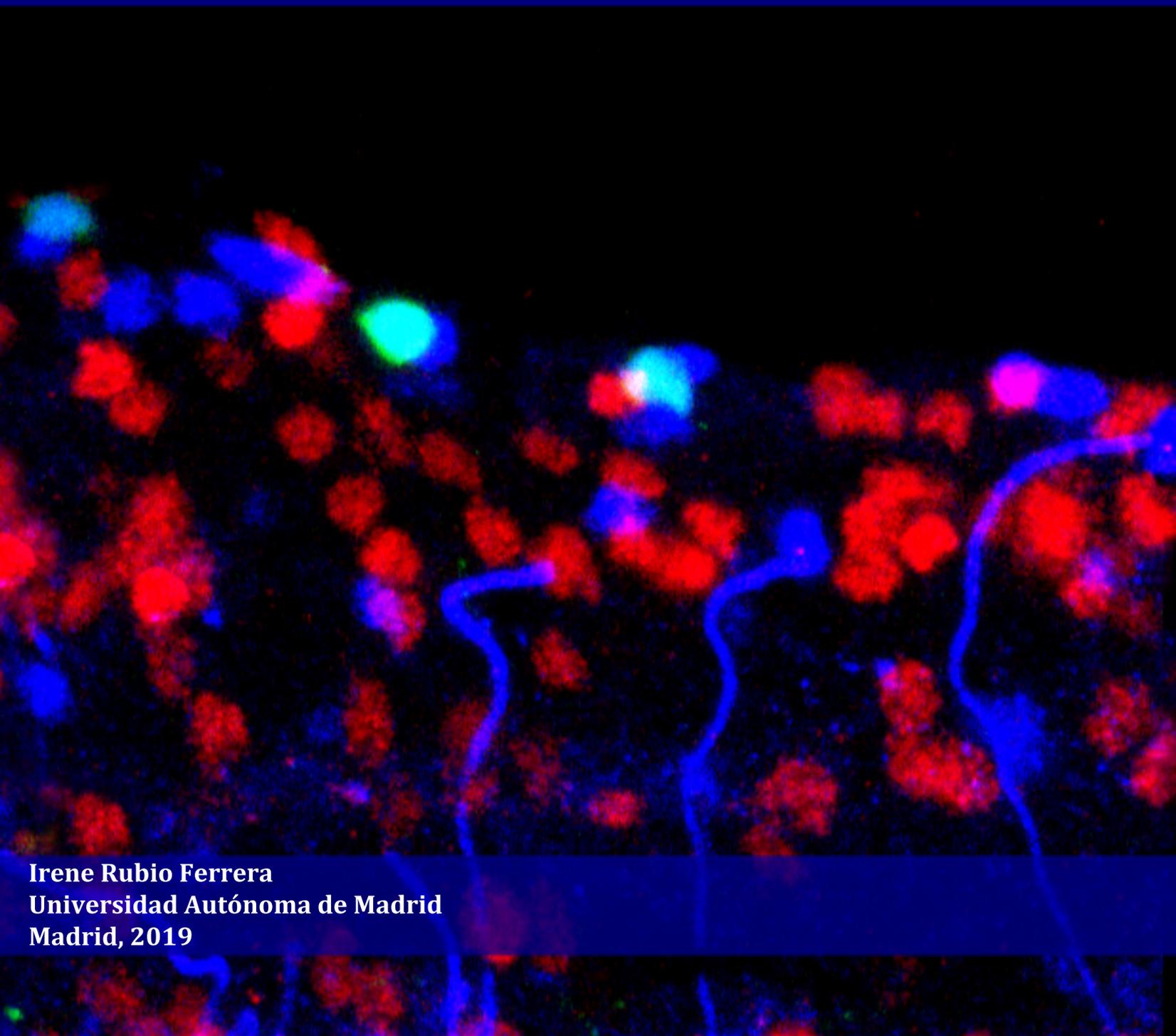




Universidad Autónoma  
de Madrid

Análisis de nuevos mecanismos  
de especificación neuropeptidérgica  
en *Drosophila melanogaster*



Irene Rubio Ferrera  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2019









Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

**Análisis de nuevos mecanismos de  
especificación neuropeptidérgica en  
*Drosophila melanogaster***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

**Irene Rubio Ferrera**

para optar al grado de Doctora en Biología

por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2019

Director:

Dr. Jonathan Benito Sipos



A mis padres  
A mi abuelo Dionisio

*“There's real poetry in the real world. Science is the poetry of reality.”*  
— Richard Dawkins



*“Los hombres deben saber que las alegrías, gozos, risas y diversiones, las penas, abatimientos, aflicciones y lamentaciones proceden del cerebro y de ningún otro sitio. Y así, de una forma especial, adquirimos sabiduría y conocimiento, y vemos y oímos y sabemos lo que es absurdo y lo que está bien, lo que es malo y lo que es bueno, lo que es dulce y lo que es repugnante... Y por el mismo órgano nos volvemos locos y delirantes, y miedos y terrores nos asaltan”.*

Este fragmento del *“Corpus hippocraticum”*, escrito por Hipócrates en la Grecia clásica del siglo V a.C., refleja los siempre osados esfuerzos de la mente por conocerse a sí misma. Aún hoy, 26 siglos después, seguimos intentando entendernos.



## AGRADECIMIENTOS

Soy consciente de que este capítulo de la tesis será la parte favorita para muchos y la más trivial para otros. Por suerte, tengo muchas personas a las que me apetece dar las gracias, así que voy a intentar ser concisa (aunque no prometo nada).

En primer lugar, debo darle las gracias a Jony por haber confiado en mí y haberme acogido en su laboratorio en un momento en el que me encontraba perdida. Gracias por darme la oportunidad de hacer esta tesis, por darme libertad y autonomía y por no haberme negado nunca un favor. Gracias por haberme permitido trabajar en un ambiente humano tan especial y vivir experiencias tan enriquecedoras durante estos cinco años.

En segundo lugar, quiero darle las gracias a la persona que estuvo mano a mano conmigo desde el principio. Hugo, me enseñaste casi todo lo que sé hacer en un laboratorio. Gracias por cada día dentro y fuera de la universidad, por tu generosidad y por tu ayuda.

Por supuesto, no puedo olvidarme de los que más horas han pasado a mi lado durante esta etapa. Los compañeros de laboratorio se acaban convirtiendo en una familia con la que se celebran los éxitos y se lloran las penas. Al fin y al cabo, los científicos somos bichos raros y sólo otros de nuestra especie pueden entender ciertas cosas. Por cada experimento, cada debate, cada palabra de ánimo, cada ataque de risa, cada viaje, cada evento, cada mixto-huevo... Gracias Luis. Gracias Pablo. Sois únicos e inigualables. Un pedacito de esta tesis siempre será vuestro.

Gracias también a cada una de las personas que han pasado por el laboratorio durante estos años: Irene, Patri, Álex, Ricardo, Miguel Ángel, Claudia, Marcos, Félix, Isra, Núria, Sheila, Marta T., Marta P., Sandra, Fran, Heloise, Víctor y Mateo. Ha sido un placer compartir este espacio (y otros un poco menos académicos) con vosotros.

Fuera del mundo mosca, gracias Claudia por escucharme en los momentos de crisis, por ayudarme en cada cosa que has podido, por aconsejarme y, sobre todo, por hacerlo siempre de forma tan generosa y con una sonrisa enorme. Gracias Julia por

entenderme tan bien, por cada abrazo, cada palabra de ánimo, por cada fiesta, por el aquelarre y el tequila. Gracias por ser tan fundamental en mi vida. Gracias por todo, chicas, hubiese sido mucho más difícil sin vosotras.

Quiero darle también las gracias a la UAM, al Departamento de Biología y a cada una de las personas que componen la Unidad de Fisiología Animal: Laura, Yolanda, Isa, Turi, Ana, Marta, Cristina, Alicia, María José y Pilar, porque siempre me habéis hecho sentir que este edificio y este pasillo son mi casa.

En especial, mil gracias a Marta, Laura e Isa. Me enseñasteis a ver la Biología desde un punto de vista diferente y fascinante en el Laboratorio Integrado y sembrasteis la semillita de lo que soy hoy. Sois maravillosas como profesoras, como científicas y como personas. He sido muy afortunada de ser vuestra alumna y, más tarde, de estrenarme en la docencia con vosotras. Laura, gracias por ser tan generosa y humilde, a pesar de ser una de las personas más inteligentes e interesantes que conozco, y por darme una lección de profesionalidad en cada clase.

También quiero darle las gracias muy especialmente a Ana. Llegaste a este pasillo como un terremoto de ilusión y alegría, y nos acabaste inundando a todos. Las palabras se quedan muy cortas para describir lo que has significado para mí durante esta etapa. Gracias por compartir conmigo esa forma tuya tan bonita de ver la vida.

Gracias Turi por enseñarme a ver las cosas desde otro punto de vista, por preocuparte por mí, por tus consejos y por ayudarme siempre que has podido. A veces, no está tan mal tu carencia de filtro.

Más allá de Fisiología Animal, hay otras personas que se merecen un huequito en estas páginas. Gracias Miguel, por tu sinceridad y generosidad, por cada consejo y cada historia. Gracias por recordarme por qué empecé y por animarme a seguir, y por verme, aun cuando pocos lo hacían. Dani, primo por derecho de tiroides, gracias también a ti por aportarme raciocinio y locura a partes iguales, y por tus consejos sobre el RNAseq.

Gracias Nacho, por tu generosa ayuda, tu voluntad y por ser tan buena persona. Ha sido estupendo encontrarte al final de este camino y hablar de Ciencia (y lo que no es Ciencia) contigo. Un trocito de esta tesis también te pertenece.

Los días que pasé en Estados Unidos me regalaron una experiencia vital maravillosa y a gente extraordinaria que no puedo dejar de nombrar. Gracias a Albert Cardona y Marta Zlatic por acogerme y a todas las personas de sus laboratorios, muy especialmente a Becca, Javi y Kathi. Me hicisteis sentir parte de vuestra familia desde el primer día a pesar de estar tan lejos de casa.

Haluk, nunca he conocido a alguien tan inteligente, humilde, buena persona y buen profesor. Gracias por demostrarme que el éxito radica en ayudarse mutuamente. Gracias también a Claire, Jan e Igor por hacer realidad mis ideas locas, prestarme su tiempo y emocionarse con mis proyectos. Gracias a Isa y Dani por portarse tan bien conmigo siempre. Gracias también al resto de integrantes de *Third Floor and Friends* por no dejar que me aburriera ni una sola noche.

*My stay in the United States was a wonderful life experience for me. There, I met such amazing people that I need to name in this section. Thanks to Albert Cardona and Marta Zlatic for your warm welcome, and all their lab members, especially Becca, Javi and Kathi. You made me feel part of your "family" from day one even I was away from home.*

*Haluk, I've never met someone so intelligent, humble, good person and good teacher. Thank you for showing me that success lies in helping each other. Thanks also to Claire, Jan and Igor for making my crazy ideas come true, giving me up their time and getting excited about my projects. Thanks to Isa and Dani for always treating me so well. Finally, thanks to the "Third Floor and Friends" members for not letting me get bored even for a night.*

Jorge, te he dejado para el final porque no sé ni por dónde empezar. Creo que mi experiencia en *Janelia* no hubiera sido lo mismo sin ti. Gracias por apoyarme, animarme, acogerme y enseñarme. Eres un ejemplo a seguir y estoy encantada y orgullosa de considerarte hoy un amigo.

