y muestra los % supervivencia D45 y el X los diferentes genotipos: *RNAiCG4586*= parental *RNAiCG4586* (**A-D**); *repoGAL4-RNAiCG4586*= silenciamiento glial de *CG4586* (**A**); *elavGAL4-RNAiCG4586*= silenciamiento pan-neuronal de *CG4586* (**B**); *THGAL4-RNAiCG4586*; *THGAL4-RNAiCG4586*= silenciamiento dopaminérgico de *CG4586* (**C**); *chaGAL4-RNAiCG4586*; *chaGAL4-RNAiCG4586*= silenciamiento colinérgico de *CG4586* (**D**). * $p < 0,05$. Las barras indican el s.e.m.



4.2. Ensayos de climbing para el silenciamiento génico y sobre-expresión de ACC y CG10932

Para determinar el grado de ND, se analizó la movilidad de los cruces construidos en machos a tres edades: día 5, día 15 y día 25. En todos los casos se realizaron 10 réplicas del ensayo por cada uno de los cinco tubos por genotipo analizados.

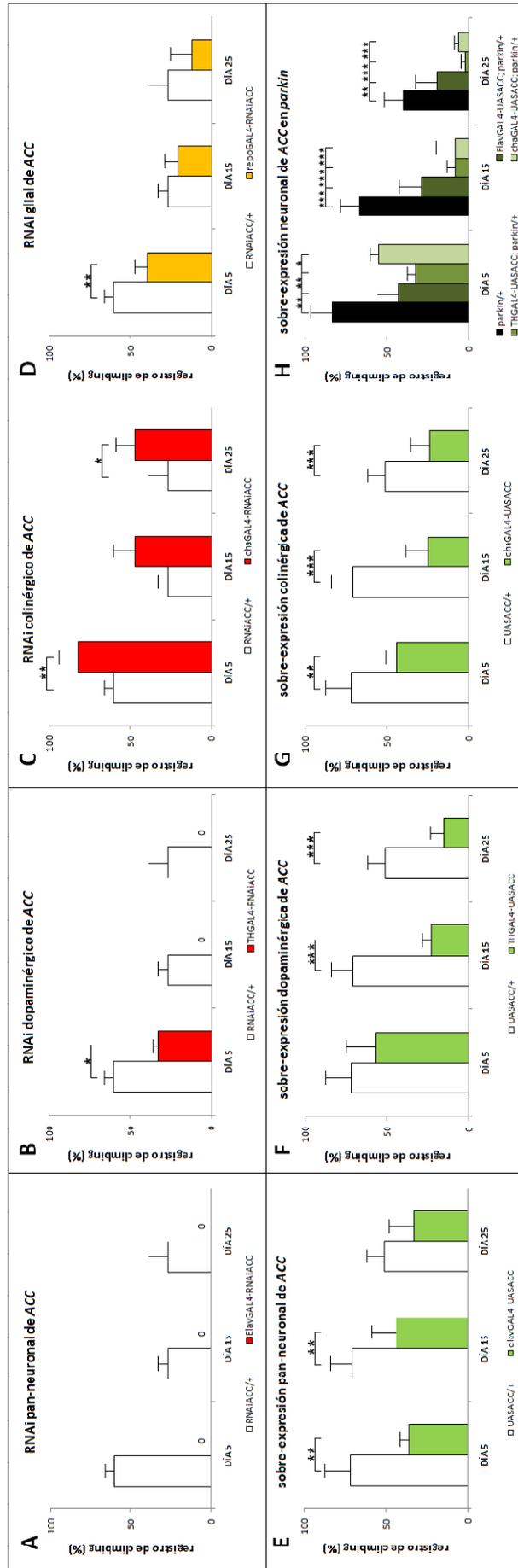
4.2.1. El silenciamiento dopaminérgico y glial de ACC y su sobre-expresión neuronal causan un deterioro de la movilidad y empeoran la movilidad de individuos con neurodegeneración

Ya a edad temprana (5 días) se observa un deterioro significativo de la movilidad de los machos a los que se les silenció el gen ACC en neuronas dopaminérgicas o en la glía (33% vs 60% y 40% vs 60%, respectivamente) (Figura 51B y D, Tabla Suplementaria 18). Este deterioro muestra una tendencia a aumentar progresivamente con la edad (comparar 5 días vs 15 días vs 25 días en la Figura 51B y D, Tabla Suplementaria 18). El mayor efecto de reducción en la movilidad lo causa el

silenciamiento de ACC en las las neuronas dopaminérgicas. De hecho, los machos con silenciamiento dopaminérgico de ACC no sobreviven más allá del día 10. El silenciamiento colinérgico de ACC, en cambio, aumenta significativamente la movilidad (**Figura 51C, Tabla Suplementaria 18**). Este efecto de mejoría en la movilidad del silenciamiento colinérgico de ACC se contrapone a su tendencia a reducir la supervivencia, observada en los ensayos de largo de vida. Ocurre algo similar respecto al silenciamiento glial de ACC.

La sobre-expresión de ACC en neuronas dopaminérgicas y colinérgicas disminuye significativamente la movilidad ya a 5 días de edad (57% vs 72% y 44% vs 72%, respectivamente) (**Figura 51E-G, Tabla Suplementaria 18**). Este deterioro aumenta progresivamente con la edad. Respecto a la movilidad de los individuos con sobre-expresión del gen ACC en un contexto mutante *parkin*, se observó un deterioro significativo y progresivo en todos los casos, pero de mayor grado cuando la sobre-expresión fue realizada en las neuronas dopaminérgicas (**Figura 51H**). Esto último también se contrapone a lo observado en los ensayos de largo de vida para mutantes *parkin* con sobre-expresión de ACC.

Figura 51 (página siguiente). Resumen de resultados de los ensayos de climbing para el silenciamiento y sobre-expresión del gen ACC. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de climbing realizados a 5, 15 y 25 días de edad, expresados en porcentaje de moscas de cada genotipo promediando los 5 tubos y las 10 réplicas de cada genotipo. El eje Y muestra el porcentaje de registro de climbing y el eje X muestra los diferentes genotipos estudiados: *RNAiACC*= parental *RNAiACC* (**A-D**); *elavGAL4-RNAiACC*= silenciamiento pan-neuronal de ACC (**A**); *THGAL4-RNAiACC*= silenciamiento dopaminérgico de ACC (**B**); *chaGAL4-RNAiACC*= silenciamiento colinérgico de ACC (**C**); *repoGAL4-RNAiACC*= silenciamiento glial de ACC (**D**); *UASACC*= parental *UASACC* (**E-G**); *elavGAL4-UASACC*= sobre-expresión pan-neuronal de ACC (**E**); *THGAL4-UASACC*= sobre-expresión dopaminérgica de ACC (**F**); *chaGAL4-UASACC*= sobre-expresión colinérgica de ACC (**G**); **H**) *parkin/+*=mutantes *parkin*; *elavGAL4-UASACC,parkin*= sobre-expresión pan-neuronal de ACC en mutantes *parkin*; *THGAL4-UASACC,parkin*= sobre-expresión dopaminérgica de ACC en mutantes *parkin*; *chaGAL4-UASACC,parkin*= sobre-expresión colinérgica de ACC en mutantes *parkin*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Las barras indican el s.e.m.

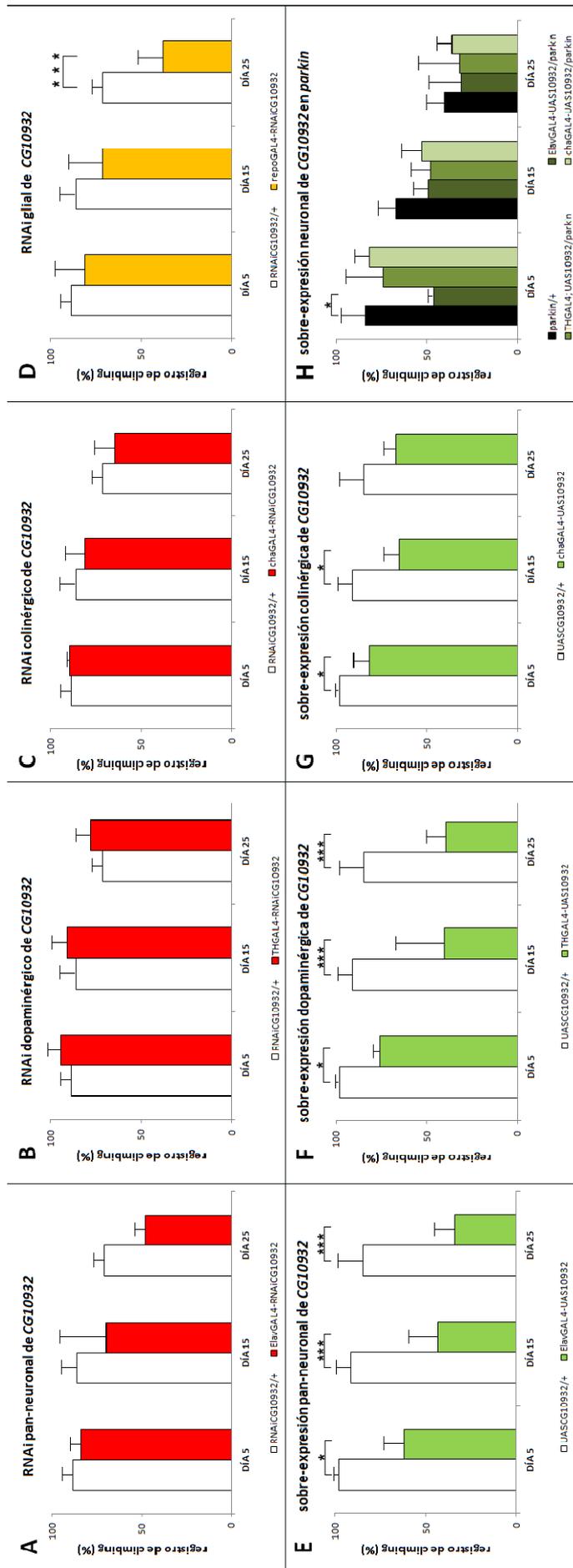


4.2.2. El silenciamiento glial de *CG10932* y su sobre-expresión neuronal causan un deterioro de la movilidad

El silenciamiento neuronal del gen *CG10932* no afectó significativamente la movilidad de los machos (**Figura 52A-C, Tabla Suplementaria 18**). Su silenciamiento glial tampoco afectó la movilidad a edad temprana, sin embargo, sí redujo significativamente la movilidad a la edad más avanzada de 25 días (**Figura 52D, Tabla Suplementaria 18**).

Al igual que vimos para *ACC*, la sobre-expresión del gen *CG10932* en cualquiera de los tipos celulares ensayados también disminuye significativamente la movilidad de los individuos en todas las edades analizadas (**Figura 52E-G, Tabla Suplementaria 18**). Finalmente, no se observó un efecto en la movilidad de la sobre-expresión del gen *CG10932* en un contexto mutante *parkin* (**Figura 52H, Tabla Suplementaria 18**). Esto coincide con la falta de efecto de su sobre-expresión en la supervivencia de mutantes *parkin*.

Figura 52 (página siguiente). Resumen de resultados de los ensayos de climbing para el silenciamiento y sobre-expresión del gen *CG10932*. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de climbing realizados a 5, 15 y 25 días de edad, expresados en porcentaje de moscas de cada genotipo promediando los 5 tubos y las 10 réplicas de cada genotipo. El eje Y muestra el porcentaje de registro de climbing y el eje X muestra los diferentes genotipos estudiados: *RNAiCG10932*= parental *RNAiCG10932* (**A-D**); *elavGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento pan-neuronal de *CG10932* (**A**); *THGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento dopaminérgico de *CG10932* (**B**); *chaGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento colinérgico de *CG10932* (**C**); *repoGAL4-RNAiCG10932*= silenciamiento glial de *CG10932* (**D**); *UASCG10932*= parental *UASCG10932* (**E-G**); *elavGAL4-UASCG10932*= sobre-expresión pan-neuronal de *CG10932* (**E**); *THGAL4-UASCG10932*= sobre-expresión dopaminérgica de *CG10932* (**F**); *chaGAL4-UASCG10932*= sobre-expresión colinérgica de *CG10932* (**G**); **H**) *parkin/+*=mutantes *parkin*; *elavGAL4-UASCG10932,parkin*= sobre-expresión pan-neuronal de *CG10932* en mutantes *parkin*; *THGAL4-UASCG10932,parkin*= sobre-expresión dopaminérgica de *CG10932* en mutantes *parkin*; *chaGAL4-UASCG10932,parkin*= sobre-expresión colinérgica de *CG10932* en mutantes *parkin*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Las barras indican el s.e.m.



5. Actualización del enriquecimiento en genes de neurodegeneración y neuroprotección en nuestra lista inicial de genes candidatos

En el momento de la publicación de los resultados que presentamos en el Capítulo I (Ferreiro *et al.*, 2012), nuestro análisis mostraba que la lista de genes candidatos a ejercer una función neuroprotectora contenía un porcentaje muy superior (5%) de genes previamente asociados de manera empírica a ND/NP al registrado para todo el genoma (2%). Esto nos permitió concluir que nuestra lista estaba enriquecida en este tipo de genes. Desde ese momento, debido a la cantidad y calidad de las investigaciones científicas sobre ND basadas en el modelo *Drosophila*, el número de genes asociados a ND ha crecido considerablemente. Por esa razón, decidimos re-analizar el enriquecimiento funcional de nuestra lista inicial (los 633 genes con los cuales se inició el proceso de filtrado descrito en este Capítulo).

La nueva búsqueda arrojó que el número de genes presentes en nuestra lista y asociados experimentalmente a ND/NP en *Drosophila* y/o humanos ya es mucho mayor (32% en 2018, comparado al 5% en 2012) (**Tabla Suplementaria 19**). Obviamente, el descubrimiento de nuevos genes asociados a ND/NP también resultó en un aumento del porcentaje de genes de este tipo en el total del genoma, que ahora representa un 5% (frente al 2% reconocido en 2012). Estos resultados nos permiten concluir que desde que comenzamos el trabajo que ha sido el tema principal de este Capítulo, hasta la fecha, el enriquecimiento de nuestra lista en genes con estas funciones se ha incrementado.

Ya que formalmente la ontología de genes no incluye un grupo funcional definido como ND/NP, utilizamos el método empleado en el Capítulo I, haciendo un análisis de enriquecimiento funcional no sesgado mediante diversas bases de datos para analizar qué procesos biológicos (BP) o grupos funcionales (FG) y qué funciones moleculares (MF) se encontraban enriquecidas en nuestra lista de candidatos. Para ello empleamos diversas bases de datos: *GORilla* (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>), *g:Profiler/g:GOS*t (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>), *DAVID* (<https://david.ncifcrf.gov/>) y *PANTHER* (<http://www.pantherdb.org/>). A continuación resumiré los resultados principales de estos análisis de enriquecimiento funcional (**Figuras 53-54, Tabla Suplementaria 20 y Figura Suplementaria 2**).

La **Figura 53** muestra el resultado del análisis de enriquecimiento funcional realizado por *GOrilla* para MF. Este análisis muestra un enriquecimiento de nuestra lista de candidatos en MF asociadas a la actividad oxidoreductasa, peroxidasa y peptidasa, a la síntesis de AG y a la unión a proteínas no plegadas, entre otras. La **Figura Suplementaria 2** muestra el resultado del análisis de enriquecimiento funcional realizado por *GOrilla* para BP, donde se destaca el enriquecimiento funcional en BP de plegamiento de proteínas mediadas por chaperonas, homeostasis celular y reparación del ADN. La **Tabla Suplementaria 20** muestra los valores p para éstas y otras MF y BP enriquecidas en nuestra lista. Estos procesos se asocian a ND.

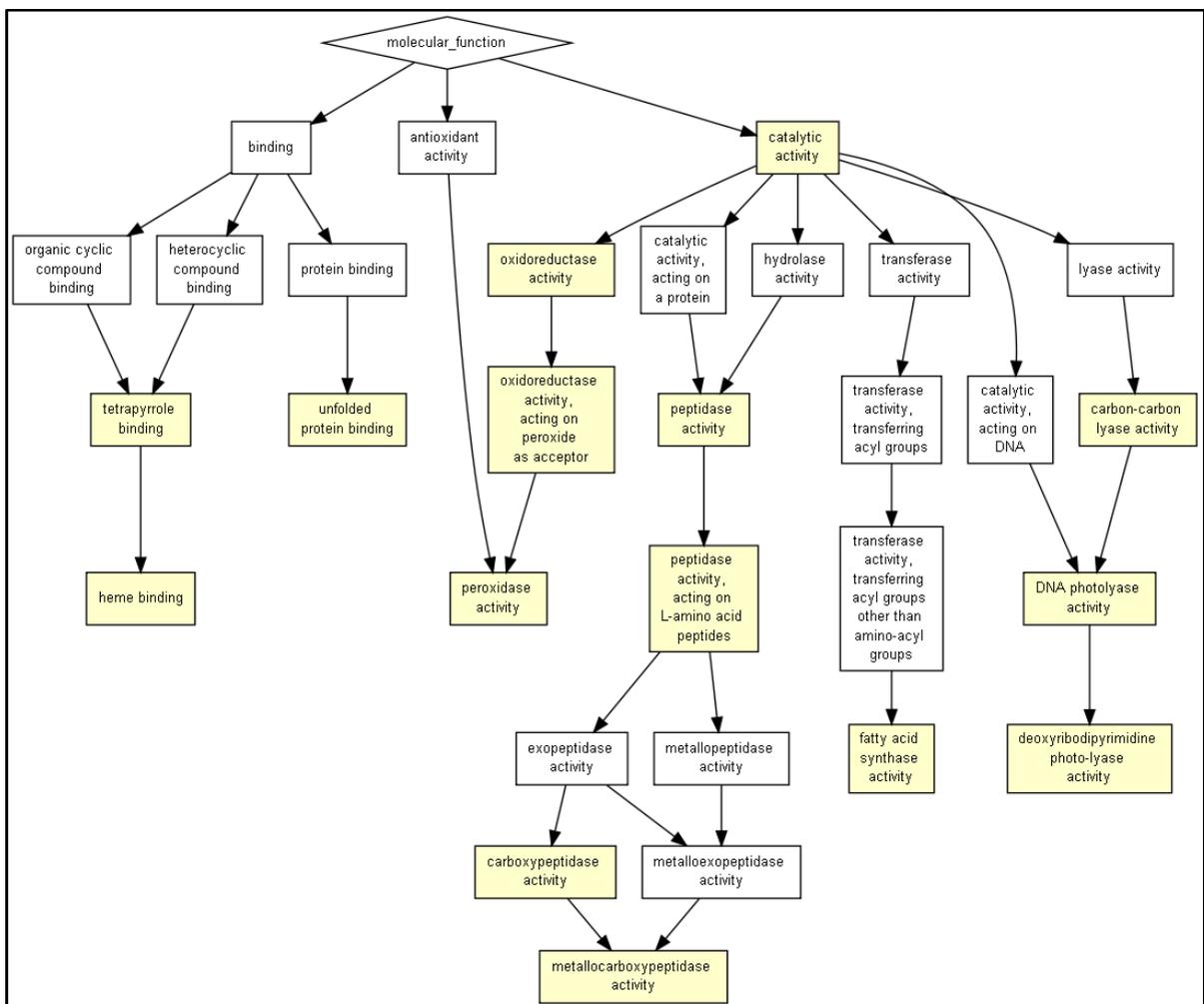


Figura 53. Resultados de funciones moleculares sobre-representadas en nuestra lista de candidatos original, obtenidos por el análisis de enriquecimiento por GOrilla. La imagen muestra resaltado en amarillo los grupos enriquecidos significativamente en nuestra lista de candidatos. Muchos de estos grupos se asocian a procesos de ND.

El análisis de enriquecimiento funcional empleando *PANTHER* (**Tabla Suplementaria 20**) muestra también un enriquecimiento de nuestra lista de candidatos en procesos asociados a ND/NP como por ejemplo, diferenciación de neuronas dopaminérgicas, diferenciación de la glía, transmisión colinérgica, regulación negativa del metabolismo de ROS, regulación positiva del intercambio de histonas y procesos de modificación de histonas como la acetilación y desacetilación, respuesta a inanición (starvation), organización de fotoreceptores, metabolismo de la dopamina, ensamblaje de sinapsis, síntesis de neurotransmisores, autofagia, resistencia a anestesia, aprendizaje, memoria, sueño y regulación de la locomoción y ritmos circadianos.

El análisis realizado por *g:Profiler/g:GOST* (**Tabla Suplementaria 20**) confirma que nuestra lista de 633 genes candidatos está enriquecida en procesos asociados a enfermedades humanas relacionadas con el SN y PD, por ejemplo, temblor postural y generalizado, deterioro mental, demencia, metabolismo anormal de mitocondrias, neuropatía periférica, atrofia del músculo esquelético, entre otros. También reveló un enriquecimiento en las vías KEGG de regulación de la longevidad y de procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico.

DISCUSIÓN CAPÍTULO III

En las últimas tres décadas se han logrado muchos avances en la comprensión de los mecanismos moleculares básicos conservados que intervienen en el origen y desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, en parte gracias al empleo de modelos experimentales como *Drosophila*.

En este último capítulo de mi tesis, investigamos la hipótesis de que dado el enriquecimiento en genes empíricamente asociados a ND y/o NP que habíamos detectado en la lista de genes regulados diferencialmente en los mutantes *sall* de *Drosophila* respecto a los WT (Capítulo I), la lista probablemente estaría enriquecida también en genes con función neuroprotectora aún no conocida, a los cuales definimos como "genes candidatos a neuroprotectores".

Cuando iniciamos el análisis encontramos un 5 % de genes de nuestra lista asociados previamente de manera empírica a ND/NP y un enriquecimiento de genes asociados a estos procesos respecto a su representación en el genoma completo de *Drosophila*. Como el número de genes asociados experimentalmente a ND/NP continuó aumentando, decidimos re-analizar el enriquecimiento de nuestra lista y descubrimos que ahora contiene muchos más genes asociados empíricamente a ND y NP que los observados hace 5 años (32% en nuestra lista vs 5% en el genoma total de *Drosophila*), tal como predecía nuestra hipótesis.

Mediante diversos criterios, seleccionamos de nuestra lista de genes enriquecida en genes de ND/NP, tres genes candidatos a neuroprotectores para validar *in vivo*, pertenecientes a la vía del acetil-CoA y los AG (**Figura 33**). Dado que las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un acortamiento significativo del largo de vida de los individuos que las padecen y usualmente por una locomoción deficiente, empleamos los ensayos clásicos de largo de vida y climbing para dicha validación. Realizamos estos ensayos en moscas transgénicas con silenciamiento o sobre-expresión de los genes candidatos en neuronas y en la glía. Los resultados de nuestros ensayos sugieren un posible rol neuroprotector de estos genes que discutiré a continuación.

Respecto al gen *ACC*, observamos que su silenciamiento neuronal acorta significativamente el largo de vida mientras que su sobre-expresión la aumenta, incluso en un fondo mutante para *parkin* (**Figura 48 y Tabla 12**). Esto indicaría que la expresión de *ACC* en las neuronas ejercería un rol neuroprotector aumentando la supervivencia. Los resultados también sugieren un mecanismo opuesto y complementario de la expresión de este gen en la glía, ya que su silenciamiento glial, a diferencia del silenciamiento neuronal, muestra una tendencia a aumentar la supervivencia. Las células de la glía juegan un rol activo en el flujo de los sustratos energéticos hacia las neuronas, por lo que la regulación de la expresión de genes del metabolismo del acetyl-CoA como el *ACC* en la glía también influiría en ejercer un efecto neuroprotector en las neuronas. Sugerimos como perspectiva realizar ensayos de largo de vida y climbing con mutantes de sobre-expresión glial de *ACC* para complementar estos resultados y sacar mejores conclusiones. Quizás sería interesante también observar el efecto de silenciamiento glial en mutantes *parkin*, esperando encontrar un aumento en la supervivencia de estos mutantes respecto a los *parkin*, de confirmarse la tendencia observada. En cuanto a la influencia de la expresión del gen *ACC* en la movilidad, observamos que esta última se ve comprometida tanto por la reducción de la expresión de *ACC* como por su sobre-expresión (**Figura 51 y Tabla 12**). Encontramos un deterioro progresivo de la movilidad de los machos a los que se les silenció el gen *ACC* en neuronas dopaminérgicas o en la glía, siendo este efecto mayor en el silenciamiento dopaminérgico. Este resultado coincide con lo ya reportado en *Drosophila* de una influencia determinante de los niveles de DA en el movimiento de tipo climbing, viéndose éste deteriorado en mutantes con niveles deficientes de DA (ej. Riemensperger *et al.*, 2013). También coincide con lo reportado para enfermedades neurodegenerativas como el PD. Nuestros resultados indicarían entonces que la expresión de *ACC* en las neuronas dopaminérgicas es necesaria para mantener los niveles de DA y asegurar un movimiento normal. Dado que la sobre-expresión de *ACC* en neuronas dopaminérgicas también disminuye significativamente la movilidad y que su sobre-expresión en un contexto mutante *parkin*, deficientes en DA, acentúa el deterioro en la movilidad, nuestros resultados indicarían que no basta con expresar *ACC* en las neuronas dopaminérgicas para regular el movimiento de tipo climbing, sino que se requiere de un balance finamente modulado de la expresión de este gen para

mantener los niveles de DA. Nuestros resultados también indicarían una influencia en el movimiento de climbing de la regulación de la expresión de ACC en la glía. El silenciamiento de este gen en la glía reduce la movilidad. Quizás sería interesante observar el efecto de la sobre-expresión glial en mutantes *parkin*, esperando encontrar un aumento en la movilidad de estos mutantes respecto a los *parkin*. La glía cumple un rol crítico en la utilización de la glucosa acoplada a la transmisión sináptica excitatoria, ya que es la encargada de captar del espacio extracelular el glutamato liberado en este tipo de sinapsis para que la transmisión del impulso nervioso pueda finalizar. También observamos que el silenciamiento colinérgico de ACC, a diferencia del silenciamiento dopaminérgico, aumenta significativamente la movilidad (**Figura 51C, Tabla Suplementaria 18**), y que como contrapartida, la sobre-expresión de ACC en neuronas colinérgicas disminuye significativamente la movilidad, acentuando el deterioro en la movilidad de los mutantes *parkin* (**Figura 51G-H, Tabla Suplementaria 18**). Esto indicaría que mantener o reducir los niveles normales de expresión de ACC en neuronas colinérgicas es importante para regular la movilidad de tipo climbing o mejorarla. Quizás sería interesante observar el efecto de silenciamiento colinérgico en mutantes *parkin*, esperando encontrar una mejora en la movilidad de estos mutantes respecto a los *parkin*. Dado que la acetilcolina secretada por las neuronas colinérgicas ejerce principalmente un efecto excitador, nuestros resultados sugieren que reducir los niveles de ACC podría aumentar los niveles de acetilcolina. El efecto de mejoría en la movilidad del silenciamiento colinérgico de ACC y de deterioro de la movilidad de los mutantes *parkin* por sobre-expresión de este gen se contraponen a su tendencia a reducir la supervivencia o aumentarla, respectivamente, observada en los ensayos de largo de vida. Esto indicaría que la expresión de ACC en neuronas colinérgicas es importante para aumentar la supervivencia y que la reducción de su expresión para aumentar la movilidad. Por tanto, este gen ejercería su acción neuroprotectora por vías de regulación que influyen de manera diferente en la supervivencia y movilidad, y por un mecanismo diferente al de las neuronas dopaminérgicas. Esto es consistente con la bibliografía. Se sabe que la PD no solo afecta a las neuronas que secretan DA, sino también a las neuronas colinérgicas, encontrándose que los síntomas motores de la enfermedad están relacionados con los sistemas dopaminérgicos y las manifestaciones no motoras usualmente con las vías no dopaminérgicas (revisado en

Cerdá *et al.*, 2015). En resumen, todos estos resultados son congruentes con la hipótesis de que el gen *ACC* cumple una función neuroprotectora. Esto podría ser investigado en más profundidad mediante otros métodos fundamentales para estudios de ND y NP, como por ejemplo la evaluación de la histología cerebral. Estos resultados son congruentes también con el hecho de que este gen se encuentra significativamente sub-expresado (D) en el mutante Ho16 que presenta ND histológica respecto al WT16 (ver **Figura 43**).