Hablando de amigos, se suele decir de ellos que son la familia que se elige. En mi caso, la *familia* es numerosa, debe ser que tengo muy buen gusto. Gracias Marta, Sandra, Alba, y Andrea, por formar el mejor equipo del mundo. Gracias por ser mis hermanas, por haberme enseñado tanto, por haber compartido momentos tan especiales y por querer de una forma tan sana. Estoy muy orgullosa de lo que hemos

construido. Gracias Josu por cruzarte en mi camino, por estar siempre conmigo y por apoyarme incondicionalmente. Gracias por las historias tan bonitas que he vivido a tu lado. Gracias Adrián y Marina por formar parte de mi vida desde hace tanto tiempo. Sin vosotros, la portada de esta tesis no existiría. Gracias Raquel por escucharme siempre y por hacer que te sienta tan cerca a pesar de estar tan lejos. Gracias Miguel, Álvaro, Asier, Luis... Gracias a todos.

También quiero darle las gracias a mi familia. A mis tíos, primos y a mi recién estrenado *sobrino*. Especialmente, a mis cuatro abuelos, que me han querido hasta el infinito y cuidado como nadie. Me siento muy afortunada de haberos disfrutado. Gracias yaya Adela, por enseñarme que “*si no puedes hacer algo con las manos, hazlo con los dientes, pero hazlo*”. Esa actitud me ha hecho llegar a donde estoy. Gracias yayo Dionisio porque siempre serás mi persona favorita y sé que verme hoy te haría muy feliz.

Finalmente, gracias a mis padres. Gracias por educarme en los valores del esfuerzo y la responsabilidad. Por quererme tanto, apoyarme siempre y buscar lo mejor para mí, aunque no fuera lo mejor para vosotros. Gracias por enseñarme a disfrutar de las cosas y que aprender es bonito. Gracias mamá por ser el ejemplo de mujer fuerte, luchadora y generosa que algún día me encantaría llegar a ser. Gracias papá por tu cariño incondicional, por cada consejo y por cada esfuerzo que has hecho por mí aun cuando no me daba cuenta. Espero que disfrutéis de esta tesis que, en el fondo, es para vosotros, porque probablemente seáis los que más orgullosos estéis de ella.



The Scientist







# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	<b>23</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>33</b>
1. Aspectos generales del desarrollo embrionario.....	35
2. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	37
3. Desarrollo embrionario temprano de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	41
4. El sistema nervioso central de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	44
5. Desarrollo embrionario de la CNV de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	45
5.1. Grupos de equivalencia neural y determinación del NB.....	46
5.2. Diferenciación de NBs equivalentes a lo largo del eje AP.....	49
5.3. División asimétrica del NB y generación de su progenie.....	51
5.4. Establecimiento de la diversidad neural en el linaje del NB.....	54
5.5. Especificación del destino terminal.....	57
6. Sistemas neuropeptidérgicos como modelo para el estudio de la especificación neuronal.....	59
6.1. El neuropéptido Orcokina A.....	60
6.2. El neuropéptido FMRFamida.....	62
7. Helicinas y especificación celular.....	64
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>65</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>69</b>
1. Líneas de <i>D. melanogaster</i> y mantenimiento de las mismas.....	71
2. El sistema Gal4-UAS.....	74
3. Líneas reporteras.....	76
4. Cromosomas balanceadores.....	76
5. Obtención de nuevas líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> .....	77
5.1. Líneas mutantes o portadoras de inserciones en cromosomas diferentes.....	78

5.2. Líneas mutantes o portadoras de inserciones en el mismo cromosoma.....	78
6. Establecimiento de puestas y recolección de embriones.....	80
7. Disección del SNC de embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	81
8. Inmunodetección de marcadores celulares.....	81
9. Disección <i>en filete</i> de larvas de <i>D. melanogaster</i> de estadio III.....	84
10. Preparación del abdomen completo de adultos de <i>D. melanogaster</i> .....	85
11. Preabsorción de anticuerpos.....	85
12. Obtención y análisis de imágenes mediante microscopía láser confocal.....	86
13. Análisis estadístico de los datos.....	86
14. Extracción y secuenciación de ARN.....	87
15. Análisis de la expresión diferencial de genes.....	88
16. Análisis de la ontología génica.....	88
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>

**CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS SECRETORAS DEL NEUROPEPTIDO ORCOKININA A EN LA CNV DE *D. melanogaster*..... 93**

1. Patrón de expresión de la Orcokinina A en los diferentes estadios del desarrollo de la CNV.....	93
2. Proyecciones eferentes de las neuronas orcokininérgicas en la pared abdominal de la larva de estadio III.....	95
3. Proyecciones eferentes de las neuronas orcokininérgicas en el organismo adulto.....	97
4. Identificación del NB progenitor de las neuronas secretoras de Orcokinina A en la CNV.....	99
5. Implicación de los genes temporales en la especificación de las neuronas de Orcokinina A en la CNV.....	102
5.1. Análisis de mutantes de falta de función de los genes temporales.....	103
5.2. Análisis de la sobreexpresión de los genes temporales.....	105
5.3. Análisis del papel de <i>Kr</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	107
6. Implicación de los genes Hox en la especificación de las células de Orcokinina A.....	109

6.1. Análisis de mutantes de falta de función de los genes Hox.....	109
6.2. Análisis de la sobreexpresión de los genes Hox.....	111
6.3. Análisis del papel de <i>Ubx</i> y <i>abdA</i> en la especificación de las neuronas De Orcokinina A.....	115
7. Implicación de la ruta de Notch en la especificación de las células de Orcokinina A.....	117
8. Papel de la muerte celular programada (PCD) en la especificación de las células de Orcokinina A.....	119
9. Implicación de la ruta de BMP en la especificación de las células de Orcokinina A.....	121

**CAPÍTULO II. GENES IMPLICADOS EN LA ESPECIFICACIÓN DE LAS NEURONAS  
SECRETORAS DEL NEUROPEPTIDO ORCOKININA A EN LA CNV DE**

<b><i>D. melanogaster</i></b> .....	<b>125</b>
1. Búsqueda genética dirigida para la identificación de factores implicados en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	125
2. Estudio del papel de Nab como factor selector en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A.....	131
3. Estudio del papel de Tsh como factor selector en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A.....	133
4. Estudio del papel de Vg como factor selector en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A.....	135
5. Estudio de la interacción entre los factores de transcripción Nab, Tsh y Vg en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A.....	137
6. Estudio del papel de la helicasa Mcm5 en la correcta especificación terminal de las células de Orcokinina A.....	140
7. Estudio del papel de la helicasa Mcm5 en la correcta especificación terminal de las células de FMRFa.....	142
8. Análisis de la expresión de los marcadores del <i>cluster</i> de Ap en fondo mutante para el gen <i>Mcm5</i> .....	144

**CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN  
EMBRIONES DE *D. melanogaster* MUTANTES DE FALTA DE FUNCIÓN  
PARA EL GEN *Mcm5***..... **147**

1. Validación del análisis del transcriptoma de los mutantes <i>Mcm5<sup>exc222</sup></i> .....	147
2. Análisis del enriquecimiento de la ontología génica.....	153
3. Análisis de la expresión génica diferencial de factores implicados en axonación y ruta BMP en mutantes para el gen <i>Mcm5</i> .....	155
4. Análisis de la expresión génica diferencial de factores con función helicasa en mutantes para el gen <i>Mcm5</i> .....	157
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>159</b>
1. Orcokinina A como modelo para el estudio de destinos neuropeptidérgico.....	161
1.1. Las neuronas de Orcokinina A nacen del NB 5-3 en una ventana temporal mixta <i>cas-grh</i> .....	162
1.2. Los genes homeóticos <i>Ubx</i> y <i>abdA</i> son fundamentales para la adquisición del destino Orcokinina A en los segmentos A1-A5.....	165
1.3. La ruta de Notch juega un papel determinante en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	167
1.4. La señalización vía TGF- $\beta$ /BMP no es necesaria para la adquisición del destino neuropeptidérgico Orcokinina A.....	168
2. La búsqueda dirigida de genes es una metodología eficiente para la descripción de nuevos factores implicados en la especificación neuronal.....	170
2.1. Nab, Vg y Tsh: cómo construir una neurona leyendo los planos de un ala.....	170
2.2. El papel de <i>Mcm5</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	174
2.3. <i>Mcm5</i> y su relación con la ruta de TGF- $\beta$ /BMP en las células Tv4.....	177
3. El papel de <i>Mcm5</i> en el control de la expresión génica.....	180
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>189</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>217</b>
<b>ANEXO II</b> .....	<b>237</b>
<b>ANEXO III</b> .....	<b>247</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Científicos galardonados con el Premio Nobel (PN) por sus investigaciones utilizando <i>D. melanogaster</i> como organismo modelo.....	38
<b>Figura 2.</b> Ciclo vital de <i>D. melanogaster</i> .....	40
<b>Figura 3.</b> Desarrollo embrionario temprano de <i>D. melanogaster</i> .....	42
<b>Figura 4.</b> Patrón de segmentación del eje AP de <i>D. melanogaster</i> .....	43
<b>Figura 5.</b> Diagrama del corte transversal del embrión de <i>D. melanogaster</i> a medida que avanza la gastrulación.....	45
<b>Figura 6.</b> Determinación del NB dentro del grupo de equivalencia neural mediante inhibición lateral.....	47
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del SNC del embrión tardío de <i>D. melanogaster</i> .....	48
<b>Figura 8.</b> Expresión de los genes Hox en el embrión de <i>D. melanogaster</i> .....	51
<b>Figura 9.</b> Factores implicados en la división asimétrica del neuroblasto y la célula madre ganglionar.....	53
<b>Figura 10.</b> Progresión de los factores temporales durante el desarrollo de la CNV de <i>D. melanogaster</i> .....	56
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática del mecanismo de activación de la ruta de señalización TGF- $\beta$ /BMP.....	59
<b>Figura 12.</b> La Orcokinina A en <i>D. melanogaster</i> .....	61
<b>Figura 13.</b> El <i>cluster</i> de Apterous y su localización en la CNV del embrión tardío de <i>D. melanogaster</i> .....	63
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática del funcionamiento del sistema <i>Gal4-UAS</i> en <i>D. melanogaster</i> .....	75
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática de la obtención de la línea <i>tsh<sup>8</sup>/CD; pros-Gal4/TD</i> de <i>D. melanogaster</i> .....	78
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de la obtención de la línea <i>w;; Mcm5<sup>exc222</sup>, pros-Gal4/TD</i> de <i>D. melanogaster</i> .....	79
<b>Figura 17.</b> Patrón de expresión del neuropéptido Orcokinina A en la CNV de <i>D. melanogaster</i> en diferentes estadios del desarrollo.....	94