Respecto al gen *CG10932*, observamos, coincidentemente con lo que observamos para *ACC*, que tanto el silenciamiento pan-neuronal como el dopaminérgico reducen significativamente la supervivencia y que su silenciamiento en las neuronas colinérgicas y en la glía no afectan la supervivencia (**Figura 49 A-D, Tabla 12**). A diferencia de *ACC*, el efecto mayor en la reducción de la supervivencia se da por el silenciamiento dopaminérgico de *CG10932*. Quizás la expresión normal de este gen tenga mayor influencia en este tipo neuronal, respecto a otros. Si bien el silenciamiento colinérgico de *CG10932* no afecta significativamente la supervivencia, muestra una tendencia al aumento de la supervivencia (**Figura 49C, Tabla 12**). Esta tendencia es opuesta a la observada para el silenciamiento colinérgico de *ACC*. La sobre-expresión pan-neuronal de *CG10932* no afecta la supervivencia (**Figura 49E, Tabla 12**). Sin embargo, su sobre-expresión dopaminérgica reduce significativamente la supervivencia mientras que su sobre-expresión colinérgica la aumenta (**Figura 49F-G, Tabla 12**). Esto podría explicar la falta de efecto de su sobre-expresión pan-neuronal, a causa de que la sobre-expresión de este gen en los dos subtipos neuronales produce efectos opuestos en la supervivencia. Al contrario de lo observado con la sobre-expresión de *ACC*, no observamos efectos de la sobre-expresión de *CG10932* en fondo mutante para *parkin* (**Figura 49H, Tabla 12**). En resumen, nuestros resultados indican que la regulación de la expresión colinérgica de *CG10932* podría tener un efecto neuroprotector de aumento de la supervivencia en condiciones normales, pero no de mejoría cuando ya existe ND. En cuanto a la influencia del gen *CG10932* en la movilidad, se observó que únicamente el silenciamiento glial parece tener un leve efecto de deterioro de la movilidad y solo a una edad avanzada (**Figura 52A-D, Tabla 12**). Al igual que vimos para *ACC*, la sobre-expresión del gen *CG10932* en

cualquiera de los tipos celulares ensayados también disminuye significativamente la movilidad de los individuos en todas las edades analizadas (**Figura 52E-G, Tabla 12**). Finalmente, no se observó un efecto en la movilidad de la sobre-expresión del gen *CG10932* en un contexto mutante *parkin* (**Figura 52H, Tabla 12**). Esto coincide con la falta de efecto de su sobre-expresión en la supervivencia de mutantes *parkin* y es contrario a lo observado en los mutantes *parkin* con sobre-expresión de *ACC* quienes ven aún más afectada su movilidad respecto a los mutantes *parkin*. Estos resultados indicarían que es importante para regular el movimiento de tipo climbing no aumentar los niveles de expresión normales de *CG10932*, principalmente en las neuronas dopaminérgicas. Si asociamos estos resultados a los de ensayo de largo de vida, sugieren un efecto neuroprotector de *CG10932* mediado por la disminución de su expresión en neuronas colinérgicas. Este resultado coincide con lo observado para el silenciamiento de este gen en ratones como mencionaré más adelante.

Finalmente, respecto al gen *CG4586*, observamos que la reducción de su expresión en las neuronas dopaminérgicas y la glía reducen significativamente la supervivencia (**Figura 50A-C, Tabla 12**). En cambio, su silenciamiento colinérgico aumenta significativamente la supervivencia (**Figura 50D, Tabla 12**). Esto coincide con las diferencias y tendencias observadas para el silenciamiento del gen *CG10932*. Esta coincidencia no es casual y podría explicarse por el hecho de que a diferencia de *ACC* que actúa en el proceso de síntesis de AG en el citosol, ambos genes actúan en el proceso de β -oxidación de lípidos en la mitocondria y se expresan en los mismos tejidos. Dado que el proceso de β -oxidación de lípidos en la mitocondria se asocia a la generación de ROS íntimamente ligadas a ND, el silenciamiento de estos dos genes podría estar ejerciendo un efecto neuroprotector asociado a la reducción de la producción de ROS mitocondrial.

Tabla 12. Resumen de resultados de largo de vida y climbing de ACC, CG10932 y CG4586

SUPERVIVENCIA (ensayos de largo de vida)			MOVILIDAD (ensayos de climbing)		
Silenciamiento	Sobre-expresión	Sobre-expresión en mutantes parkin	Silenciamiento	Sobre-expresión	Sobre-expresión en mutantes parkin
ACC	PN > DA ↓	C > DA ↑	PN > DA > ↓	DA = C = PN ↓	DA = C = PN ↓
	C (↓)	PN (↑)	C ↑		
	G (↑)	? _G	> G ↓	? _G	? _G
CG10932	DA > PN ↓	DA ↓	PN (↓), DA (↑) y C (↓) ↓	PN > DA > C ↓	PN (↓), DA (↓) y C (↓) ↓
	C (↑)	C ↑			
	G (↓)	? _G	G ↓	? _G	? _G
CG4586	> DA > PN ↓	? _G	? _G	? _G	? _G
	C ↑				
	G > ↓				

PN: pan-neuronal; DA: dopaminérgico; C: colinérgico; G: glial. Las flechas hacia arriba implican aumento y hacia abajo disminución de la supervivencia o la movilidad respecto a los controles parentales en el caso de silenciamiento o sobre-expresión, y respecto a los mutantes *parkin* en el caso de la sobre-expresión en mutantes *parkin*. = significa no existen diferencias. ? significa no hay información. Entre paréntesis las flechas finas negras muestran las tendencias en los casos que no existieron diferencias significativas, ↓ (tendencia a reducción), ↑ (tendencia a aumento).

Genes de la vía del Acetil-CoA y los lípidos como potenciales neuroprotectores

Abordar una estrategia de "gen candidato" como la que empleé en este capítulo, considerando como prioritarios a validar *in vivo* genes pertenecientes a una misma vía funcional o que intervienen en un mismo proceso biológico, es una opción que puede resultar más informativa respecto a la selección de genes aislados. Esto es debido a que las enfermedades neurodegenerativas usualmente son debidas a interacciones génicas complejas, muchas veces entre genes asociados a una misma función biológica o funciones biológicas estrechamente relacionadas (revisado en Ramanan & Saykin, 2013).

La elección de genes asociados al metabolismo del acetil- CoA resulta muy interesante en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, tal como se registra de manera cada vez más frecuente en la literatura científica. A continuación, presentaré algunas evidencias ya confirmadas de una relación entre el metabolismo del acetil-CoA y ND que encuentro interesante mencionar en esta discusión como fundamento de apoyo a nuestros criterios de selección.

El cerebro es uno de los órganos que consume más energía resultante de la vía del acetil-CoA, empleando fundamentalmente la glucosa como fuente de ATP (revisado en Cermenati *et al.*, 2015). El metabolismo oxidativo es aproximadamente 10 veces más activo en el cerebro respecto a otros tejidos, llegando a consumir cerca del 20% del oxígeno y la glucosa disponible en condiciones normales (Szutowicz *et al.*, 2014). La actividad anómala de proteínas implicadas en la síntesis de ATP desacopla la cadena de transporte electrónico con la fosforilación oxidativa y genera más ROS. La sobreproducción de ROS por las mitocondrias disfuncionales como las halladas en varios tipos de ND puede causar daño oxidativo en las células produciendo alteraciones en sus funciones bioquímicas y fisiológicas y alterar los perfiles de la expresión genética llevando a las células a la apoptosis. Muchos subtipos celulares del cerebro presentan diferencias en el metabolismo del acetil-CoA y acumulación de lípidos, lo que podría determinar su susceptibilidad o no al desarrollo de ND (e.j: Szutowicz *et al.*, 2014; Aoun & Tiranti, 2015; Liu *et al.*, 2015). Por ejemplo, Liu y colaboradores sugieren que el aumento de la síntesis de AG y/o su acumulación excesiva en el citoplasma de la glía combinados con un aumento de los niveles de ROS

debido a fallas mitocondriales, aumenta la tasa de peroxidación de AG promoviendo ND en *Drosophila* y ratones (Liu *et al.*, 2015). Las neuronas colinérgicas que emplean directamente al acetil-CoA para la generación del neurotransmisor acetilcolina y compiten por este metabolito con el metabolismo energético mitocondrial, generalmente son las más susceptibles a sufrir ND. Coincidentemente nuestros resultados muestran que la variación de los niveles de expresión de los tres genes candidatos en las neuronas colinérgicas sería de gran importancia para determinar un aumento de la supervivencia y la movilidad ejerciendo efectos neuroprotectores.

La falta o falla en algunas enzimas asociadas al metabolismo de los lípidos, directamente dependiente de los niveles de acetil-CoA, también ha sido asociada a varias enfermedades neurometabólicas como por ejemplo la enfermedad de Niemann-Pick, la de Tay Sachs o el Síndrome de Zellweger (revisado en Sivachenko *et al.*, 2016). En línea con esta idea, han surgido varias publicaciones en los últimos 10 años vinculando variaciones en los niveles de acetil-CoA, acetilación de histonas y regulación del metabolismo de los lípidos con la longevidad y enfermedades asociadas a la edad, entre ellas las ND. Está reportado que enfermedades como AD y PD presentan alteraciones en el metabolismo del acetil-CoA, la regulación epigenética de la transcripción mediante el balance entre la acetilación y la desacetilación de histonas (revisado en Lardenoije *et al.*, 2015) y la regulación de los lípidos (revisado en Sertbas *et al.*, 2014; Cermenati *et al.*, 2015; Colombelli *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha reportado una disminución de la acetilación de histonas en el lóbulo temporal de pacientes con AD y en modelos animales de AD (Graff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Previamente ya se había determinado que el nivel de ciertas HDACs en el hipocampo de ratones era significativamente mayor en aquellos con AD (Kim *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008). Estos y otros trabajos dieron pie a la publicación de varios trabajos apoyando el uso de inhibidores de HADCs para el tratamiento de ND (revisado en Lardenoije *et al.*, 2015). Esto implicaría en definitiva un aumento en la acetilación de histonas en ciertos genes, directamente dependiente de los niveles de acetil-CoA, como mecanismo neuroprotector. Por ejemplo, la inhibición de la principal HADC del tipo sirtuina cerebral SIRT2 ejerce un efecto neuroprotector en modelos de *Drosophila* para PD y HD (revisado en Morris *et al.*, 2013). Por el contrario, otras publicaciones

sugieren una acción neuroprotectora de la expresión de ciertas HDACs, lo que implicaría en definitiva una reducción en la acetilación de histonas en otros genes como mecanismo neuroprotector. Por ejemplo, Julien y colaboradores mostraron que los niveles de SIRT1 se encuentran reducidos en pacientes con AD (Julien *et al.*, 2009). Los efectos neuroprotectores de SIRT1 fueron posteriormente confirmados en diferentes modelos biológicos y para diferentes ND como AD, PD, HD o ALS, entre otras (revisado en Poulouse & Raju, 2015).

A pesar de estas evidencias sobre la relación de la acetilación con procesos de ND y NP, no existen hasta el momento muchas publicaciones que vinculen de manera directa los genes relacionados con el metabolismo del acetil-CoA con procesos de ND y NP. Un ejemplo, es el trabajo de Bosveld y colaboradores, quienes demostraron que en *Drosophila* el silenciamiento de los genes *dPANK/fbl* y *dPPAT-DPCK*, asociados a CoA, ciclo de Krebs y síntesis de AG, genera una degeneración llamada ND Asociada a Pantotenato Kinasa (PKAN) (Bosveld *et al.*, 2008). Estos mutantes tienen deficiencias progresivas en la locomoción y presentan alteraciones en el balance de AG (revisado en Colombelli *et al.*, 2015). Otro ejemplo, es el trabajo de Sivachenko y colaboradores quienes describieron que la falta de función de la enzima Acetil-CoA sintatasa en *Drosophila* altera el metabolismo de los AG *in vivo*, generando ND en neuronas y en la glía que lleva a la lisis celular en ciertas áreas del cerebro (Sivachenko *et al.*, 2016).