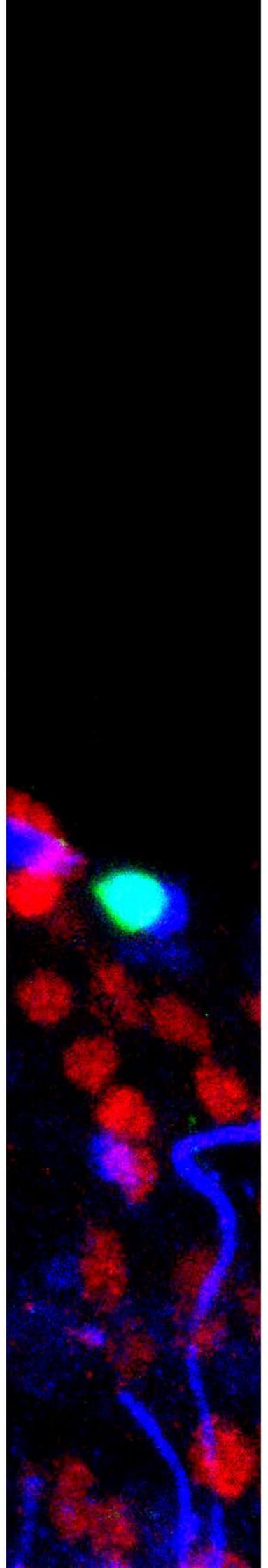
<b>Figura 18.</b> Proyecciones eferentes de las neuronas de Orcokinina A en la pared muscular de la larva de estadio III de <i>D. melanogaster</i> .....	97
<b>Figura 19.</b> Proyecciones eferentes de las neuronas marcadas con GFP en un organismo adulto de <i>D. melanogaster</i> con genotipo <i>Orcokinina-Gal4&gt;UAS-myrGFP</i> .....	98
<b>Figura 20.</b> Estudio de marcadores para la identificación del NB progenitor de las neuronas de Orcokinina A .....	101
<b>Figura 21.</b> Estudio de la identidad temporal de las neuronas de Orcokinina A.....	104
<b>Figura 22.</b> Estudio de la identidad temporal de las neuronas de Orcokinina A.....	106
<b>Figura 23.</b> Estudio del papel postmitótica del gen temporal <i>Kr</i> en la especificación terminal de las neuronas de Orcokinina A .....	108
<b>Figura 24.</b> Efecto de la falta de función de los genes <i>Hox</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A .....	110
<b>Figura 25.</b> Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>Hox</i> a nivel de NB en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	112
<b>Figura 26.</b> Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>Hox</i> a nivel postmitótica en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	114
<b>Figura 27.</b> Efecto de la falta de función y la sobreexpresión conjunta de los genes <i>Ubx</i> y <i>abdA</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	116
<b>Figura 28.</b> Caracterización del papel de la ruta de Notch en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	118
<b>Figura 29.</b> Estudio del papel de la muerte celular programada en la especificación de las neuronas de Orcokinina A .....	120
<b>Figura 30.</b> Caracterización del papel de la ruta de BMP en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	122
<b>Figura 31.</b> Resumen de las categorías fenotípicas encontradas entre los mutantes analizados.....	128
<b>Figura 32.</b> Papel del factor de transcripción <i>Nab</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	132
<b>Figura 33.</b> Papel del factor de transcripción <i>Tsh</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A .....	134
<b>Figura 34.</b> Papel del factor de transcripción <i>Vg</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	136

<b>Figura 35.</b> Representación esquemática de los estudios de epistasia.....	137
<b>Figura 36.</b> Relaciones de epistasia entre los genes <i>nab</i> , <i>tsh</i> y <i>vg</i> en la especificación de las neuronas de Orcokinina A .....	139
<b>Figura 37.</b> Papel del factor de la helicasa Mcm5 en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	141
<b>Figura 38.</b> Papel del factor de la helicasa Mcm5 en la especificación de las neuronas FMRFamidérgicas .....	143
<b>Figura 39.</b> Expresión diferencial de marcadores en el <i>cluster</i> de Ap.....	145
<b>Figura 40.</b> Gráfico de Bland-Altman representativo de las diferencias de expresión génica entre los embriones mutantes para el gen <i>Mcm5</i> y los embriones control.....	148
<b>Figura 41.</b> Distribución de los alineamientos obtenidos tras el análisis de la secuenciación de ARN.....	150
<b>Figura 42.</b> Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento de la ontología génica a nivel de función molecular.....	153
<b>Figura 43.</b> Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis modular de enriquecimiento de la ontología génica.....	154
<b>Figura 44.</b> Distribución de los alineamientos obtenidos tras el análisis de la secuenciación de ARN para el gen <i>tkv</i> .....	156
<b>Figura 45.</b> Modelos de regulación de los factores implicados en el desarrollo del disco de ala y las neuronas de Orcokinina A.....	173
<b>Figura 46.</b> Modelo hipotético de especificación de las neuronas de Orcokinina A.....	177

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Relación de líneas de <i>D. melanogaster</i> utilizadas.....	71
<b>Tabla 2.</b> Relación de cromosomas balanceadores utilizados.....	77
<b>Tabla 3.</b> Relación de anticuerpos primarios utilizados.....	82
<b>Tabla 4.</b> Relación de anticuerpos secundarios utilizados .....	83
<b>Tabla 5.</b> Relación de los 28 genes seleccionados como candidatos de estudio en la búsqueda genética dirigida.....	130
<b>Tabla 6.</b> Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial de la secuenciación de ARN de especímenes con genotipo control y mutante <i>Mcm5<sup>exc222</sup></i> .....	152
<b>Tabla 7.</b> Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial de la secuenciación de ARN para factores implicados en axonación y ruta BMP.....	155
<b>Tabla 8.</b> Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial de la secuenciación de ARN para factores con función helicasa.....	158
<b>Tabla 9.</b> Relación de líneas de <i>D. melanogaster</i> utilizadas en la búsqueda genética dirigida.....	219
<b>Tabla 10.</b> Relación de transcritos que presentan su expresión reducida significativamente en los embriones mutantes <i>Mcm5<sup>exc222</sup></i> con respecto a los controles tras el análisis de los datos de la secuenciación de ARN.....	239
<b>Tabla 11.</b> Relación de transcritos que presentan su expresión aumentada significativamente en los embriones mutantes <i>Mcm5<sup>exc222</sup></i> con respecto a los controles tras el análisis de los datos de la secuenciación de ARN.....	249

RESUMEN/  
ABSTRACT





Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) de *Drosophila melanogaster* se genera un número abrumador de subtipos celulares. De hecho, cada una de las casi 400 células que componen cada hemisegmento de la cuerda nerviosa ventral (CNV) es prácticamente única. Invertebrados y vertebrados parecen compartir los principios comunes de la especificación neuronal, en los cuales las cascadas de factores de transcripción establecen patrones temporales de división en los progenitores, cuyos resultados son modificados posteriormente por las señales espaciales para generar diversidad. Finalmente, códigos combinatorios de factores selectores terminales refinan aún más las características únicas de cada célula.

En esta tesis doctoral se emplean técnicas de genética clásica y de transcriptómica con el objetivo de ahondar en el conocimiento sobre la especificación neuronal.

Por un lado, se han caracterizado los mecanismos básicos de desarrollo de las neuronas del sistema de la Orcokina A estableciéndolo como un interesante modelo para el estudio de la adquisición de destinos terminales neuropeptidérgicos. Se trata de un grupo de 10 neuronas localizadas en los segmentos abdominales A1-A5 de la CNV de *D. melanogaster*. Estas células nacen a partir del neuroblasto (NB) 5-3 en una ventana temporal *castor-grainyhead* (*cas-grh*). Su patrón de expresión a lo largo de la CNV está determinado por los genes homeóticos *Ultrabithorax* (*Ubx*) y *abdominal A* (*abdA*). Asimismo, requieren la ausencia de expresión de *Krüppel* (*Kr*) y la inactivación de la ruta de Notch para su correcta especificación. Además, gracias a una eficiente búsqueda genética dirigida se han identificado más de 60 factores que podrían estar implicados en su cascada selectora terminal. De ellos, se han estudiado tres en mayor profundidad: Nab, Teashirt (Tsh) y Vestigial (Vg), llegando a establecer relaciones jerárquicas de activación entre ellos.

Por otro lado, y utilizando las células FMRFamidérgicas Tv4 como modelo, en esta tesis doctoral se ha descrito el papel de Mcm5 como factor implicado en la especificación neuronal, siendo éste el primer trabajo que otorga esta función a una helicasa replicativa. Los estudios de expresión génica diferencial llevados a cabo a partir de la secuenciación de ARN sugieren que este factor ejerce su función a través de la activación de la ruta de TFG- $\beta$ /BMP.



An overwhelming number of cellular subtypes is generated during the central nervous system (CNS) of *Drosophila melanogaster* development. Each of the nearly 400 cells that compounds a single hemisegment of the ventral nerve cord (VNC) is almost unique. This suggests that invertebrates and vertebrates share the most basic values of neuronal specification. Different transcription factors cues establish division temporal patterns in progenitors, and the results are subsequently modified by spatial signals to generate diversity. Finally, combinatorial cascades of terminal selectors further refine the most unique characteristics of each cell.

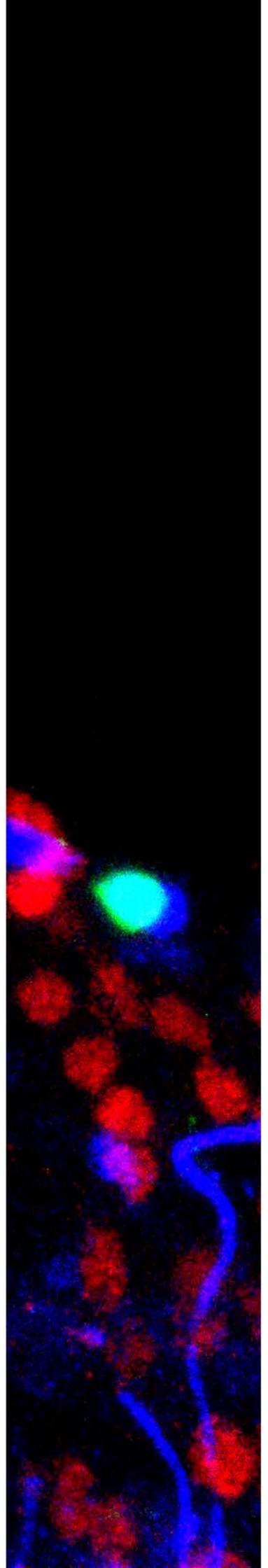
This thesis presents the results of a number of classical genetics and transcriptomic techniques, applied to gain a deep understanding of the neuronal specification rules.

On the one hand, the basic mechanisms of development have been characterized in the Orcokinin A system, turning it into an interesting neuropeptidergic model for new terminal cell fate specification studies. Orcokinin A system consists of 10 neurons located in the VNC of *D. melanogaster*, specifically along the abdominal segments A1-A5. These cells are born from the neuroblast (NB) 5-3 in a temporal mixed window *castor-grainyhead* (*cas-grh*). The homeotic genes *Ultrabithorax* (*Ubx*) and *abdominal A* (*abdA*) determine this expression pattern throughout the VNC. These cells also require the absence of *Krüppel* (*Kr*) expression and the Notch pathway inactivation for their correct specification. In addition, thanks to a very efficient targeted screening, more than 60 transcription factors that could be involved in the terminal selector cascade have been identified. Among these, three of them have been studied in more detail: Nab, Teashirt (Tsh) and Vestigial (Vg), establishing also hierarchical relations of activation between them.