1. La Acetil-CoA-carboxilasa, ACC, como potencial neuroprotector

Nuestros resultados de los ensayos *in vivo* apoyan un rol neuroprotector de ACC en *Drosophila* actuando en diversos grupos neuronales y en la glia para mejorar la supervivencia y la movilidad. Un trabajo reciente sugiere una vinculación de su gen homólogo en vertebrados, el gen *ACC1*, con ND y NP. Cai y colaboradores sugieren un potencial rol neuroprotector en neuronas de ratones en cultivo (Cai *et al.*, 2016).

El aumento que observamos en la supervivencia dado por la expresión de ACC puede explicarse por un aumento de la autofagia. Como mencioné anteriormente, ACC toma acetil-CoA del medio citosólico para generar malonil-CoA (**Figura 54**). Esto reduce los niveles de este metabolito en el citosol. Se sabe que la baja de los niveles de acetil-CoA en este compartimento celular causa desacetilación de histonas, estimulando la

autofagia y extendiendo el largo de vida y que su baja en la mitocondria da el efecto opuesto (Eisenberg *et al.*, 2014; Mariño *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2015). Una disminución de la acetilación de histonas debido a una baja en las concentraciones de acetil-CoA nucleocitosólico, disminuirá la actividad de ACC, elevando los niveles de acetil-CoA para restaurar el balance en la acetilación de proteínas y la regulación génica (Zhang *et al.*, 2013). Dado que la hipoacetilación de histonas está asociada a ND y entre otras consecuencias reduce los niveles de ACC, este gen podría ejercer una función neuroprotectora, por intermedio de la regulación de la acetilación de histonas.

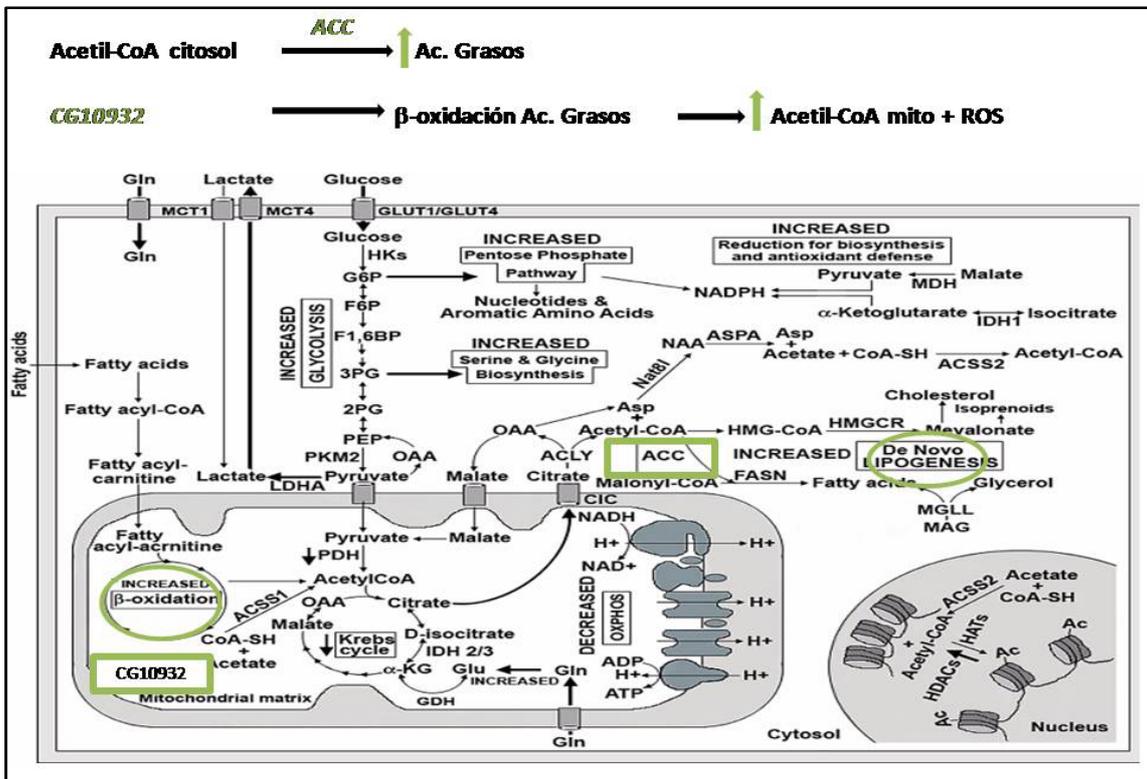


Figura 54. Resumen del lugar que ocupan las enzimas codificadas por los genes candidatos a neuroprotectores ACC y CG10932 en el metabolismo del acetil-CoA y los lípidos (AG). La imagen muestra el resumen de las vías de síntesis de AG (lipogénesis), degradación de AG (β-oxidación) y el metabolismo del acetil-CoA en los compartimentos celulares del citosol, las mitocondrias y el núcleo (dónde también se muestra el proceso de acetilación de histonas). Se resalta en verde la ubicación citológica y el proceso donde intervienen las enzimas codificadas por ACC y CG10932. Imagen adaptada de <https://www.researchgate.net/figure/Acetyl-CoA-synthesis-and-metabolism>.

El efecto neuroprotector dado por la expresión de ACC sugerido por nuestros experimentos podría también explicarse por una reducción del estrés oxidativo, proceso estrechamente vinculado a la ND (ver Discusión Capítulo I). Bailey y

colaboradores mostraron que el silenciamiento de *ACC* en un nicho de células madre de *Drosophila* reducía a la mitad la inducción de "gotas de lípidos" que se forman en condiciones de estrés oxidativo para proteger la glía y los neuroblastos de la peroxidación (Bailey *et al.*, 2015). Este efecto neuroprotector de *ACC* también podría explicarse por su participación en la regulación del tráfico de vesículas y lisosomas, cuyas fallas se asocian estrechamente a procesos de ND (ver Discusión Capítulo II; revisado en Bourdenx *et al.*, 2017). Sasamura y colaboradores mostraron que mutantes de *Drosophila* con falta de función en *ACC* presentaban defectos en el tráfico de endosomas (Sasamura *et al.*, 2013). Finalmente, el efecto neuroprotector de *ACC* podría explicarse por una regulación del sistema inmune estrechamente vinculado a apoptosis y ND (ver Discusión del Capítulo I; revisión en Cantera & Barrio, 2015). Dos trabajos vinculan al gen homólogo humano *ACC1* con la regulación del sistema inmune (Lee *et al.*, 2014; Handu *et al.*, 2015), por lo que se podría analizar si las variaciones de los niveles de expresión de *ACC* producen efectos en el sistema inmune de *Drosophila* con consecuencias que generen ND o NP.

Coincidentemente con nuestros resultados, algunos trabajos publicados en los últimos años sugieren una vinculación del gen *ACC* con el largo de vida en *Drosophila* y vertebrados, principalmente en estrecha asociación con variaciones en el aporte de nutrientes (ej. Katewa *et al.*, 2012). *ACC* es un gen regulado por señales nutricionales, encontrándose por ejemplo sobre-expresado en larvas normales de *Drosophila* en presencia de azúcar, para promover la síntesis de AG como forma de almacenamiento de glucosa y supervivencia frente a posibles situaciones como la inanición (Zinke *et al.*, 2002). Katewa y colaboradores demostraron que en *Drosophila*, el silenciamiento del gen *ACC* reducía en más de un 50% la extensión del largo de vida lograda por restricción calórica y que reducía significativamente en más de un 20% la mayor resistencia a estrés frente a la inanición, el frío o el estrés oxidativo inducido por paraquato asociada a este régimen nutricional (Katewa *et al.*, 2012). Estos mismos autores observaron posteriormente que la sobre-expresión del gen del reloj *timeless* en *Drosophila* aumentaba el largo de vida y mediaba los cambios observados en este parámetro bajo régimen de restricción calórica, pero que su co-expresión junto con el ARNi de *ACC* impedía este aumento de la supervivencia (Katewa *et al.*, 2016).

ACC podría ejercer un rol neuroprotector que se refleje más allá del aumento de la supervivencia que observamos en nuestros experimentos y que complementaremos con análisis histológicos para observar si existen fenotipos neuronales clásicos de ND asociados al silenciamiento de ACC y mejora de estos fenotipos por sobre-expresión del gen. Raina y colaboradores mostraron que la reducción del colesterol activa a ACC y promueve la síntesis de AG que actúan como precursores de las neuritas en células serotoninérgicas en cultivo de ratón (Raina *et al.*, 2013). Quizás sería interesante silenciar y sobre-expresar a ACC en neuronas serotoninérgicas para observar si existen efectos histológicos en las proyecciones neuronales.

2. La Acetil-CoA-acetiltransferasa, codificada por CG10932, como potencial neuroprotector

Nuestros resultados de los ensayos *in vivo* apoyan un rol neuroprotector fundamentalmente de la regulación de la Acetil-CoA-acetiltransferasa codificada por el gen *CG10932*, actuando principalmente en neuronas colinérgicas para mejorar la supervivencia y la movilidad. Como mencioné anteriormente, esta enzima interviene en la regulación de los niveles de AG y acetil-CoA principalmente en las mitocondrias, aumentando los niveles de acetil-CoA y de ROS (**Figura 54**). Estos procesos son ampliamente asociados a fenómenos de envejecimiento y sus enfermedades relacionadas. Es entonces coherente con que su silenciamiento específico reduzca los niveles de acetil-CoA mitocondrial y ROS en tipos neuronales específicos de gran gasto energético, aumentando así la supervivencia y la movilidad. El efecto neuroprotector de la reducción de la expresión de *CG10932* sugerido por nuestros resultados podría ser posteriormente investigado en más profundidad mediante otros métodos. Estos resultados son congruentes con el hecho de que este gen se encuentra significativamente sobre-expresado (U) en el mutante Ho16 de ND respecto al WT16 (ver **Figura 42**) y significativamente sub-expresado en el Ho17 respecto al Ho16 (ver Resultados Capítulo I).

Approcher *et al.*, sugieren una posible vinculación del gen *CG10932* con ND, en un modelo de ND causada por expresión de Tau humana en moscas (Approcher *et al.*,

2014). Estos autores encontraron que la sub-expresión del gen *CG10932* potenciaba la toxicidad mediada por la expresión transgénica de Tau humano en moscas, aumentando la formación de agregados proteicos. Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados, ya que estos autores emplearon el silenciamiento pan-neuronal mediado por el driver *elav-GAL4*, que en nuestros resultados muestra una tendencia a reducir la supervivencia y un efecto negativo en la movilidad, al igual que el silenciamiento dopaminérgico. En esta publicación no se analizó el efecto del silenciamiento específico de *CG10932* en neuronas colinérgicas que de acuerdo a nuestros resultados tiene un efecto neuroprotector aumentando la supervivencia y no afectando la movilidad.

La posible vinculación de *CG10932* con NP ha sido reportada para su homólogo en ratón *ACAT1*. Experimentos *in vitro* demostraron que el bloqueo farmacológico de *ACAT1* reducía la formación de placas β -amiloides en células (Bhattacharyya *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2013). Esto indica un potencial de NP mediante el bloqueo de *ACAT1* en ratones, pero el mecanismo y consecuencias no eran del todo claras. Shibuya y colaboradores más recientemente mostraron que el silenciamiento del gen *ACAT1* de ratones en cultivos de microglía e *in vivo* aumentaba la fagocitosis y degradación lisosomal de péptidos amiloides característicos del AD y estimulaba la formación de autofagosomas y la proteólisis lisosomal (Shibuya *et al.*, 2014). Estos autores sugieren que el bloqueo de *ACAT1* podría ejercer NP en otras enfermedades de ND además de en AD, ya que muchas de ellas también presentan alteraciones en el plegado de proteínas y acumulación de agregados proteicos en el SNC. Ambos trabajos refuerzan nuestras observaciones que sugieren una función NP de la disminución de la expresión de *CG10932* y sugerirían un rol de *CG10932* conservado entre *Drosophila* y ratones, que quizás en un futuro sea también confirmado en humanos.

3. La Acetil-CoA-oxidasa, codificada por *CG4586*, como potencial neuroprotector

Nuestros resultados de los ensayos de largo de vida para el silenciamiento del gen candidato a neuroprotector *CG4586* (**Figura 50** y **Tabla 12**) muestran que su reducción de expresión en la mayoría de los tipos celulares analizados acorta significativamente el largo de vida. En cambio, su silenciamiento en neuronas

colinérgicas podría tener un efecto neuroprotector aumentando la supervivencia. Esto podría validarse *in vivo* en un futuro mediante sobre-expresión en ensayos de largo de vida y climbing, tal como hicimos para *ACC* y *CG10932*, y fundamentalmente mediante métodos histológicos.

La escasa literatura existente sobre este gen no contiene indicios directos o indirectos de una posible vinculación con ND o NP. Resulta muy interesante entonces, indagar acerca de los genes de *Drosophila* con los que *CG4586* interactúa. Según Flybase, *CG4586* interactúa con el gen *CG3511*. En humanos este gen se llama *PPWD1*, interviene entre otros procesos en el plegado de proteínas, se expresa abundantemente en el SNC y sus mutaciones mejoran ciertas tautopatías (Butzlaff *et al.*, 2015).

El gen homólogo de *CG4586* en humanos es el *ACOX1* (*acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl*). Un trabajo publicado en 2012 (Chen & Burgoyne, 2012) analiza la potencial importancia de esta enzima que se expresa en los peroxisomas y la relaciona con una enfermedad denominada deficiencia de Acyl-CoA oxidasa peroxisomal (OMIM #609751) que se caracteriza entre otras cosas por un rango amplio y variable de problemas neurológicos.

4. Perspectivas generales para completar la caracterización de una potencial función neuroprotectora de los tres genes candidatos

Construcción de transgénicos de sobre-expresión de *CG4586*: Construiré líneas transgénicas *UAS-CG4586* mediante métodos estándar para analizar el efecto de la sobre-expresión de este gen en el largo de vida, locomoción, etc., al igual que hemos realizado para los transgénicos de sobre-expresión de *UAS-ACC* y *UAS-CG10932*.

Histología cerebral: Los procesos neurodegenerativos afectan en distinto grado la histología del tejido nervioso. El estudio histológico por tanto, es importante para la caracterización de un fenotipo de ND y para detectar una eventual mejoría por mecanismos de NP. Algunos fenotipos neurodegenerativos son evidenciados por la presencia de vacuolas en el cerebro, detectadas incluso sin tinciones específicas. Analizaré cerebros completos y/o cortes de cerebros de hembras vírgenes jóvenes (5

días de edad) y de edad avanzada (25-30 días de edad) de los transgénicos de silenciamiento de los tres genes candidatos y de sus transgénicos de sobre-expresión en un contexto de ND mutante para *parkin*.

Ensayos de largo de vida en transgénicos de sobre-expresión glial de los genes ACC y CG10932, y de los nuevos transgénicos de sobre-expresión del gen CG4586 y sus controles correspondientes, empleando la misma metodología mencionada anteriormente.

Ensayos de locomoción (climbing) de transgénicos de sobre-expresión glial de los genes ACC y CG10932, y de los de los nuevos transgénicos de sobre-expresión del gen CG4586 y sus controles correspondientes, empleando los mismos protocolos mencionados anteriormente.

Evaluación de parámetros biológicos asociados a variaciones en el metabolismo del acetil-CoA y lípidos en condiciones de ND por mutación en *parkin* y NP por variaciones de expresión de los genes candidatos en un contexto genómico mutante para *parkin*: Analizaré si en condiciones de ND (mutación en *parkin*) ciertos parámetros asociados al metabolismo de acetil-CoA y los lípidos están alterados y si en nuestras moscas transgénicas para los tres genes candidatos estos parámetros son similares a los de moscas control. Para ello extraeré muestras de cerebro y cuerpo graso de larvas de todos los genotipos de interés. Cuantificaré los niveles de: acetil-CoA mediante HPLC o colorimetría, según protocolos revisados en Tsuchiya *et al.*, 2014; los niveles de lípidos (AG) siguiendo el protocolo publicado en JOVE (Hazegh & Reis, 2016) que asocia la densidad de flotación de larvas en un gradiente creciente de sucrosa con la proporción de lípidos; los niveles de ROS (H₂O₂) mediante métodos fluorométricos publicados en Rahman *et al.*, 2014, aislando mitocondrias por centrifugación y midiendo el incremento de fluorescencia (excitación 312 nm/ emisión 420 nm) resultado de la oxidación del ácido homovanílico por acción del H₂O₂ en presencia de fluoróforo y los niveles de histona H3 acetilada mediante ensayos fluorométricos con kits comerciales (ej. *ab131561–Histone H3 Total Acetylation Detection Fast Kit*).

Identificación de otros genes del metabolismo del acetil-CoA y los lípidos con potencial rol NP: Analizaré la lista original de 633 genes candidatos (Ferreiro *et al.*, 2012) en busca de otros genes del metabolismo del acetil-CoA y los lípidos. Revisaré sus perfiles de expresión en la bibliografía disponible sobre datos de secuenciación de mutantes de ND (ej: *parkin*) y de dietas modificadas (ej: ayuno, aporte moderado de AG).

CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS



RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES PRINCIPALES DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis era identificar genes con potencial neuroprotector usando como modelo el caso excepcional de ND reversible que ofrecen los mutantes nulos para los genes *sall* de *Drosophila* (Cantera *et al.*, 2002).

En el Capítulo I de la tesis presento el uso de secuenciación mRNA-Seq para investigar la **hipótesis** de que el transcriptoma del mutante *sall* estaría enriquecido en genes asociados a ND en el estadio 16 y que estaría enriquecido en genes de NP en el estadio 17. El **objetivo** general acorde a esta hipótesis era identificar genes que por estar significativamente sub- o sobre-expresados en el mutante *sall* en estas etapas embrionarias podrían ser definidos como potencialmente importantes para la NP. Como **conclusión**, nuestro análisis logró identificar 633 genes con ese potencial. Además, logró validar el modelo de ND reversible planteado por Cantera y cols. (2002).

Uno de los genes identificados como asociado a ND es *w*. Este gen es ampliamente empleado para muchos experimentos y entre otras cosas, una de sus mutaciones es usada como genotipo para la construcción de casi todas las moscas transgénicas disponibles. Nuestros datos, combinados con los aportados por otros grupos, nos llevó a plantearnos la **hipótesis** estudiada en el Capítulo II, de que los mutantes nulos para el gen *w* sufren ND. Nuestro **objetivo** fue por tanto estudiar en detalle el estado de ND de estos mutantes mediante ensayos de largo de vida, locomoción e histología. Como **conclusión**, nuestro análisis mostró que estos mutantes presentan una grave degeneración retinal progresiva que parece ser al menos parcialmente revertida por la expresión del gen *mini-w⁺*. Este trabajo interpela directamente a los grupos de investigación para que no utilicen cepas mutantes *w* como controles en experimentos de ND o NP.

Finalmente, en el Capítulo III de esta tesis investigamos la **hipótesis** de que la lista de genes regulados diferencialmente en los mutantes *sall* (Capítulo I), la cual presenta un enriquecimiento en genes empíricamente asociados a ND y/o NP, presentaría también un enriquecimiento en otros genes con función neuroprotectora aún no conocida, denominados "genes candidatos a NP". El **objetivo** general de este capítulo fue seleccionar un número restringido de genes para estudiar la posibilidad de

una función neuroprotectora. Seleccionamos tres genes pertenecientes al metabolismo del acetil-CoA (*ACC*, *CG4586* y *CG10932*) que se expresan en el SNC de *Drosophila* y humanos y no habían sido directamente vinculados con ND y/o NP. Como **conclusión**, nuestros experimentos muestran que tanto *ACC* como *CG10932* tienen muy probablemente un rol neuroprotector. Los ensayos de largo de vida para el silenciamiento del gen *CG4586* también sugieren un posible rol neuroprotector para este gen. Debemos realizar los ensayos de largo de vida para la sobre-expresión de este gen y los ensayos de climbing antes de sacar más conclusiones al respecto.

Se plantea un plan de trabajo para futuras investigaciones entre las que se incluye el análisis histológico de cerebros de moscas adultas de todos los genotipos transgénicos empleados en los ensayos *in vivo*, con el fin de terminar de validar una eventual función NP de estos genes del metabolismo del acetil-CoA.

Dado que los genes candidatos de *Drosophila* analizados en este último capítulo de la tesis presentan genes homólogos en humanos aún no asociados de manera experimental a ND y NP, los resultados de esta tesis permitirían sugerir la exploración de un posible rol neuroprotector de estos genes también en humanos y en un futuro podrían contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos de ND y NP.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal M. & Biswas A. (2015). Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci.* 2:54.
2. Aigaki T., Seong K.H., Matsuo T. (2002). Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.* 123:1531–1541.
3. Al-Baradie R., Yamada K., St Hilaire C., Chan W. M., Andrews C., McIntosh N., Nakano M., Martonyi E. J., Raymond W. R., Okumura S., Okihira M. M., Engle E. C. (2002). Duane radial ray syndrome (Okihira syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Med Genet.* 71:1195-1199.
4. Al-Shahrour F., Minguez P., Tárraga J., Montaner D., Alloza E., Vaquerizas J.M., Conde L., Blaschke C., Vera J., Dopazo J. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acid Res.* 34:W472– W476.
5. Ambegaokar S.S. & Jackson G.R. (2010). Interaction between eye pigment genes and tau-induced neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 186,435-442.
6. Anaka M., MacDonald C.D., Barkova E., Simon K., Rostom R., Godoy R.A., Haigh A.J., Meinertzhagen I.A., Lloyd V. (2008). The *white* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a protein with a role in courtship behaviour. *J Neurogenet.* 22,243-276.
7. Anchisi L., Dessì S., Pani A., Mandas A. (2013). Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Front Physiol.* 4;3:486.
8. Antonelli M.C., Guillemin G.J., Raisman-Vozari R., Del-Bel E.A., Aschner M., Collins M.A., Tizabi Y., Moratalla R., West A.K. (2012). New strategies in neuroprotection and neurorepair. *Neurotox Res.* 21(1):49-56.
9. Aoun M. & Tiranti V. (2015). Mitochondria: A crossroads for lipid metabolism defect in neurodegeneration with brain iron accumulation diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 63:25-31.
10. Arbeitman M.N., Furlong E.E., Imam F., Johnson E., Null B.H., Baker B.S., Krasnow M.A., Scott M.P., Davis R.W., White K.P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 297:2270–2275.
11. Ashburner M. & Thompson J.N. (1978). "The laboratory culture of *Drosophila*". In Ashburner M., Wright T.R.F. The genetics and biology of *Drosophila*. 2A. Academic Press. 1–81.
12. Bailey A.P., Koster G., Guillemier C., Hirst E.M., MacRae J.I., Lechene C.P., Postle A.D., Gould A.P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell.* 163(2):340-53.
13. Barrio R., Shea M.J., Carulli J., Lipkow K., Gaul U., Frommer G., Schuh R., Jäckle H., Kafatos F.C. (1996). The *spalt related* gene of *Drosophila melanogaster* is a member of an ancient gene family, defined by the adjacent, region-specific homeotic gene *spalt*. *Dev Genes Evol.* 206:315-325.
14. Barrio R., de Celis J.F., Bolshakov S., Kafatos F.C. (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the *Drosophila spalt* complex at different developmental stages. *Dev Biol.* 215:33-47.
15. Belušić G. (2011). ERG in *Drosophila*. In Electroretinograms (ed. G. Belušić). Rijeka, Croatia: *In Tech.* 221-38. ISBN:978-953-307-383-5.
16. Bertram L. & Tanzi R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 115(6):1449-57.

17. Bhattacharyya R., Barren C., Kovacs D.M. (2013). Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *J Neurosci.* 33:11169–11183.
18. Bischof J., Björklund M., Furger E., Schertel C., Taipale J., Basler K. (2013). A versatile platform for creating a comprehensive UAS-ORFeome library in *Drosophila*. *Development.* 140(11):2434-42.
19. Blanco E., Messeguer X., Smith T.F., Guigó R. (2006). Transcription factor map alignment of promoter regions. *PLoS Comput Biol.* 2:e49.
20. Blanco E., Ruiz-Romero M., Beltran S., Bosch M., Punset A., Serras F., Corominas M. (2010). Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs. *BMC Dev Biol.* 10:94.
21. Bonini N.M. (2002). Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:16407–16411.
22. Bonini N.M. & Fortini M.E. (2003). Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci.* 26:627–656.
23. Borozdin W., Boehm D., Leipoldt M., Wilhelm C., Reardon W., Clayton-Smith J., Becker K., Mühlendyck H., Winter R., Giray O., Silan F., Kohlhase J. (2004). SALL4 deletions are a common cause of Okhiro and acro-renal-ocular syndromes and confirm haploinsufficiency as the pathogenic mechanism. *J Med Genet.* 41:e113.
24. Borycz J., Borycz J.A., Kubów A., Lloyd V., Meinertzhagen I.A. (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *J Exp Biol.* 211,3454-3466.
25. Bosveld F., Rana A., van der Wouden P.E., Lemstra W., Ritsema M., Kampinga H.H., Sibon O.C. (2008). De novo CoA biosynthesis is required to maintain DNA integrity during development of the *Drosophila* nervous system. *Hum Mol Genet.* 17(13):2058-69.
26. Bourdenx M., Koulakiotis N.S., Sanoudou D., Bezard E., Dehay B., Tsarbobopoulos A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Prog Neurobiol.* 155:171-193.
27. Boyd O., Weng P., Sun X., Alberico T., Laslo M., Obenland D.M., Kern B., Zou S. (2011). Nectarine promotes longevity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med.* 50:1669-1678.
28. Bracha A.L., Ramanathan A., Huang S., Ingber D.E., Schreiber S.L. (2010). Carbon metabolism-mediated myogenic differentiation. *Nat Chem Biol.* 6:202–204.
29. Brand A.H. & Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118(2):401-15.
30. Bredesen D.E., Rao R.V., Mehlen P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature.* 443(7113):796-802.
31. Brown A.E., Baumbach J., Cook P.E., Ligoxygakis P. (2009). Short-term starvation of immune deficient *Drosophila* improves survival to gram-negative bacterial infections. *PLoS One.* 4,e4490.
32. Brown M.B. & Forsythe A.B. (1974). Robust tests for the equality of variances. *J Amer Statist Assoc Journal.* 69,364-367.
33. Brown P.O. & Botstein D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21,33e37.