On the other hand, the role of Mcm5 in the specification of neuronal cell fates has been described using the FMRFamideergic Tv4 cells as a model. This study is the first work that confers this function to a replicative helicase. The differential gene expression analysis carried out from RNA sequencing assays suggest that Mcm5 functions through the activation of the TFG- $\beta$ /BMP pathway.



# ABREVIATURAS





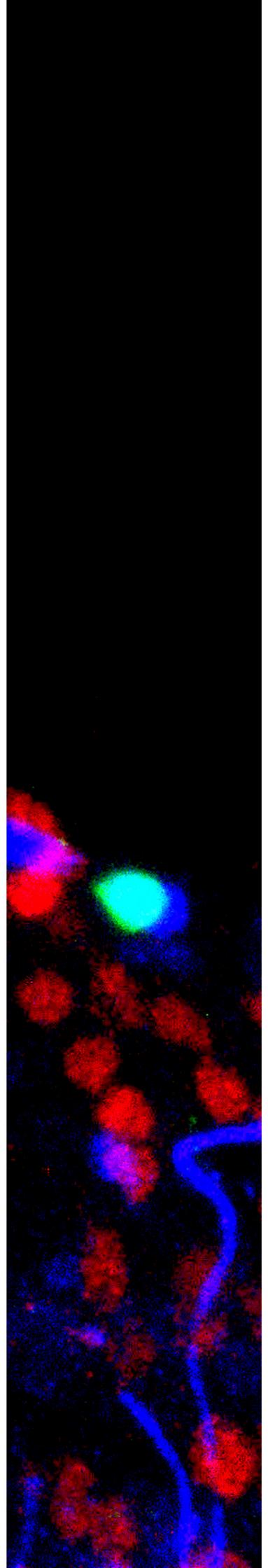
Abreviaturas

---

<b>AbdA</b>	Abdominal A	<b>NB</b>	Neuroblasto
<b>AbdB</b>	Abdominal B	<b>NMJ</b>	Unión neuromuscular
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>PCD</b>	Muerte celular programada
<b>Antp</b>	Antennapedia	<b>PD</b>	Eje proximal-distal
<b>Ap</b>	Apterous	<b>Pdm</b>	POU domain protein 1 y POU domain protein 2
<b>AP</b>	Eje antero-posterior	<b>RPKM</b>	Lecturas por kilobase de transcrito por millón de lecturas de secuencia mapeada
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>Sax</b>	Saxophone
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea	<b>SE2</b>	Células subesofágicas de FMRFa
<b>Cas</b>	Castor	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>CMG</b>	Célula madre ganglionar	<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>CNV</b>	Cuerda nerviosa ventral	<b>Svp</b>	Seven up
<b>Dimm</b>	Dimmed	<b>Tkv</b>	Thickveins
<b>DV</b>	Eje dorso-ventral	<b>Tsh</b>	Teashirt
<b>Eya</b>	Eyes absent	<b>Tv1-4</b>	Células del cluster de Apterous
<b>FMRFa</b>	FMRFamida	<b>UAS</b>	Upstream activation sequence
<b>Gbb</b>	Glass bottom boat	<b>Ubx</b>	Ultrabithorax
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	<b>Vg</b>	Vestigial
<b>Grh</b>	Grainyhead	<b>Wit</b>	Wisful thinking
<b>Hb</b>	Hunchback		
<b>Hox</b>	Genes homeóticos		
<b>Kr</b>	Krüppel		
<b>Mad</b>	Mothers against dpp		
<b>Mcm5</b>	Minichromosome maintenance 5		



# INTRODUCCIÓN





## 1. Aspectos generales del desarrollo embrionario

Durante el desarrollo embrionario, procesos de diferenciación, crecimiento celular y morfogénesis se combinan para generar los diferentes tejidos que forman parte del organismo, con su correcta orientación y dimensión, y en el lugar y momento adecuados.

Todas las células que componen un organismo pluricelular nacen de un progenitor común y, por tanto, comparten la misma información genética. Sin embargo, en un organismo completo la diversidad celular es asombrosa, incluso dentro del mismo tejido, y cada célula es altamente específica en cuanto a la función para la que está diseñada.

Ya en 1892, August Weismann en su teoría del plasma germinal describió cómo, a medida que avanza el desarrollo, ciertos “determinantes” se inactivan o incluso se pierden en las células durante el establecimiento del destino celular. Hoy en día sabemos que la expresión génica varía a lo largo del desarrollo mientras el cigoto se divide para generar un embrión que finalmente se convertirá en un organismo adulto. La regulación de la expresión génica viene determinada principalmente por señales internas y externas que informan a la célula sobre su entorno intra- y extra-celular, respectivamente (Edlund y Jessell, 1999). Estas moléculas de señalización, cruciales para la progresión del desarrollo, a menudo actúan en forma de gradientes de concentración. De esta forma, establecen una identidad espacial. Además, algunas de ellas ya están presentes en el oocito no fertilizado puesto que muestran herencia materna.

Estas señales son detectadas a través de proteínas de adhesión o receptores de membrana que, mediante cascadas de señalización de segundos mensajeros, activan la expresión de determinados factores y co-factores de transcripción. Estas proteínas se unen directamente al ADN y actúan como reguladores transcripcionales (activadores o represores) que promueven una expresión diferencial de genes en la célula que, en último término, conducirán a su correcta especificación (Spemann y Mangold, 2001).

No obstante, y aunque parezca sorprendente, solamente se han caracterizado 11 rutas de señalización celular implicadas de manera fundamental en multitud de

procesos relacionados con el desarrollo embrionario y, además, conservadas a lo largo de la filogenia. Estas rutas se definen en base a su ligando principal o transductores de señal involucrados: Notch, Wnt/Wingless (Wg), Hedgehog (Hh), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ )/proteína morfogenética ósea (BMP), receptor de citoquinas acoplado a tirosina quinasas (JAK-STAT), Hippo, quinasa c-Jun N-terminal (JNK), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) y receptor de ácido retinoico (RAR) (Perrimon *et al.*, 2012).

Además de los factores de transcripción, en este proceso intervienen otras formas de regulación de la expresión génica. Por un lado, la disponibilidad de las regiones promotoras de los genes depende de la actividad de determinadas enzimas que regulan la condensación y descondensación de la cromatina (responsables de los cambios epigenéticos). Por otro, también existen mecanismos postranscripcionales, como el procesamiento de los ARN mensajeros (ARNm) mediante *splicing* alternativo o la inhibición mediante micro ARNs.

Por tanto, a través de los mecanismos anteriormente descritos, el patrón de expresión génica de cada una de las células de un organismo varía a lo largo del desarrollo. Esta activación e inactivación de ciertos genes en el lugar y momento adecuados es crucial para la especificación del destino celular.

Conrad Hal Waddington describió de forma brillante el proceso de adquisición de destino celular durante el desarrollo embrionario con su famosa metáfora del paisaje epigenético o *creodo* (Waddington, 1947). Representa la canalización progresiva de la pluripotencia celular como una canica (la célula) que rueda colina abajo irreversiblemente durante el desarrollo. Las laderas y bifurcaciones que atraviesa simbolizan los factores inductores (genes) que dirigen la canica hacia el final de la colina (destino celular). Una vez que las células están comprometidas a adquirir un determinado destino, son incapaces, en condiciones normales, de revertir su fenotipo y desdiferenciarse para convertirse de nuevo en una célula madre.

Entender el desarrollo de un organismo es, en definitiva, entender los mecanismos moleculares y genéticos subyacentes a esta precisión en la generación,

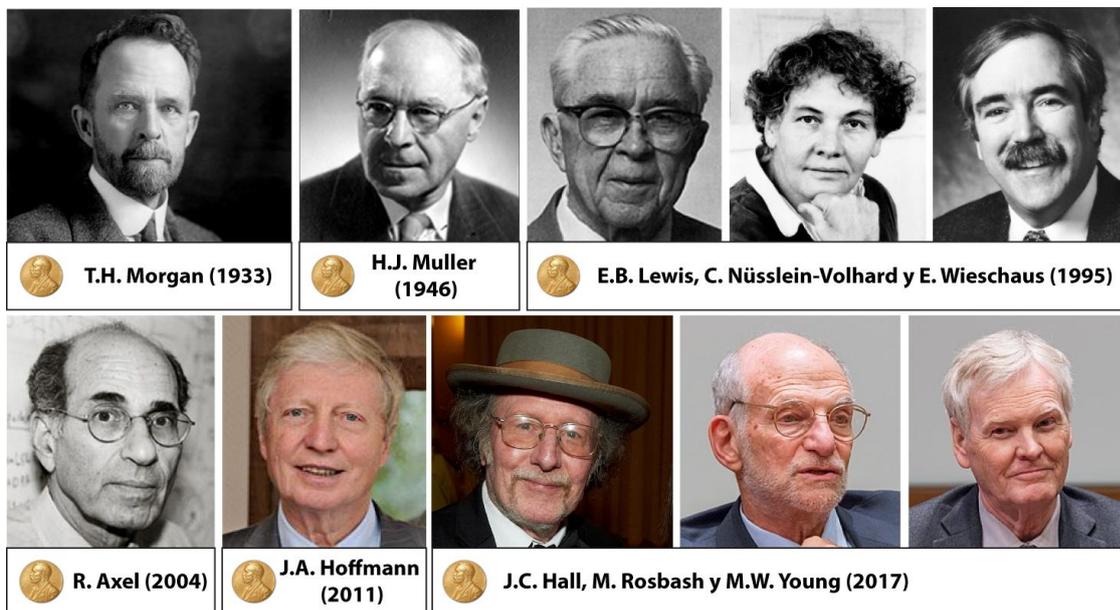
especificación e integración de cada una de sus células. Descubrir cómo las células madre producen una progenie que se diferencia en distintos destinos es fundamental, no sólo para comprender el desarrollo normal de un organismo, sino también para entender distintas situaciones patológicas.

A pesar de los grandes avances científicos de los que hemos sido testigos los últimos años, desentrañar los mecanismos básicos de especificación celular continúa siendo uno de los grandes retos de la Biología del Desarrollo. Para ello, la ciencia hace uso de diferentes organismos modelo que facilitan el estudio de estos procesos tan complejos. Entre los más utilizados destacan *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Mus musculus* y *Drosophila melanogaster*. Este último ha sido el elegido para la realización de los experimentos de este trabajo debido a las ventajosas características que se explican a continuación.

## **2. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo**

Desde hace más de 100 años, *D. melanogaster* está considerada uno de los organismos modelo por excelencia en investigación biológica, especialmente para el estudio del desarrollo y la regulación genética. En 1910, Thomas H. Morgan observó una mosca con ojos blancos entre una población homogénea de ojos rojos. Gracias a este descubrimiento fortuito y a los experimentos posteriores derivados del mismo, consiguió perfeccionar la teoría mendeliana de la herencia otorgando a los cromosomas el papel de portadores del material genético (Morgan, 1911). Desde entonces, *D. melanogaster* ha contribuido significativamente a la comprensión de muchos procesos biológicos generales que tienen lugar en organismos más complejos. Por ejemplo, los genes homeóticos (Hox) fueron descritos y caracterizados por primera vez por Edward B. Lewis en la mosca de la fruta (Lewis, 1978). Más tarde, Christiane Nüsslein-Volhard y Erik Wieschaus utilizaron este mismo modelo para describir los mecanismos genéticos subyacentes al establecimiento de la polaridad segmental y los diferentes niveles de organización espacial del cuerpo (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980).