34. Bulat V., Rast M., Pielage J. (2014). Presynaptic CK2 promotes synapse organization and stability by targeting Ankyrin2. *J Cell Biol.* 204,77-94.
35. Bulgakova N.A., Rentsch M., Knust E. (2010). Antagonistic functions of two stardust isoforms in *Drosophila* photoreceptor cells. *Mol Biol Cell.* 21,3915-3925.
36. Butzlaff M., Hannan S.B., Karsten P., Lenz S., Ng J., Voßfeldt H., Prüßing K., Pflanz R., Schulz J.B., Rasse T., Voigt A. (2015). Impaired retrograde transport by the Dynein/Dynactin complex contributes to Tau-induced toxicity. *Hum Mol Genet.* 24(13):3623-37.
37. Byron S.A., Van Keuren-Jensen K.R., Engelthaler D.M., Carpten J.D., Craig D.W. (2016). Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet.* 17(5):257-71.
38. Cai L., Sutter B.M., Li B., Tu B.P. (2011). Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell.* 20: 426–37.
39. Cai B., Li W., Mao X., Winters A., Ryou M.G., Liu R., Greenberg D.A., Wang N., Jin K., Yang S.H. (2016). Neuroglobin Overexpression Inhibits AMPK Signaling and Promotes Cell Anabolism. *Mol Neurobiol.* 53(2):1254-65.
40. Calado R.T. & Young N.S. (2009). Telomere diseases. *N Engl J Med.* 361(24):2353-65.
41. Campbell J.L. & Nash H.A. (2001). Volatile general anesthetics reveal a neurobiological role for the *white* and *brown* genes of *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol.* 49,339-349.
42. Camporeale G., Giordano E., Rendina R., Zempleni J., Eissenberg J.C. (2006). *Drosophila melanogaster* holocarboxylase synthetase is a chromosomal protein required for normal histone biotinylation, gene transcription patterns, lifespan, and heat tolerance. *J Nutr.* 136:2735–2742.
43. Cantera R., Luer K., Rusten T.E., Barrio R., Kafatos F.C., Technau G.M. (2002). Mutations in *spalt* cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development.* 129,5577–5586.
44. Cantera R., Ferreiro M.J., Aransay A.M., Barrio R. (2014). Global Gene Expression Shift during the Transition from Early Neural Development to Late Neuronal Differentiation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE.* 9(5):e97703.
45. Cantera R. & Barrio R. (2015). Do the genes of the innate immune response contribute to neuroprotection in *Drosophila*? *Innate Immun.* 7(1):3-10.
46. Cermenati G., Mitro N., Audano M., Melcangi R.C., Crestani M., De Fabiani E., Caruso D. (2015). Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 1851(1):51-60.
47. Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., Giuste F.O., Brooks M.J., Swaroop A. (2016). Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 55:1-31.
48. Chan R.F., Lewellyn L., DeLoyth J.M., Sennett K., Coffman S., Hewitt M., Bettinger J.C., Warrick J.M., Grotewiel M. (2014). Contrasting influences of *Drosophila white/mini-white* on ethanol sensitivity in two different behavioural assays. *Alcohol Clin Exp Res.* 38,1582-1593.
49. Chaugule V.K., Burchell L., Barber K.R., Sidhu A., Leslie S.J., Shaw G.S., Walden H. (2011). Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J.* 30;2853-2867.
50. Chen X. & Burgoyne R.D. (2012). Identification of common genetic modifiers of neurodegenerative diseases from an integrative analysis of diverse genetic screens in model organisms. *BMC Genomics.* 13:71.

51. Chinchore Y., Gerber G.F., Dolph P.J. (2012). Alternative pathway of cell death in *Drosophila* mediated by NF- κ B transcription factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109,E605-612.
52. Chintapalli V.R., Wang J., Dow J.A. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet.* 39,715-720.
53. Choksi D.K., Roy B., Chatterjee S., Yusuff T., Bakhoun M.F., Sengupta U., Ambegaokar S., Kayed R., Jackson G.R. (2013). TDP-43 Phosphorylation by casein kinase I (var epsilon) promotes oligomerization and enhances toxicity in vivo. *Hum Mol Genet.* 23:1025–1035.
54. Chowdary P.D., Che D.L., Cui B. (2012). Neurotrophin signaling via long-distance axonal transport. *Annu Rev Phys Chem.* 63:571-94.
55. Cobb C.A. & Cole M.P. (2015). Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 84,4-21.
56. Colombelli C., Aoun M., Tiranti V. (2015). Defective lipid metabolism in neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) syndromes: not only a matter of iron. *J Inherit Metab Dis.* 38(1):123-36.
57. Curtin K.D., Zhang Z., Wyman R.J. (2002). Gap junction proteins are not interchangeable in development of neural function in the *Drosophila* visual system. *Journal of Cell Science.* 115:3379-3388.
58. Curtis C., Landis G.N., Folk D., Wehr N.B., Hoe N., Waskar M., Abdueva D., Skvortsov D., Ford D., Luu A., Badrinath A., Levine R.L., Bradley T.J., Tavaré S., Tower J. (2007). Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes. *Genome Biol.* 8:R262.
59. Dauer W. & Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39, 889–90910.
60. Davies S.A., Cabrero P., Overend G., Altchison L., Sebastian S., Terhzaz S., Dow J.A. (2014). Cell signaling mechanisms for insect stress tolerance. *J. Exp. Biol.* 217,119-128.
61. de Celis J.F. & Barrio R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int J Dev Biol.* 53:1385-1398.
62. De Strooper B. & Scorrano L. (2012). Close encounter: mitochondria, endoplasmic reticulum and Alzheimer's disease. *EMBO J.* 31(21):4095-7.
63. Diegelmann S., Zars M., Zars T. (2006). Genetic dissociation of acquisition and memory strength in the heat-box spatial learning paradigm in *Drosophila*. *Learn Mem.* 13,72-83.
64. Ding H., Dolan P.J., Johnson G.V. (2008). Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem.* 106, 2119-2130.
65. Dirican E. & Akkiprik M. (2016). Functional and clinical significance of SALL4 in breast cancer. *Tumor Biol.* 27444278.
66. Dong X., You Y., Wu J. Q. (2016). Building an RNA Sequencing Transcriptome of the Central Nervous System. *The Neuroscientist.* Vol. 22(6)579–592.
67. Edwards R.H. (1993). Neural degeneration and the transport of neurotransmitters. *Ann Neurol.* 34(5):638-45.
68. Eisenberg T., Schroeder S., Andryushkova A., Pendl T., Küttner V., Bhukel A., Mariño G., Pietrocola F., Harger A., Zimmermann A., Moustafa T., Sprenger A., Jany E., Büttner S., Carmona-Gutierrez D., Ruckstuhl C., Ring J., Reichelt W., Schimmel K., Leeb T., Moser C., Schatz S., Kamolz L.P., Magnes C., Sinner F., Sedej S., Fröhlich K.U., Juhasz G., Pieber T.R.,

Dengjel J., Sigrist S.J., Kroemer G., Madeo F. (2014). Nucleocytoplasmic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme A stimulates autophagy and prolongs lifespan. *Cell Metab.* 19(3):431-44.

69. Elstob P.R., Brodu V., Gould A.P. (2001). Spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the *Drosophila* EGF receptor. *Development.* 128,723–732.

70. Evans J.M., Day J.P., Cabrero P., Dow J.A., Davies S.A. (2008). A new role for a classical gene: *white* transports cyclic GMP. *J Exp Biol.* 211,890-899.

71. Faust J.E., Verma A., Peng C., McNew J.A. (2012). An inventory of peroxisomal proteins and pathways in *Drosophila melanogaster*. *Traffic.* 13(10):1378-92.

72. Fernández-Ayala D.J., Chen S., Kempainen E., O'Dell K.M., Jacobs H.T. (2010). Gene expression in a *Drosophila* model of mitochondrial disease. *PLoS One.* 5:e8549.

73. Fernandez-Funez P., Casas-Tinto S., Cepeda-Nieto A., Soto C., Rincon-Limas D. (2007). Hsp70 protects *Drosophila* brain neurons against Prion-dependent neurodegeneration. *A Dros Res Conf.* 48:77.

74. Ferreiro M.J., Rodríguez-Ezpeleta N., Pérez C., Hackenberg M., Aransay A.M., Barrio R., Cantera R. (2012). Whole transcriptome analysis of a reversible neurodegenerative process in *Drosophila* reveals potential neuroprotective genes. *BMC Genomics.* 13,483.

75. Ferreiro M.J., Pérez C., Marchesano M., Ruiz S., Caputi A., Aguilera P., Barrio R., Cantera R. (2018). *Drosophila melanogaster White* Mutant *w¹¹¹⁸* Undergo Retinal Degeneration. *Front Neurosci.* 11:732.

76. Franceschini N., Kirschfeld K., Minke B. (1981). Fluorescence of photoreceptor cells observed *in vivo*. *Science.* 213,1264-1267.

77. Franceschini N. & Kirschfeld K. (1971). *In vivo* optical study of photoreceptor elements in the compound eye of *Drosophila*. *Kybernetik.* 8,1-13.

78. Galluzzi L. & Kroemer G. (2015). Defective autophagy gets to the brain. *Oncotarget.* 6(37):39396-7.

79. Gascon E. & Gao F.B. (2012). Cause or Effect: Misregulation of microRNA Pathways in Neurodegeneration. *Front Neurosci.* 6:48.

80. Giagtzoglou N., Li T., Yamamoto S., Bellen H.J. (2013). *Drosophila* EHBP1 regulates Scabrous secretion during Notch-mediated lateral inhibition. *J Cell Sci.* 126:3686-3696.

81. Gonzalo-Gómez A., Turiegano E., León Y., Molina I., Torroja L., Canal I. (2012). Ih current is necessary to maintain normal dopamine fluctuations and sleep consolidation in *Drosophila*. *PLoS One.* 7,e36477.

82. Goodwill K.E., Sabatier C., Stevens R.C. (1998). Crystal structure of tyrosine hydroxylase with bound cofactor analogue and iron at 2.3 Å resolution: self-hydroxylation of the Phe300 and the pterin-binding site. *Biochemistry.* 37,13437-13445.

83. Graff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.H. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiological reviews.* 91, 603-649.

84. Gräff J., Rei D., Guan J.S., Wang W.Y., Seo J., Hennig K.M., Nieland T.J., Fass D.M., Kao P.F., Kahn M., Su S.C., Samiei A., Joseph N., Haggarty S. J., Delalle I., Tsai L.H. (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature.* 483(7388):222-6.

85. Grasso M., Piscopo P., Confaloni A., Denti M.A. (2014). Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules.* 19,6891–6910.

86. Graveley B.R., Brooks A.N., Carlson J.W., Duff M.O., Landolin J.M., Yang L. (2011). The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 471,473e479.
87. Green M.M. (1996). The "Genesis of the white-eyed mutant" in *Drosophila melanogaster*: a reappraisal. *Genetics*. 142,329-331.
88. Greene J.C., Whitworth A.J., Kuo I., Andrews L.A., Feany M.B., Pallanck L.J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(7):4078-83.
89. Greene J.C., Whitworth A.J., Andrews L.A., Parker T.J., Pallanck L.J. (2005). Genetic and genomic studies of *Drosophila parkin* mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 14:799–811.
90. Gruenewald C., Botella J.A., Bayersdorfer F., Navarro J.A., Schneuwly S. (2009). Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med*. 46,1688-1676.
91. Gupta V.K., Pech U., Bhukel A., Fulterer A., Ender A., Mauermann S.F., Andlauer T.F.M., Antwi-Adjei E., Beuschel C., Thriene K. et al. (2016). Spermidine suppresses age-associated memory impairment by preventing adverse increase of presynaptic active zone size and release. *PLoS Biol*. 14(9).
92. Haddadi M., Nongthomba U., Jahromi S.R., Ramesh S.R. (2016). Transgenic *Drosophila* model to study apolipoprotein E4-induced neurodegeneration. *Behav Brain Res*. 301,10-8.
93. Handu M., Kaduskar B., Ravindranathan R., Soory A., Giri R., Elango V.B., Gowda H., Ratnaparkhi G.S. (2015). SUMO-Enriched Proteome for *Drosophila* Innate Immune Response. *G3 (Bethesda)*. 5(10):2137-54.
94. Hardie D.G., Scott J.W., Pan D.A., Hudson E.R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*. 546,113–120.
95. Harrison S.J., Parrish M., Monaghan A.P. (2008). Sall3 is required for the terminal maturation of olfactory glomerular interneurons. *J Comp Neurol*. 507:1780–1794.
96. Hazegh K.E. & Reis T. (2016). A Buoyancy-based Method of Determining Fat Levels in *Drosophila*. *J Vis Exp*. (117).
97. Heng X., Breer H., Zhang X., Tang Y., Li J., Zhang S., Le W. (2012). Sall3 Correlates with the Expression of TH in Mouse Olfactory Bulb. *J Mol Neurosci*. 46:293–302.
98. Hirth F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders*. 9:504-523.
99. Hollemann T., Schuh R., Pieler T., Stick R. (1996). *Xenopus* Xsal-1, a vertebrate homolog of the region specific homeotic gene *spalt* of *Drosophila*. *Mech Dev*. 55:19-32.
100. Hooper S.D., Boué S., Krause R., Jensen L.J., Mason C.E., Ghanim M., White K.P., Furlong E.E., Bork P. (2007). Identification of tightly regulated groups of genes during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Mol Syst Biol*. 3:72.
101. Horwitz A.R. (2012). The origins of the molecular era of adhesion research. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(12):805-11.
102. Hoyer S.C., Eckart A., Herrel A., Zars T., Fischer S.A., Hardie S L., Heisenberg M. (2008). Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Curr Biol*. 18,159-167.
103. Ishikiriya S., Kudoh F., Shimojo N., Iwai J., Inoue T. (1996). Townes-Brocks syndrome associated with mental retardation. *Am J Med Genet*. 61:191-192.

- 104.** Jaiswal M., Sandoval H., Zhang K., Bayat V., Bellen H.J. (2012). Probing mechanisms that underlie human neurodegenerative diseases in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 46,371-396.
- 105.** Jenner P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53:S26-S38.
- 106.** Julien C., Tremblay C., Émond V., Lebbadi M., Salem Jr.N., Bennett D.A., Calon F. (2009). SIRT1 Decrease Parallels the Accumulation of tau in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68, 48.
- 107.** Kain J.S., Stokes C., de Bivort B.L. (2012). Phototactic personality in fruit flies and its suppression by serotonin and white. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109,19834-19839.
- 108.** Katewa S.D., Demontis F., Kolipinski M., Hubbard A., Gill M.S., Perrimon N., Melov S., Kapahi P. (2012). Intramyocellular fatty-acid metabolism plays a critical role in mediating responses to dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* 16(1):97-103.
- 109.** Katewa S.D., Akagi K., Bose N., Rakshit K., Camarella T., Zheng X., Hall D., Davis S., Nelson C.S., Brem R.B., Ramanathan A., Sehgal A., Giebultowicz J.M., Kapahi P. (2016). Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab.* 23(1):143-54.
- 110.** Kawakami Y., Uchiyama Y., Rodriguez-Esteban C. et al. (2009). Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities. *Development.* 136:585-594.
- 111.** Kelberman D., Islam L., Lakowski J., Bacchelli C., Chanudet E., Lescai F., Patel A., Stupka E., Buck A., Wolf S., Beales P. L., Jacques T. S., Bitner-Glindzicz M., Liasis A., Lehmann O. J., Kohlhase J., Nischal K. K., Sowden J. C. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Hum Mol Genet.* 23(10):2511-26.
- 112.** Kiefer S.M., McDill B.W., Yang J., Rauchman M. (2002). Murine Sall1 represses transcription by recruiting a histone deacetylase complex. *J. Biol. Chem.* 277,14869-14876.
- 113.** Kim K.H. (1997). Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr.* 17:77-99.
- 114.** Kim S.C., Sprung R., Chen Y., Xu Y., Ball H., Pei J., Cheng T., Kho Y., Xiao H., Xiao L., Grishin N.V., White M., Yang X.J., Zhao Y. (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol. Cell.* 23,607-618.
- 115.** Kim H.J., Morrow G., Westwood J.T., Michaud S., Tanguay R.M. (2010). Gene expression profiling implicates OXPHOS complexes in lifespan extension of flies over-expressing a small mitochondrial chaperone, Hsp22. *Exp Gerontol.* 45:611-620.
- 116.** Kim G.H., Kim J.E, Rhie S.J., Yoon S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol.* 24,325-340.
- 117.** Kinnunen S., Mänttari S., Herzig K.H., Nieminen P., Mustonen A.M., Saarela S. (2016). Effects of wintertime fasting and seasonal adaptation on AMPK and ACC in hypothalamus, adipose tissue and liver of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 192:44-51.
- 118.** Kohlhase J., Schuh R., Dowe G., Kuhnlein R.P., Jackle H. et al. (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the *Drosophila* gene *spalt*. *Genomics.* 38:291-298.
- 119.** Kohlhase J., Wischermann A., Reichenbach H., Froster U., Engel W. (1998). Mutations in SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nature Genetics.* 18:81-83.

- 120.** Kohlhase J., Hausmann S., Stojmenovic G., Dixkens C., Bink K. *et al.* (1999). SALL3, a new member of the human *spalt-like* gene family, maps to 18q23. *Genomics*. 62:216-222.
- 121.** Kohlhase J., Heinrich M., Schubert L., Liebers M., Kispert A., Laccone F., Turnpenny P., Winter R.M. (2002). Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Gene*. 11:2979-2987.
- 122.** Kraft C., Peter M., Hofmann K. (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol*. 12(9):836-41.
- 123.** Krstic D., Boll W., Noll M. (2013). Influence of the White locus on the courtship behaviour of *Drosophila* males. *PLoS One*. 8,e77904.
- 124.** Kruskal W.H. & Wallis W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statist Assoc Journal*. 47,583–621.
- 125.** Lai C.Q., Parnell L.D., Lyman R.F., Ordovas J.M., Mackay T.F. (2007). Candidate genes affecting *Drosophila* life span identified by integrating microarray gene expression analysis and QTL mapping. *Mech Ageing Dev*. 128:237–249.
- 126.** Landis G., Shen J., Tower J. (2012). Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*. 4,768-789.
- 127.** Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 10:R25.
- 128.** Lardenoije R., Iatrou A., Kenis G., Kompotis K., Steinbusch H.W., Mastroeni D., Coleman P., Lemere C.A., Hof P.R., van den Hove D.L., Rutten B.P. (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 131:21-64.
- 129.** Lee S.J. & Montell C. (2004). Suppression of constant-light-induced blindness but not retinal degeneration by inhibition of the rhodopsin degradation pathway. *Curr Biol*. 14,2076-2085.
- 130.** Lee S.K. & Kumar P. (2009). Conditional RNAi: Towards a silent gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 61:650–664.
- 131.** Lee Y., Paik D., Bang S., Kang J., Chun B., Lee S., Bae E., Chung J., Kim J. (2008). Loss of spastic paraplegia gene atlastin induces age-dependent death of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Neurobiol Aging*. 29,84-94.
- 132.** Lee J., Walsh M.C., Hoehn K.L., James D.E., Wherry E.J., Choi Y. (2014). Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. *J Immunol*. 192(7):3190-9.
- 133.** Lenz S., Karsten P., Schulz J. B., Voigt A. (2013). *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 127:453–460.
- 134.** Lessing D. & Bonini N.M. (2009). Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants. *Nat Rev Genet*. 10:359-370.
- 135.** Li D., Tian Y., Ma Y., Benjamin T. (2004). p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Mol. Cell. Biol*. 24,3885–3893.
- 136.** Lincoln B.L.2nd., Alabsi S.H., Frendo N., Freund R., Keller L.C. (2015). *Drosophila* Neuronal Injury Follows a Temporal Sequence of Cellular Events Leading to Degeneration at the Neuromuscular Junction. *J Exp Neurosci*. 9,1-9.

- 137.** Lionaki E., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. (2015). Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: New insights into a complex interplay. *Biochim Biophys Acta*. 1847(11):1412-23.
- 138.** Liu H., Adler A.S., Segal E., Chang H.Y. (2007). A Transcriptional Program Mediating Entry into Cellular Quiescence. *PLoS Genet*. 3:e91.
- 139.** Liu L., Souto J., Liao W., Jiang Y., Li Y., Nishinakamura R., et al. (2013). Histone lysinespecific demethylase 1 (LSD1) protein is involved in Sal-like protein 4 (SALL4)- mediated transcriptional repression in hematopoietic stem cells. *J. Biol. Chem*. 288:34719–34728.
- 140.** Liu L., Zhang K., Sandoval H., Yamamoto S., Jaiswal M., Sanz E., Li Z., Hui J., Graham B.H., Quintana A., Bellen H.J. (2015). Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell*. 160(1-2):177-90.
- 141.** Loftus T.M., Jaworsky D.E., Frehywot G.L., Townsend C.A., Ronnett G.V., Lane M.D., Kuhajda F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*. 288(5475):2379-81.
- 142.** Lőrincz P., Takáts S., Kárpáti M., Juhász G. (2016). iFly: The eye of the fruit fly as a model to study autophagy and related trafficking pathways. *Exp Eye Res*. 144:90-8.
- 143.** Lu B., Vogel H. (2009). *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pathol*. 4:315-42.
- 144.** Mackenzie S.M., Howells A.J., Cox G.B., Ewart G.D. (2000). Sub-cellular localisation of the White/Scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*. 108:239–252.
- 145.** Mann H.B. & Whitney D.R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat*. 18,50-60.
- 146.** Manzanillo P.S., Ayres J.S., Watson R.O., Collins A.C., Souza G., Rae C.S., Schneider D.S., Nakamura K., Shiloh M.U., Cox J.S. (2013). The ubiquitin ligase *parkin* mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*. 501,512-516.
- 147.** Mariño G., Pietrocola F., Eisenberg T., Kong Y., Malik S.A., Andryushkova A., Schroeder S., Pendl T., Harger A., Niso-Santano M., Zamzami N., Scoazec M., Durand S., Enot D.P., Fernández Á.F., Martins I., Kepp O., Senovilla L., Bauvy C., Morselli E., Vacchelli E., Bennetzen M., Magnes C., Sinner F., Pieber T., López-Otín C., Maiuri M.C., Codogno P., Andersen J.S., Hill J.A., Madeo F., Kroemer G. (2014). Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol Cell*. 53(5):710-25.
- 148.** Marioni J.C., Mason C.E., Mane S.M., Stephens M., Gilad Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res*. 18,1509e1517.
- 149.** Mastushita-Sakai T., White-Grindley E., Samuelson J., Seidel C., Si K. (2010). *Drosophila* Orb2 targets genes involved in neuronal growth, synapse formation, and protein turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:11987–11992.
- 150.** Matsuda N., Sato S., Shiba K., Okatsu K., Saisho K., Gautier C.A., Sou Y.S., Saiki S., Kawajiri S., Sato F., Kimura M., Komatsu M., Hattori N., Tanaka K. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*. 189,211-221.
- 151.** Meigen M. (1830). *Drosophila (Sophophora) melanogaster*. Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen. *Insekten*. 6.pg.85.

- 152.** Menzies K.J., Zhang H., Katsyuba E., Auwerx J. (2016). Protein acetylation in metabolism-metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol.* 12(1):43-60.
- 153.** Milan M., Weihe U., Perez L., Cohen S. M. (2001). The LRR proteins capricious and Tartan mediate cell interactions during DV boundary formation in the *Drosophila* wing. *Cell.* 106,785–794.
- 154.** Miller D.B. & O' Callaghan J.P. (2015). Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. *Metabolism.* 64,S40–S46.
- 155.** Morata G. & Garcia-Bellido A. (1973). Behaviour in aggregates of irradiated imaginal disk cells of *Drosophila*. *Wilhelm Roux' Archiv* 172,187-195.
- 156.** Morgan T.H. (1910). Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science.* 32, 120-122.
- 157.** Morris B.J. (2013). Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med.* 56:133-71.
- 158.** Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods.* 5,621e628.
- 159.** Murphy S.R., Chang C.C., Dogbevia G., Bryleva E.Y., Bowen Z., Hasan M.T., Chang T.Y. (2013). Acat1 knockdown gene therapy decreases amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mo Ther.* 21:1497–1506.
- 160.** Narendra D.P., Jin S.M., Tanaka A., Suen D.F., Gautier C.A., Shen J., Cookson M.R., Youle R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin *PLoS Biol.* 8.e1000298.
- 161.** Neckameyer W.S, Woodromem S., Holtm B., Mayerm A. (2000). Dopamine and senescence in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol Aging.* 21,145-152.
- 162.** Nelson B., Nishimura S., Kanuka H., Kuranaga E., Inoue M., Hori G., Nakahara H., Miura M. (2005). Isolation of gene sets affected specifically by polyglutamine expression: implication of the TOR signaling pathway in neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 12:1115–1123.
- 163.** Netzer C., Rieger L., Brero A., Zhang C.D., Hinzke M., Kohlhase J., Bohlander S.K. (2001). SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Hum Mol Genet.* 10:3017–3024.
- 164.** O' Hare K., Murphy C., Levis R., Rubin G.M. (1984). DNA sequence of the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol.* 180,437-455.
- 165.** Organista M.F. & de Celis J.F. (2012). The Spalt transcription factors regulate cell proliferation, survival and epithelial integrity downstream of the Decapentaplegic signalling pathway. *Biology Open.* 2,37–48.
- 166.** Pak W.L. & Lidington K.J. (1974). Fast electrical potential from a long-lived, long-wavelength photoproduct of fly visual pigment. *J Gen Physiol.* 63,740-756.
- 167.** Papatsenko I., Levine M., Papatsenko D. (2010). Temporal waves of coherent gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Bioinformatics.* 26:2731–2736.
- 168.** Park J., Lee S.B., Lee S., Kim Y., Song S., Kim S., Bae E., Kim J., Shong M., Kim J.M., Chung J. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by *parkin*. *Nature.* 441:1157–61.
- 169.** Parvy J.P., Napal L., Rubin T., Poidevin M., Perrin L., Wicker-Thomas C., Montagne J. (2012). *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet.* 8(8):e1002925.

- 170.** Pepling M. & Mount S.M. (1990). Sequence of a cDNA from the *Drosophila melanogaster* white gene. *Nucleic Acids Res.* 18,1633.
- 171.** Pierce B.A. (2004). *Genetics: A Conceptual Approach* (2nd ed.). W.H. Freeman. ISBN978-0-7167-8881-2.
- 172.** Pietrocola F., Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Madeo F., Kroemer G. (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* 21(6):805-21.
- 173.** Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I., Johnson W.G., Ide S.E., Di Iorio G., Sanges G., Stenroos E.S., Pho L.T., Schaffer A.A., Lazzarini A.M., Nussbaum R.L., Duvoisin R.C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science.* 1996;274:1197-9.
- 174.** Poulouse N. & Raju R. (2015). Sirtuin regulation in aging and injury. *Biochim Biophys Acta.* 1852(11):2442-55.
- 175.** Przedborski S., Vila M., Jackson-Lewis V. (2003). Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest.* 111(1):3-10.
- 176.** Rahman M., Nirala N.K., Singh A., Zhu L.J., Taguchi K., Bamba T., Fukusaki E., Shaw L.M., Lambright D.G., Acharya J.K., Acharya U.R. (2014). *Drosophila* Sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase β and regulates complex V activity. *J Cell Biol.* 206(2):289-305.
- 177.** Raina V., Gupta S., Yadav S., Surolia A. (2013). Simvastatin induced neurite outgrowth unveils role of cell surface cholesterol and acetyl CoA carboxylase in SH-SY5Y cells. *PLoS One.* 8(9):e74547.
- 178.** Ramanan V.K. & Saykin A.J. (2013). Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis.* 2(3):145-75.
- 179.** Reibel D.K., Wyse B.W., Berkich D.A., Neely J.R. (1981). Regulation of coenzyme A synthesis in heart muscle: effects of diabetes and fasting. *Am J Physiol.* 240:H606-11.
- 180.** Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research.* 11(6):1114-1125.
- 181.** Requejo-Aguilar R., Bolaños J.P. (2016). Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 100:123-137.
- 182.** Riemensperger T., Isabel G., Coulom H., Neuser K., Seugnet L., Kume K., Iché-Torres M., Cassar M., Strauss R., Preat T., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108,834-839.
- 183.** Riemensperger T., Issa A.R., Pech U., Coulom H., Nguyen M.V., Cassar M., Jacquet M., Fiala A., Birman S. (2013). A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell Rep.* 5,952-960.
- 184.** Rincon-Limas D.E., Jensen K., Fernandez-Funez P. (2012). *Drosophila* models of proteinopathies: the little fly that could. *Curr Pharm Des.* 18:1108-1122.
- 185.** Ristow M. & Schmeisser S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51,327-336.
- 186.** Rival T., Page R.M., Chandraratna D.S., Sendall T.J., Ryder E., Liu B., Lewis H., Rosahl T., Hider R., Camargo L.M., Shearman M.S., Crowther D.C., Lomas D.A. (2009). Fenton chemistry and oxidative stress mediate the toxicity of the beta-amyloid peptide in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 29:1335-1347.