En 1933, Morgan recibió el Premio Nobel por su trabajo, de la misma forma que lo hicieron Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus en 1995. Hasta hoy se han fallado 6 Premios Nobel en Fisiología o Medicina a favor de un total de 10 científicos por su innovador trabajo basado en la investigación biológica con la mosca de la fruta. El más reciente fue otorgado a Jefferey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young en 2017 por la descripción de los mecanismos moleculares que regulan los ritmos circadianos (Dushay *et al.*, 1990; Vosshall *et al.*, 1994) (ver **Figura 1**).



**Figura 1. Científicos galardonados con el Premio Nobel (PN) por sus investigaciones utilizando *D. melanogaster* como organismo modelo.** En la primera fila, de izquierda a derecha: T. H. Morgan (PN 1933 por el papel de los cromosomas en la herencia); H. J. Muller (PN 1946 por el uso de la radiación X para el incremento de la tasa de mutación); y E. B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard y E. Wieschaus (PN 1995 por el control genético del desarrollo embrionario). En la segunda fila, de izquierda a derecha: R. Axel (PN 2004 junto a L. B. Buck por la organización del sistema olfativo); J. A. Hoffman (medio PN 2011 junto a B. A. Beutler por la activación de la inmunidad innata, compartido con R. M. Steinman por el descubrimiento de las células dendríticas y su papel en el sistema inmunitario adaptativo); y J. C. Hall, M. Rosbash y M. W. Young (PN 2017 por los mecanismos moleculares que gobiernan los ritmos circadianos).

Actualmente, *D. melanogaster* se considera un organismo modelo de gran utilidad y versatilidad para el estudio de muchos procesos biológicos básicos implicados en el desarrollo, el comportamiento y determinadas enfermedades. Es innegable que las técnicas de investigación actuales y los nuevos modelos basados en la pluripotencia

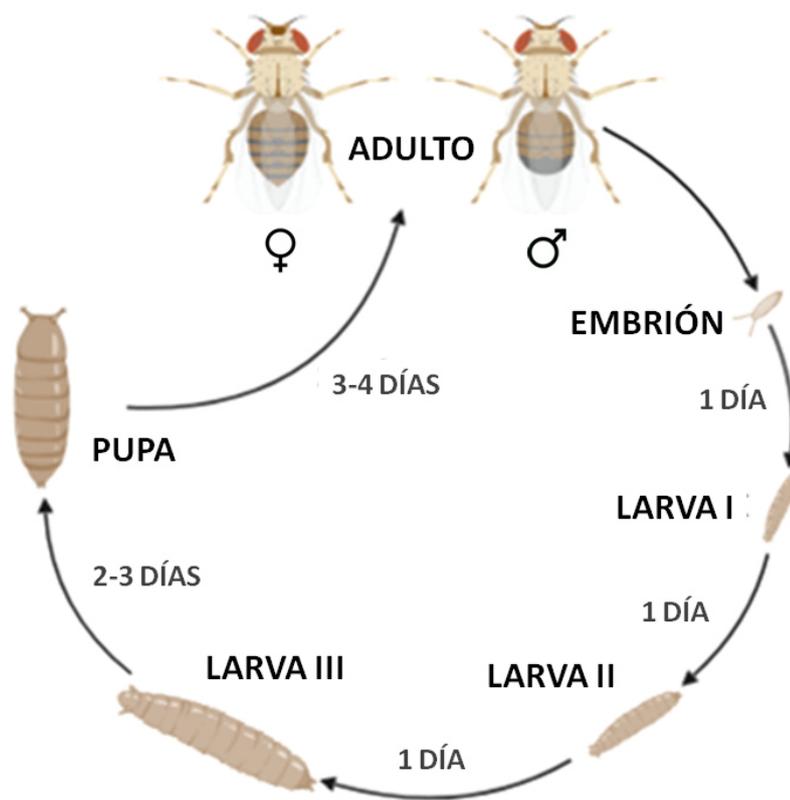
inducida han supuesto una revolución. Por ejemplo, la diferenciación celular a partir de células madre pluripotentes (Takahashi y Yamanaka, 2006; Chambers *et al.*, 2009) y la generación de organoides humanos (Sato *et al.*, 2009; Chuye *et al.*, 2018) han emergido con fuerza en los últimos 15 años. No obstante, estos sistemas siguen representando condiciones artificiales de estudio que no pueden imitar en ningún caso la complejidad del contexto de un organismo vivo. Por tanto, su capacidad de reproducir y explicar mecanismos está aún limitada y no son comparables a la utilización de un organismo modelo *in vivo*.

Uno de los aspectos más interesantes de este organismo es el tamaño relativamente pequeño de su genoma, que se traduce en una redundancia genética menor que en otros modelos. Se le atribuye un contenido de aproximadamente 14.000 genes codificantes, siendo esta cantidad de 25.000 en el genoma humano (Celniker y Rubin, 2003). La sencillez de su genoma también se refleja en el número de cromosomas que posee, tan solo cuatro pares (tres pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales). Sin embargo, como muestra del alto grado de conservación durante la evolución, aproximadamente el 50% de las proteínas de la mosca tienen ortólogos en mamíferos. A este respecto, resulta especialmente interesante que más del 75% de los genes relacionados con enfermedades humanas presentan un origen evolutivo común y comparten la misma función en *D. melanogaster* (Bernards y Hariharan, 2001; Bier, 2005; Yamamoto *et al.*, 2014). Por ello es ampliamente utilizada como modelo para estudiar diferentes funciones fisiológicas humanas y sus alteraciones, por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas (Kong *et al.*, 2018), la adicción al alcohol (Devineni y Heberlein, 2013), la hematopoyesis (Ghosh *et al.*, 2015) o el cáncer (Landskron *et al.*, 2018).

Por otro lado, y debido también a la sencillez de su genoma, numerosas herramientas genéticas, desde las más clásicas hasta las más actuales, son utilizadas de forma rutinaria y sencilla en *D. melanogaster*. Algunas de ellas permiten introducir mutaciones en posiciones concretas del genoma, como los elementos P (Serano *et al.*, 1994), las integrasas *phiC31* (Maharjan *et al.*, 2018), las nucleasas activadoras de la transcripción (TALENs) (Lee, H. B. *et al.*, 2015), o las nucleasas de secuencias palindrómicas repetidas inversas (CRISPR/Cas9) (Bassett *et al.*, 2013). También es posible integrar genes ectópicos de otras especies, por ejemplo, aquellos relacionados

con enfermedades humanas, o proteínas reporteras asociadas a fluorocromos para el marcaje de diferentes estructuras o tipos celulares.

Dentro de los aspectos ventajosos del uso de este organismo modelo destaca su pequeño tamaño, que permite mantener una gran cantidad de individuos en poco espacio. Además, su tiempo de generación es de tan solo 10 días a 25 °C (ver **Figura 2**), de forma que en un corto periodo de tiempo se pueden generar las líneas genóticas de interés y analizar un gran número de individuos.



**Figura 2. Ciclo vital de *D. melanogaster*.** Este ciclo tiene una duración de 10 días a 25 °C. Consta de una fase embrionaria (22 horas), tres estadios larvarios (5 días) y, finalmente, la formación de una pupa (4 días), de la que emergerá el adulto tras la eclosión. Figura creada con *BioRender.com*.

Asimismo, es un animal con un bajo coste de mantenimiento, que presenta numerosos marcadores genéticos visibles y que no necesita técnicas de manipulación complejas.

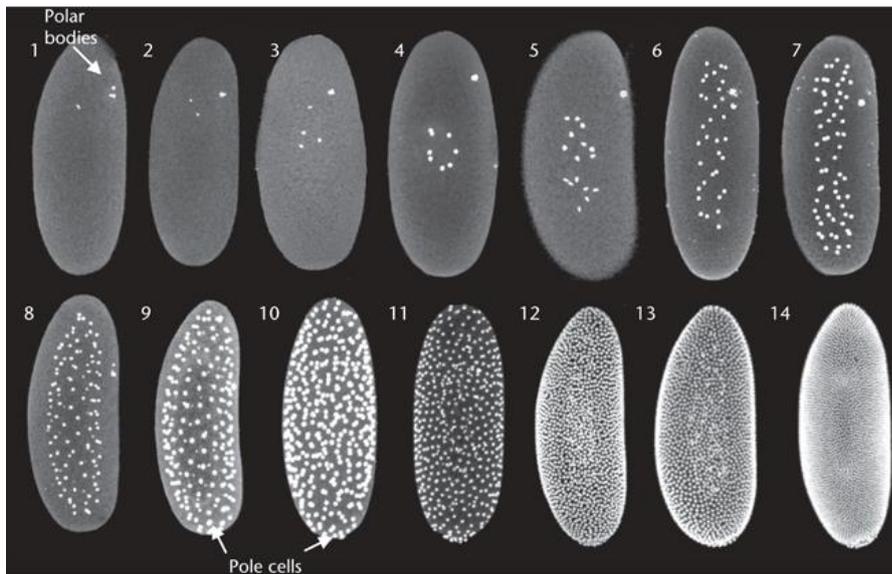
Todas estas características hacen de *D. melanogaster* un organismo modelo ideal y con gran potencial para la investigación en el campo de la Biología.

### 3. Desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*

El desarrollo embrionario de *D. melanogaster* es un proceso relativamente rápido que tiene una duración completa de 22 horas a 25 °C. En este tiempo, el huevo recién fertilizado alcanza sucesivamente los diferentes estadios embrionarios establecidos según los criterios de J.A. Campos Ortega y V. Hartenstein hasta convertirse en una larva (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

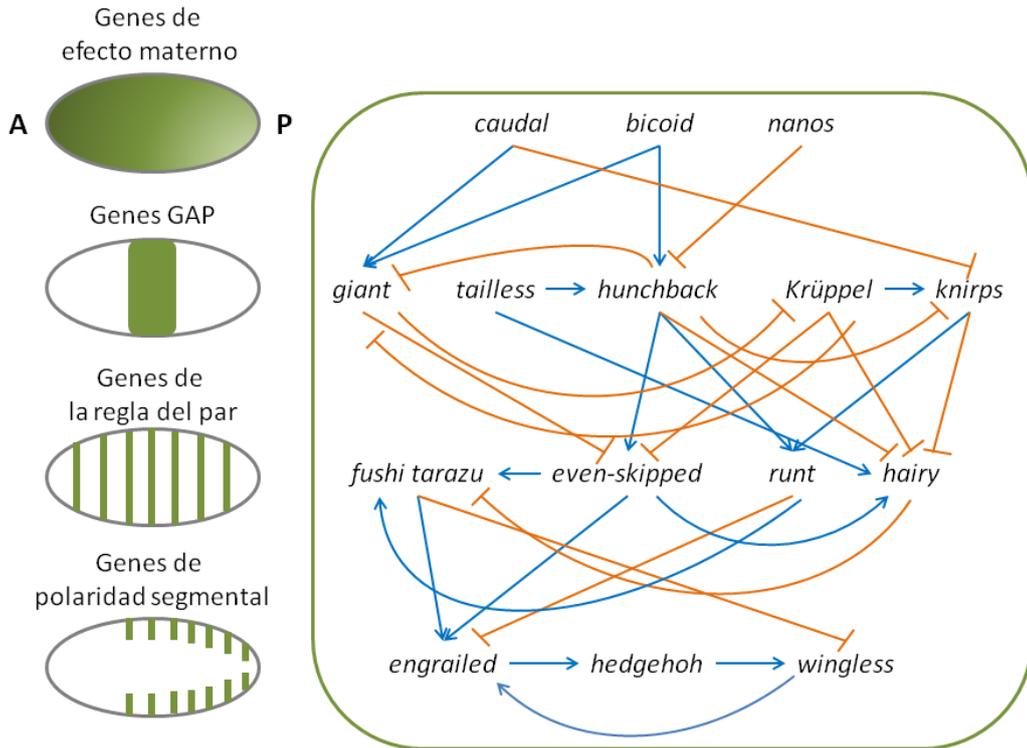
Dado su alto nivel de descripción, se trata de un sistema utilizado comúnmente para el estudio de la embriogénesis. Además, los embriones de *D. melanogaster* son transparentes, lo que facilita su utilización para estudios de microscopía. Éstos alcanzan incluso la resolución de célula única, ya sea mediante inmunohistoquímica en tejido fijado como mediante imagen *in vivo* de organismos transgénicos que expresan marcadores fluorescentes.

El desarrollo embrionario comienza tras la fertilización del oocito con la fusión de los pronúcleos masculino y femenino. El entonces embrión sufre 13 rondas de división sincronizadas que originan un blastodermo sincitial. Este proceso tiene una duración aproximada de 2 horas, puesto que cada ciclo celular se completa en 8-10 minutos. Los núcleos se mantienen en el centro del embrión durante las primeras 9 divisiones para posteriormente migrar hacia la superficie. Durante el ciclo de división número 10, entre 34 y 37 núcleos se diferencian como células polares en la parte más posterior del embrión. Éstos darán más tarde lugar a la línea germinal. Durante el último ciclo de divisiones, la membrana plasmática se invagina y los núcleos se celularizan formando una monocapa que cubre todo el huevo. Esta etapa se conoce como blastodermo celular. Finalmente, los movimientos de gastrulación dan lugar a la formación de las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Gilbert, 2000; Kotadia *et al.*, 2010) (ver **Figura 3**).



**Figura 3. Desarrollo embrionario temprano de *D. melanogaster*.** Durante este periodo tienen lugar 13 divisiones sincrónicas en un sincitio común (blastodermo sincitial). Las 9 primeras se desarrollan en el centro del embrión. Posteriormente, los núcleos migran a la superficie, donde se produce su celularización al finalizar el ciclo de división número 13 (blastodermo celular). Tomada de (Kotadia *et al.*, 2010). Para obtener información complementaria sobre el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, consultar los vídeos contenidos en el código QR (Tomer *et al.*, 2012).

Previo a la formación del blastodermo sincitial, el desarrollo embrionario está controlado por factores de herencia materna que se establecen en forma de gradientes a lo largo del eje antero-posterior (AP). Estos factores controlan el patrón de segmentación de las diferentes zonas del embrión en desarrollo: Bicoid (Bcd) en la segmentación de la cabeza y el tórax; Nanos (Nos) en los segmentos abdominales; y Caudal (Cad) en los segmentos posteriores (Lawrence, 1992). La acción inicial de estos factores de herencia materna inicia una cascada de factores de transcripción que implica la activación de los genes gap, los genes de la regla del par, los genes de polaridad segmental y, finalmente, los genes Hox. Estos, a su vez, subdividen y especifican aún más el eje AP en diferentes segmentos (Castelli-Gair Hombría y Bovolenta, 2016) (ver **Figura 4**).



**Figura 4. Patrón de segmentación del eje AP de *D. melanogaster*.** La segmentación del embrión es iniciada por los genes de herencia materna. Éstos regulan la expresión de los genes gap, los cuales controlan la expresión de los genes de la regla del par. Estos últimos regulan los genes de polaridad segmental. Esta jerarquía y las interacciones de activación (flechas azules) y represión (flechas naranjas) entre los diferentes factores de transcripción coordinan finalmente el patrón de segmentación del eje AP (Perrimon *et al.*, 2012).

El patrón de segmentación del eje dorso-ventral (DV) también se especifica durante el desarrollo embrionario temprano. En este caso, una compleja interacción entre varios factores, que actúan como factores de transcripción, ligandos y receptores, crean un gradiente de la proteína Dorsal (DI) a lo largo del eje DV. Los niveles de esta proteína son más elevados en la zona ventral y se diluyen progresivamente hacia la zona dorsal. De esta forma, se determina una subdivisión gradual del embrión en diferentes capas: el mesodermo ventral, el mesodermo dorsal, el neuroectodermo, la epidermis y la amnioserosa (Castelli-Gair Hombría y Bovolenta, 2016).

#### 4. El sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*

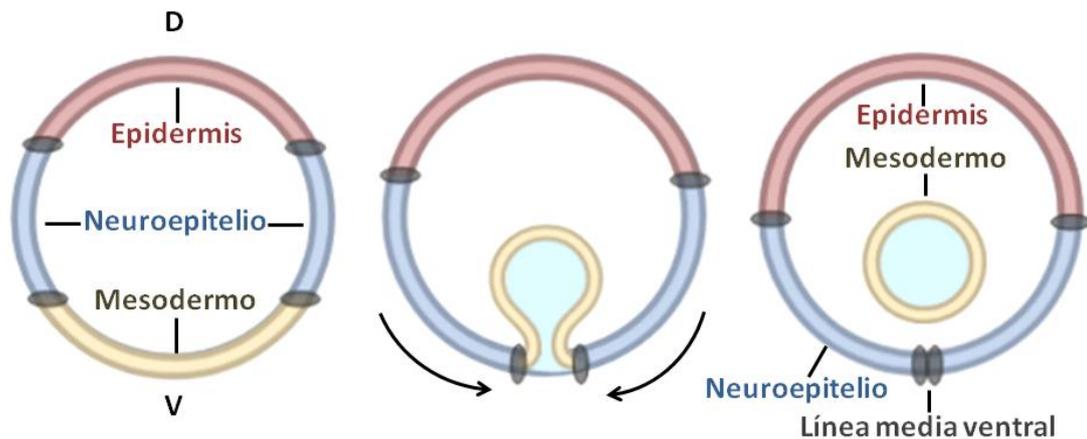
Si bien la especificación celular es, en general, un arduo proceso, encontramos el máximo nivel de complejidad en las células del Sistema Nervioso Central (SNC). Se estima que el SNC humano está compuesto por aproximadamente 100 billones de células. Solamente en el cerebro, podemos encontrar 100.000 millones de neuronas y cada una de ellas establece, de media, entre 1.000 y 10.000 contactos sinápticos. Teniendo esto en cuenta, se calcula que existen unos 10.000 subtipos celulares diferentes, es decir, que prácticamente cada célula de este sistema es única y diferente (Muotri y Gage, 2006).

Precisamente esta diversidad, la mayor teniendo en cuenta los distintos órganos animales, constituye la base de las complejas funciones que residen en este sistema y su inmensa capacidad para procesar información (Urbach y Technau, 2004). Por todo ello, uno de los retos fundamentales de la Neurobiología del Desarrollo continúa siendo el entendimiento de los mecanismos por los cuales se establece esta enorme diversidad celular durante el desarrollo embrionario.

Afortunadamente, tenemos a nuestra disposición modelos menos complejos que han sido extremadamente útiles para desentrañar distintos mecanismos asociados a esta generación de diversidad. Es el caso de *D. melanogaster*, cuyo SNC se compone únicamente de 300.000 neuronas. La estructura de su SNC puede dividirse en 3 regiones claramente diferenciadas: el cerebro, compuesto por 3 segmentos cefálicos (B1-B3); el ganglio subesofágico, formado por 3 segmentos subesofágicos (SE1-SE3); y la cuerda nerviosa ventral (CNV), la cual contiene 3 segmentos torácicos (T1-T3) y 9 segmentos abdominales (A1-A9) (Technau *et al.*, 2006). La CNV, homóloga a la médula espinal de vertebrados, se utiliza clásicamente como modelo principal para los estudios del desarrollo del sistema nervioso debido a su relativa sencillez con respecto al cerebro. Uno de los aspectos más destacables es que está formada por la repetición de unidades anatómicas equivalentes, conocidas como neurómeros (que a su vez se dividen en dos hemineurómeros simétricos), que sufren modificaciones a lo largo del eje AP para adquirir diferentes identidades funcionales (Benito-Sipos *et al.*, 2013).

## 5. Desarrollo embrionario de la CNV de *Drosophila melanogaster*

El SNC de *D. melanogaster* se desarrolla a partir del neuroectodermo, que se localiza en la región ventro-lateral del embrión, dividido en dos regiones simétricas separadas por el mesodermo. La invaginación del mesodermo durante la gastrulación permite la fusión del neuroectodermo en la región ventral, coincidiendo el punto de unión con la línea media ventral del embrión (Mizutani y Bier, 2008; Castelli-Gair Hombría y Bovolenta, 2016) (ver **Figura 5**).



**Figura 5. Diagrama del corte transversal del embrión de *D. melanogaster* a medida que avanza la gastrulación.** El mesodermo (amarillo) se invagina, lo que resulta en la unión de los dos dominios neuroectodérmicos laterales (azul) y la formación de la línea media ventral del embrión en el punto de fusión. Figura creada con *BioRender.com*.