- 187.** Rubin G.M. & Spradling A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*. 218,348-353.
- 188.** Rusten T.E., Cantera R., Urban J., Technau G., Kafatos F.C., Barrio R. (2001). Spalt modifies EGFR-mediated induction of chordotonal precursors in the embryonic PNS of *Drosophila* promoting the development of oenocytes. *Dev*. 128:711-722.
- 189.** Sanchez J., Talamillo A., Gonzalez M., Sanchez-pulido L., Jimenez S., Pirone L., Sutherland J.D., Barrio R. (2011). *Drosophila* Sal and Salr are transcriptional repressors. *Biochem J*. 438,437–445.
- 190.** Sang J.H. (2001). "Drosophila melanogaster: The Fruit Fly". In Eric C. R. Reeve. Encyclopedia of genetics. USA: Fitzroy Dearborn Publishers, l.p.157. ISBN978-1-884964-34-3.
- 191.** Sasamura T., Matsuno K., Fortini M.E. (2013). Disruption of *Drosophila melanogaster* lipid metabolism genes causes tissue overgrowth associated with altered developmental signaling. *PLoS Genet*. 9(11):e1003917.
- 192.** Sau D., De Biasi S., Vitellaro-Zuccarello L., Riso P., Guarnieri S., Porrini M., Simeoni S., Crippa V., Onesto E., Palazzolo I., Rusmini P., Bolzoni E., Bendotti C., Polleti A. (2007). Mutation of SOD1 in ALS: gain of a loss of function. *Hum Mol Genet*. 16:1604–1618.
- 193.** Schraermeyer U. & Dohms M. (1993). Atypical Granules in the Eyes of the White Mutant of *Drosophila melanogaster* Are Lysosome-Related Organelles. *Pigment Cell res*. 6,73-84.
- 194.** Scherzer C.R., Jensen R.V., Gullans S.R., Feany M.B. (2003). Gene expression changes presage neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 12:2457–2466.
- 195.** Sertbaş M., Ulgen K., Cakır T. (2014). Systematic analysis of transcription-level effects of neurodegenerative diseases on human brain metabolism by a newly reconstructed brain-specific metabolic network. *FEBS Open Bio*. 4:542-53.
- 196.** Shapiro S.S., Wilk M.B., Chen H. J. (1968). A comparative study of various tests of normality. *JASA*. 63,1343-1372.
- 197.** Shen Y., Wei W., Zhou D.X. (2015). Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. *Trends Plant Sci*. 20(10):614-21.
- 198.** Shi L., Tu B.P. (2013). Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin CLN3 to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Nat Acad Sci*. 110:7318–23.
- 199.** Shibuya Y., Chang C.C., Huang L.H., Bryleva E.Y., Chang T.Y. (2014). Inhibiting ACAT1/SOAT1 in microglia stimulates autophagy-mediated lysosomal proteolysis and increases Aβ1-42 clearance. *J Neurosci*. 34(43):14484-501.
- 200.** Shieh S.Y. & Bonini N.M. (2011). Genes and pathways affected by CAG-repeat RNA-based toxicity in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*. 20,4810-4821.
- 201.** Shoup J.R. (1966). The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 29,223-249.
- 202.** Shulman J.M. (2015). *Drosophila* and experimental neurology in the post-genomic era. *Experimental Neurology*. 274:4–13.
- 203.** Sitaraman D., Zars M., Laferriere H., Chen Y.C., Sable-Smith A., Kitamoto T., Rottinghaus G.E., Zars T. (2008). Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105,5579-5584.

- 204.** Sivachenko A., Gordon H.B., Kimball S.S., Gavin E.J., Bonkowsky J.L., Letsou A. (2016). Neurodegeneration in a *Drosophila* model of adrenoleukodystrophy: the roles of the Bubblegum and Double bubble acyl-CoA synthetases. *Dis Model Mech.* 9(4):377-87.
- 205.** Smith C.M., Cano M.L., Potyraj J. (1978). The relationship between metabolic state and total CoA content of rat liver and heart. *J Nutr.* 108:854–62.
- 206.** Snijder P.M., Baratashvili M., Grzeschik N.A., Leuvenink H.G., Kuijpers L., Huitema S., Schaap O., Giepmans B.N., Kuipers J., Miljkovic J.L., et al., (2015). Overexpression of cystathionine γ -lyase suppresses detrimental effects of spinocerebellar ataxia type 3. *Mol Med.* 21,758-768.
- 207.** Stark W.S. & Wasserman G.S. (1972). Transient and receptor potentials in the electroretinogram of *Drosophila*. *Vision Res.* 12,1771-1775.
- 208.** Stergiopoulos K., Cabrero P., Davies S.A., Dow J.A. (2009). Salty dog, and SCL5 symporter, modulates *Drosophila* response to salt stress. *Physiol Genomic.* 37:1–11.
- 209.** Sullivan D.T. & Sullivan M.C. (1975). Transport defects as the physiological basis for eye colour mutants of *Drosophila*. *Biochem Genet.* 13,603-613.
- 210.** Sullivan D.T., Bell L.A., Paton D.R., Sullivan M.C. (1979). Purine transport by malpighian tubules of pteridine-deficient eye colour mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet.* 17,565-573.
- 211.** Swardfager W., Lanctôt K., Rothenburg L., Wong A., Cappell J., Herrmann N. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 68(10):930-41.
- 212.** Szutowicz A., Bielarczyk H., Ronowska A., Gul-Hinc S., Klimaszewska-Łata J., Dyś A., Zyśk M., Pawełczyk T. (2014). Intracellular redistribution of acetyl-CoA, the pivotal point in differential susceptibility of cholinergic neurons and glial cells to neurodegenerative signals. *Biochem Soc Trans.* 42(4):1101-6.
- 213.** Tan E.K., Srivastava A.K., Arnold W.D., Singh M.P., Zhang Y. (2015). Neurodegeneration: etiologies and new therapies. *Biomed Res Int.* 272630.
- 214.** Titlow J.S., Rice J., Majeed Z.R., Holsopple E., Biecker S., Cooper R.L. (2014). Anatomical and genotype-specific mechanosensory responses in *Drosophila melanogaster* larvae. *Neurosci Res.* 83,54-63.
- 215.** Tong L., Harwood H.J. Jr. (2006). Acetyl-coenzyme A carboxylases: Versatile targets for drug discovery. *J Cell Biochem.* 99(6):1476–1488.
- 216.** Tong Y., Yamaguchi H., Giaime E., Boyle S., Kopan R., Kelleher R.J. 3rd, Shen J. (2010). Loss of *leucine-rich repeat kinase 2* causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of *alpha-synuclein*, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 25;107(21):9879-84. PMID:20457918.
- 217.** Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B.J., Pachter L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* 28, 511e515. PMID:20436464.
- 218.** Trempe J.F., Sauve V., Grenier K., Seirafi M., Tang M.Y., Menade M., Al-Abdul-Wahid S., Krett J., Wong K., Kozlov G., Nagar B., Fon E.A., Gehring K. (2013). Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science.* 340,1451-1455.
- 219.** Trushina E. & McMurray C.T. (2007). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience.* 145:1233–1248.

- 220.** Tsuchiya Y., Pham U., Hu W., Ohnuma S., Gout I. (2014). Changes in acetyl CoA levels during the early embryonic development of *Xenopus laevis*. *PLoS One*. 9(5):e97693.
- 221.** Tubbs P.K., Garland P.B. (1964). Variations in tissue contents of coenzyme A thio esters and possible metabolic implications. *Biochem J*. 93:550–557.
- 222.** Vilinsky I. & Johnson K.G. (2012). Electroretinograms in *Drosophila*: a robust and genetically accessible electrophysiological system for the undergraduate laboratory. *J Undergrad Neurosci Educ*.
- 223.** Villacampa P., Ribera A., Motas S., Ramírez L., García M., de la Villa P., Haurigot V., Bosch F. (2013). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-induced chronic gliosis and retinal stress lead to neurodegeneration in a mouse model of retinopathy. *J Biol Chem*. 288(24):17631-42.
- 224.** Vives-Bauza C., Zhou C., Huang Y., Cui M., de Vries R.L., Kim J., May J., Tocilescu M.A., Liu W., Ko H.S., Magrane J., Moore D.J., Dawson V.L., Grailhe R., Dawson T.M., Li C., Tieu K., Przedborski S. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107,378-383.
- 225.** Wang D., Tang B., Zhao G., Pan Q., Xia K., Bodmer R., Zhang Z. (2008). Dispensable role of *Drosophila* ortholog of LRRK2 kinase activity in survival of dopaminergic neurons. *Mol Neurodegener*. 3,3.
- 226.** West A.P.Jr, Llamas L.L., Snow P.M., Benzer S., Bjorkman P.J. (2001). Crystal structure of the ectodomain of Methuselah, a *Drosophila* G protein-coupled receptor associated with extended lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:3744–3749.
- 227.** West R.J., Elliott C. J., Wade A.R. (2015). Classification of Parkinson's Disease Genotypes in *Drosophila* Using Spatiotemporal Profiling of Vision. *Sci Rep*. 5,16933.
- 228.** Wiendl H., Elger C., Förstl H., Hartung H. P., Oertel W., Reichmann H., Schwab S. (2015). Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ("Neuroprotection"). *Neurotherapeutics*. 12(2):449-54.
- 229.** Wilcoxon F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bull*. 1,80-83.
- 230.** Wu C.F. & Wong F. (1977). Frequency characteristics in the fly visual system of *Drosophila*. *J Gen Physiol*. 69,705-724.
- 231.** Wu J.S., Luo L. (2006). A protocol for dissecting *Drosophila melanogaster* brains for live imaging or immunostaining. *Nat Protoc*. 1(4):2110-5.
- 232.** Xiao C. & Robertson R.M. (2016). Timing of Locomotor Recovery from Anoxia Modulated by the *white* Gene in *Drosophila*. *Genetics*. 203,787-797.
- 233.** Xu Z., Jung C., Higgins C., Levine J., Kong J. (2004). Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Bioenerg Biomembr*. 36:395–399.
- 234.** Yamamoto S. & Seto E.S. (2014). Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Exp Anim*. 63(2):107-19.
- 235.** Yan M.H., Wang X., Zhu X. (2012). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 62,90-101.
- 236.** Yang H.J., Ratnapriya R., Cogliati T., Kim J.W., Swaroop A. (2015). Vision from next generation sequencing: multi-dimensional genome-wide analysis for producing gene regulatory networks underlying retinal development, aging and disease. *Prog. Retin Eye Res*. 46,1e30.
- 237.** Yi C.H., Pan H., Seebacher J., Jang I.H., Hyberts S.G., Heffron G.J., Vander Heiden M.G., Yang R., Li F., Locasale J.W., Sharfi H., Zhai B., Rodriguez-Mias R., Luithardt H., Cantley L.C.,

- Daley G.Q., Asara J.M., Gygi S.P., Wagner G., Liu C.F., Yuan J. (2011). Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell*. 146:607–20.
- 238.** Yun S.W., Gerlach M., Riederer P., Klein M.A. (2006). Oxidative stress in the brain at early preclinical stages of mouse scrapie. *Exp Neurol*. 201:90–98.
- 239.** Zhang S.D. & Odenwald W.F.(1995). Misexpression of the *white (w)* gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92,5525-5529.
- 240.** Zhang M. (2008). Endocytic mechanisms and drug discovery in neurodegenerative diseases. *Front Biosci*. 13:6086-105.
- 241.** Zhang K., Schrag M., Crofton A., Trivedi R., Vinters H., Kirsch W. (2012). Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease. *Proteomics*. 12, 1261-1268.
- 242.** Zhang X., Yuan X., Zhu W., Qian H., Xu W. (2015). Mini-review SALL4: An emerging cancer biomarker and target. *Cancer Letters*. 357:55–62.
- 243.** Zhu X., Lee H.G., Perry G., Smith M.A. (2007). Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta*. 1772:494–502.
- 244.** Zinke I., Schütz C.S., Katzenberger J.D., Bauer M., Pankratz M.J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J*. 21:6162–6173.
- 245.** Ziviani E., Tao R.N., Whitworth A.J. (2010). *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 107,5018-5023.
- 246.** Zu X., Zhong J., Luo D., Tan J., Zhang Q., Wu Y., Liu J., Cao R., Wen G., Cao D. (2013). Chemical genetics of acetyl-CoA carboxylases. *Molecules*. 18(2):1704-19.

TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS