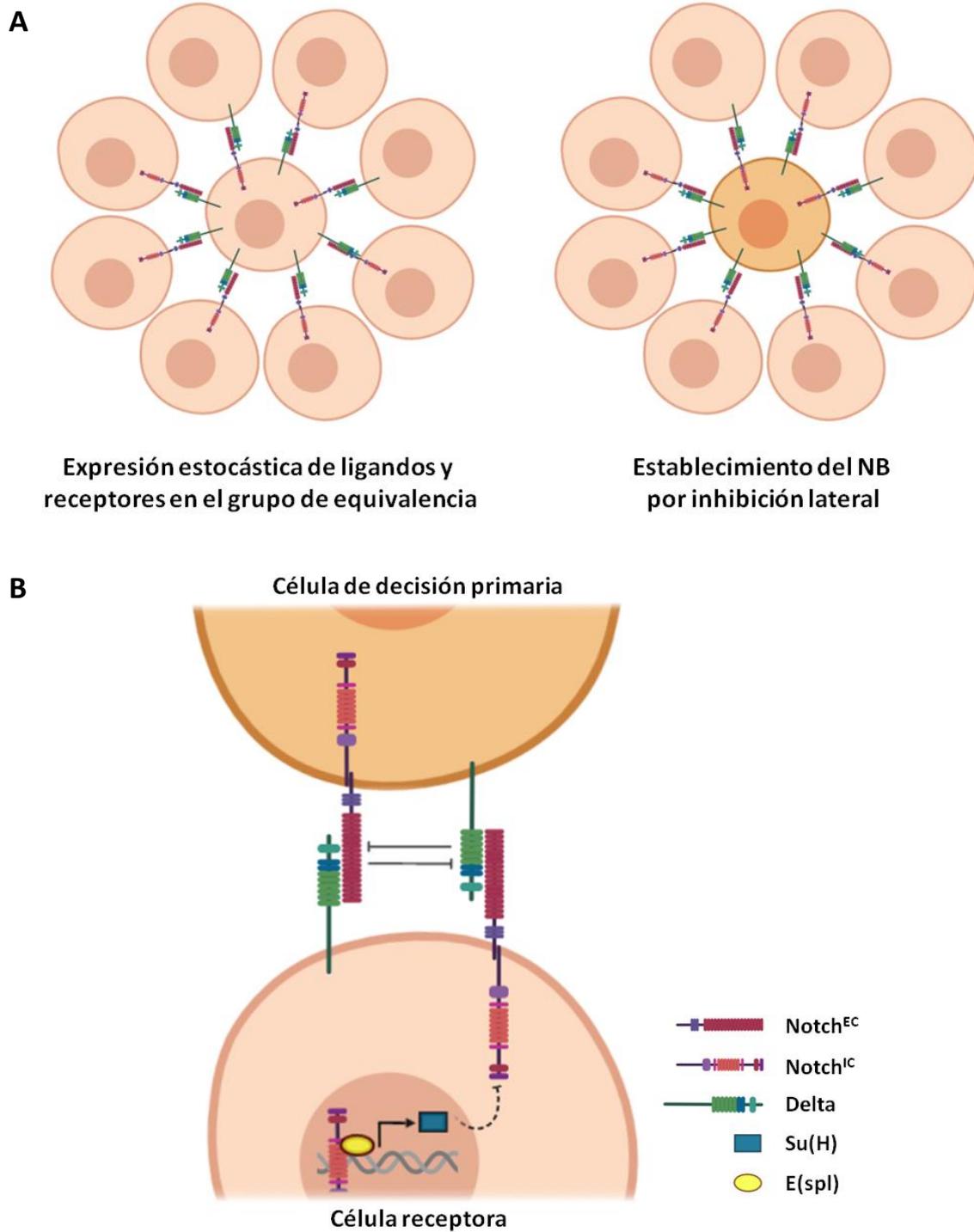
En este momento, el neuroectodermo inicia un proceso de compartimentación, al igual que el resto del embrión. Como se ha explicado anteriormente, resulta fundamental el establecimiento de los ejes AP y DV en base a la expresión en forma de gradientes de diferentes genes. Concretamente en el neuroectodermo, el eje AP se define por el patrón de expresión de los genes *gap*, los genes de la regla del par y, finalmente, los genes de polaridad segmental. En cambio, el eje DV depende mayoritariamente de la expresión de los genes columnares (Urbach y Technau, 2008). De esta forma, cada hemineurómero se subdivide dando lugar a una cuadrícula ordenada mediante un sistema de coordenadas cartesianas (Maurange y Gould, 2005). En ella, grupos de 5 ó 6 células compartirán la misma información posicional, es decir, presentarán el mismo nivel de expresión de genes de polaridad segmental y

genes columnares. Estos conjuntos celulares reciben el nombre de grupos de equivalencia neural. Solamente una de las células que componen cada grupo se desarrollará como progenitor neural o neuroblasto (NB). El resto se diferenciarán como células epidérmicas o se mantendrán indiferenciadas (McDonald *et al.*, 1998; Skeath, J. B., 1999; Skeath, James y Thor, 2003).

### 5.1. Grupos de equivalencia neural y determinación del NB

La elección de qué célula se desarrollará como NB depende de la expresión de los genes proneurales *acheate* (*ac*), *scute* (*sc*) y *lethal of scute* (*l'sc*), los cuales se expresan en todas las células del grupo de equivalencia. Estos codifican para factores de transcripción de tipo *Helix Loop Helix binding* (bHLH) que actúan formando un complejo denominado Achaete-Scute Complex (AS-C). La función principal de este complejo es la activación de la ruta de señalización de Notch. Esta vía controla el destino de las células que se encuentran en proceso de diferenciación mediante diferentes mecanismos, en este caso, mediante inhibición lateral.

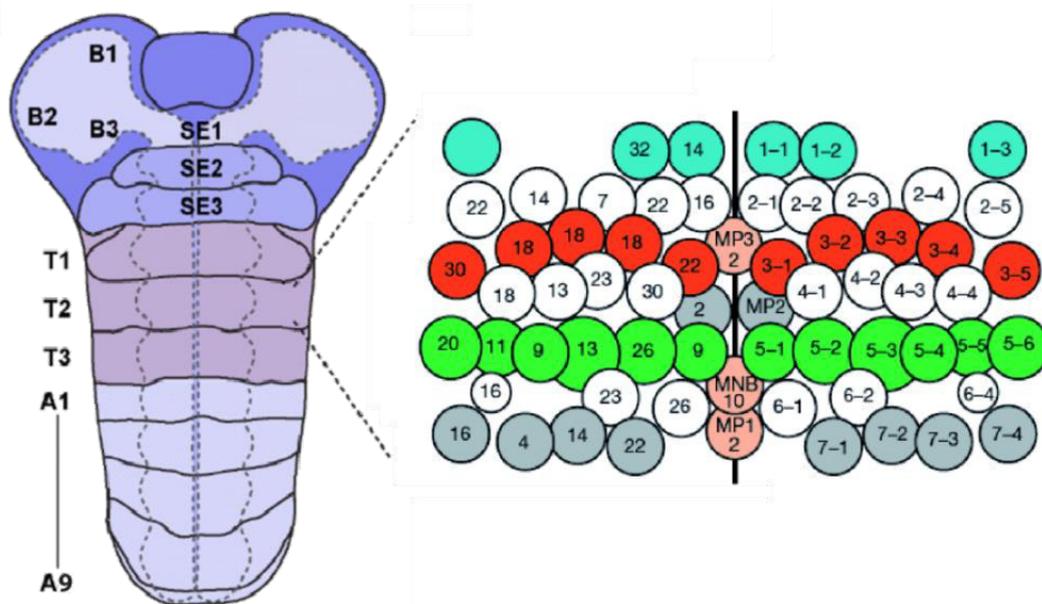
Según este mecanismo, una célula ubicada dentro de un grupo de células en estado de desarrollo y especialización equivalentes, y con una localización específica, actúa como célula de decisión primaria y evita que sus vecinas sigan la misma ruta de diferenciación (Greenwald, 1998; Skeath, James y Thor, 2003). En la célula de decisión primaria, el ligando Delta (Dl) activa el receptor transmembrana Notch de la célula receptora adyacente. Tras esta interacción, se libera el dominio intracelular de Notch (Notch<sup>IC</sup>) en la célula receptora, el cual forma un heterodímero con el factor de transcripción *Suppressor of hairless* (Su(H)). Su(H) se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes específicos en la célula receptora estimulada y, a su vez, del complejo *Enhancer of split* (*E(spl)-C*), que inhibe la expresión de los genes proneurales (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Mumm y Kopan, 2000; Bivik *et al.*, 2016). De esta forma, se dirige a la célula receptora a una diferenciación distinta a la de la célula de decisión primaria. Por su parte, la represión de los genes proneurales en la célula receptora impide la señalización de Notch vía Dl en la célula de decisión primaria, la cual se especifica como el NB de su grupo de equivalencia (ver **Figura 6**).



**Figura 6. Determinación del NB dentro del grupo de equivalencia neural mediante inhibición lateral. (A)** Inicialmente, todas las células del grupo de equivalencia expresan Delta (DI) y Notch. Mediante cambios estocásticos se produce un desbalance que genera una asimetría en la expresión de estos factores. La célula central expresa mayores niveles de DI convirtiéndose en una célula de decisión primaria y ejerciendo un mecanismo de inhibición lateral sobre las células adyacentes. Esta célula se determinará como el NB del grupo de equivalencia. **(B)** La asimetría entre la célula de decisión primaria y las células receptoras se establece mediante retroalimentación negativa. DI es inhibido en la célula receptora mediante el complejo E(spl), cuya transcripción es activada gracias al complejo Su(H). Figura creada con *BioRender.com*.

Al principio, todas las células de cada grupo de equivalencia comienzan expresando los mismos niveles de genes proneurales, lo que provoca una activación generalizada de la ruta de Notch. De esta forma, se produce una competencia entre las células del grupo de equivalencia, donde la célula que presente mayor expresión de genes proneurales y menor activación de la ruta de Notch se especificará como NB. Una vez determinados los NBs de cada grupo de equivalencia neural, durante los estadios embrionarios 8 a 11, se producen 5 oleadas de delaminación (S1-S5) en las que estos NBs abandonan el neuroectodermo para ocupar posiciones subectodérmicas concretas. Este proceso sigue un patrón reproducible, ya que cada NB lo hace en el momento determinado (Maurange y Gould, 2005).

Finalmente, en cada hemineurómero se localizan un número casi invariable de 30 NBs, cada uno de ellos con una identidad única basada en su posición y, por tanto, en su expresión génica (Skeath, J. B. y Carroll, 1992; Doe, 1992). Estos NBs forman un patrón de filas y columnas en cada hemineurómero particular, lo que determina su nomenclatura (ver **Figura 7**).



**Figura 7. Representación esquemática del SNC del embrión tardío de *D. melanogaster*.** El SNC se divide en 3 segmentos cefálicos (B1-B3), 3 segmentos subesofágicos (SE1-SE3), 3 segmentos torácicos (T1-T3) y 9 segmentos abdominales (A1-A9). Se observa la disposición de los 60 NB que componen cada segmento de la CNV, así como su nomenclatura en función de la fila y columna que ocupan (hemisegmento derecho) y el tamaño de su linaje (hemisegmento izquierdo). MP: precursor de la línea media; MNB: neuroblasto medio. Modificada de (Urbach y Technau, 2008) y de (Benito-Sipos *et al.*, 2013).

Por ejemplo, el NB5-6T está ubicado en la fila 5 y columna 6 de un hemineurómero torácico. Por otro lado, el NB5-6A corresponde a su equivalente en un hemineurómero abdominal. Estos dos NBs presentarán una expresión génica muy parecida debido a su identidad posicional equivalente y, por tanto, darán lugar a un linaje de células muy similar, pero no idéntico.

## 5.2. Diferenciación de NBs equivalentes a lo largo del eje AP

La ubicación de los NBs en una posición determinada dentro de las coordenadas establecidas en cada hemineurómero dota a los mismos de identidad espacial. No obstante, en el desarrollo diferencial de los diferentes NBs equivalentes a lo largo del eje AP, juegan un papel fundamental los genes Hox (Urbach *et al.*, 2006; Gabilondo *et al.*, 2018).

Los genes Hox comprenden un grupo de factores de transcripción altamente conservados en la evolución que desempeñan un papel fundamental, tanto en el establecimiento de la identidad segmental como en la generación de diversidad celular durante el desarrollo (Lewis, 1978; Estacio-Gómez y Díaz-Benjumea, 2014).

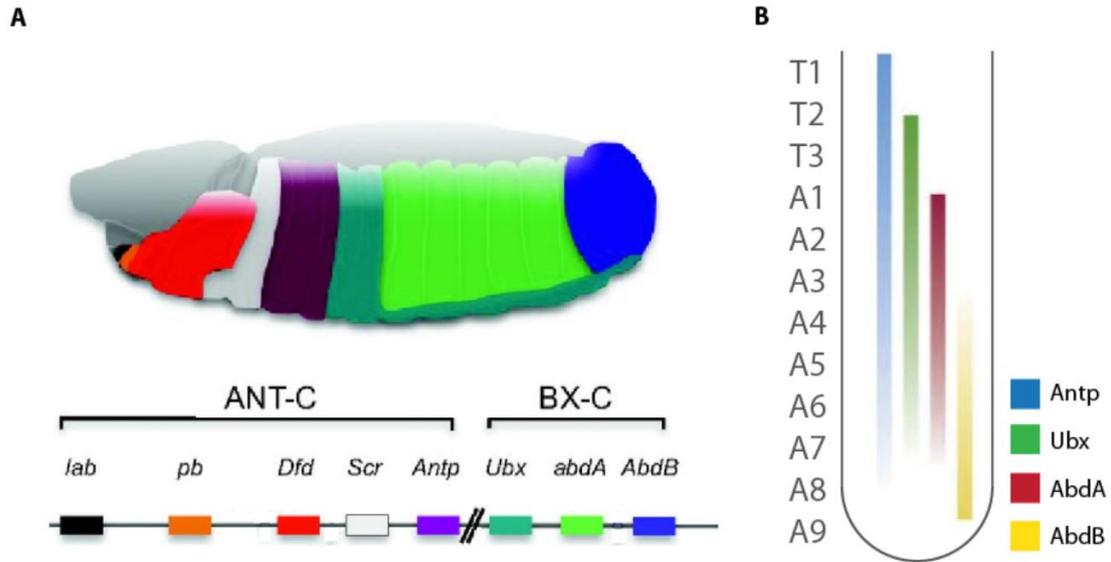
En *D. melanogaster*, los genes Hox se encuentran en el cromosoma III formando dos grandes complejos génicos: el complejo *Antennapedia* (*Antp-C*) y el complejo *Bithorax* (*Bx-C*). El *Antp-C* incluye los genes *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*); mientras que el *Bx-C* contiene los genes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) y *Abdominal B* (*AbdB*) (Miller *et al.*, 2001) (ver **Figura 8A**). En vertebrados existen 38 genes Hox, organizados en 4 complejos diferentes: *Hox-a/1*, *Hox-b/2*, *Hox-c/3* y *Hox-d/4*, que surgieron mediante la duplicación de genes a partir de un único complejo ancestral (Krumlauf, 1994).

A nivel molecular, los genes Hox se caracterizan por poseer una secuencia de ADN común denominada homeobox, la cual codifica para un homeodominio (HD) a nivel de proteína. El HD permite la unión de estos factores de transcripción al ADN mediante un motivo de unión específico de tipo TAAT (Mann *et al.*, 2009). Además, los factores Hox suelen actuar de forma cooperativa con diferentes cofactores, de manera que aumentan su especificidad en el reconocimiento de las secuencias de ADN. Estos

cofactores, principalmente Extradenticle (Exd) y Homothorax (Hth), también presentan HDs. Sin embargo, no es algo exclusivo, ya que muchos otros genes también los contienen. Es el caso de genes como *ladybird early (lbe)*, *apterous (ap)*, *tailup (tup)* o *bicoid (bcd)*, los cuales no se consideran genes Hox sino genes homeobox (Driever y Nüsslein-Volhard, 1988; Thor y Thomas, 1997; van Meyel *et al.*, 1999; Gabilondo *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo de la CNV, los genes Hox se expresan en gradientes a lo largo del eje AP y contribuyen a la especificación de los segmentos en regiones morfológicamente distintas. Además, la acción de los genes Hox con una posición más posterior suele prevalecer sobre la acción de los genes más anteriores. Esto se conoce como Regla de Prevalencia Posterior (Capovilla y Botas, 1998). *Antp* es el único gen Hox del *Antp-C* que se expresa en la CNV, concretamente en todos los segmentos entre T1 y A9, aunque su expresión es máxima en la región torácica. Por otro lado, todos los genes del *Bx-C* se expresan en la CNV. *Ubx* aparece desde la región posterior del segmento T2 al A7, siendo especialmente notable en A1 y A2. Por su parte, *abdA* se expresa entre A2 y A7, y *AbdB* lo hace entre A5 y A9 (Hirth *et al.*, 1998; Miguel-Aliaga y Thor, 2004) (ver **Figura 8B**).

Resulta imprescindible destacar que la expresión de los genes Hox en sus regiones de predominancia no es uniforme, sino altamente dinámica. Además, los procesos que regulan esta expresión selectiva permanecen desconocidos (Hirth *et al.*, 1998; Miguel-Aliaga y Thor, 2004). La expresión de los genes Hox a lo largo del desarrollo tampoco es constante, es especialmente alta en el embrión temprano y disminuye después de la delaminación. Más tarde, los genes Hox vuelven a alcanzar niveles de expresión altos en células individuales (tanto NBs como células postmitóticas) y participan en el establecimiento de códigos combinatorios esenciales para la especificación de la identidad (Estacio-Gómez y Díaz-Benjumea, 2014; Gabilondo *et al.*, 2018).



**Figura 8. Expresión de los genes Hox en el embrión de *D. melanogaster*.** (A) Los genes Hox forman dos grandes complejos génicos: *Antp-C*, que incluye los genes *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* y *Antp*; y *Bx-C*, que contiene los genes *Ubx*, *abdA* y *AbdB*. Modificada de (Mallo y Alonso, 2013). (B) Los genes Hox *Antp*, *Ubx*, *abdA* y *AbdB* se distribuyen en forma de gradientes en la CNV a lo largo del eje AP. Modificada de (Suska *et al.*, 2011).

### 5.3. División asimétrica del NB y generación de su progenie

Tras la delaminación, los NBs comienzan a dividirse para dar lugar a toda la progenie neural. Los NBs que delaminan en las primeras oleadas (S1-S3) tienen la capacidad de generar linajes grandes, de entre 10 y más de 20 células, mientras que los NBs que migran más tarde producen linajes más pequeños, de entre 2 y 10 células. Además, debido a la identidad única de cada NB, cada linaje es diferente en relación a los tipos celulares que lo componen (Bossing *et al.*, 1996).

Los NBs pasan por un número estereotipado de divisiones asimétricas mediante las cuales se autorrenuevan y, a su vez, dan lugar a todas las células de su linaje. Concretamente en la CNV de *D. melanogaster*, los NBs pueden sufrir dos tipos diferentes de divisiones: tipo I y tipo 0. En el modo de división de tipo I, el NB se divide para generar un NB y una célula madre ganglionar (CMG), que a su vez puede dividirse una vez más para dar lugar a dos células que, o bien se diferenciarán como neuronas y/o células gliales, o bien mueren por apoptosis. En el modo de división de tipo 0, el NB se divide para dar lugar a un NB y, al mismo tiempo, a una neurona (Baumgardt *et*

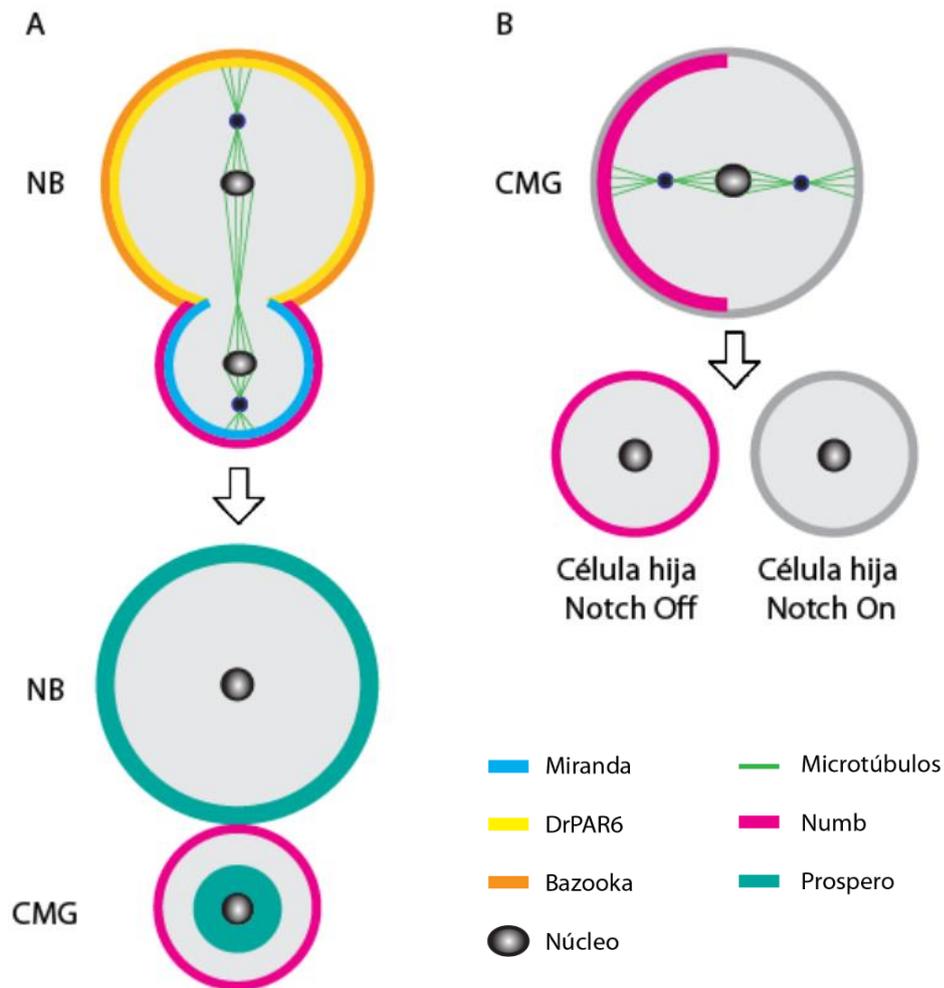
*al.*, 2014). Las divisiones de tipo I tienen lugar en etapas más tempranas del desarrollo mientras que las divisiones de tipo 0 se dan en periodos más tardíos. Algunos NBs experimentan los dos tipos de divisiones durante la generación de su progenie, por tanto, sufren un cambio de tipo de división desde tipo I a tipo 0. Es el caso del NB5-6T, el cual delamina de forma temprana (estadio 8) y da lugar a un linaje de 20 células, las primeras 9 a partir de divisiones de tipo I y las 5 siguientes a partir de divisiones de tipo 0 (Gunnar *et al.*, 2016).

Durante la división asimétrica del NB resulta fundamental la distribución de diferentes proteínas, dado que el polo apical dará lugar al nuevo NB y el polo basal originará la CMG. Bazooka (Baz) y la Proteína Quinasa C atípica (DmPAR6) forman el complejo PAR/aPKC y se distribuyen en el polo apical (Wodarz y Huttner, 2003). Este complejo fosforila a las proteínas Prospero (Pros), un represor transcripcional, y Miranda (Mira), su adaptador, que migran y se localizan en el polo basal. Una vez formada la CMG, Mira se degrada permitiendo que Pros se transloque al núcleo, donde reprime la expresión de genes de proliferación, de forma que la GMC sale del ciclo celular. Pros también es responsable de que la CMG se divida posteriormente una única vez (Skeath, James y Thor, 2003; Lai y Doe, 2014) (ver **Figura 9A**).

El número de divisiones de cada NB y, por tanto, el tamaño de su linaje, están altamente controlados. En este sentido, el regulador del ciclo celular Dacapo (Dap), el factor de transcripción E2f 2 (E2f2) y la Ciclina E (CycE) desempeñan un papel principal como interruptores en el proceso de cambio de tipo de división y la salida del ciclo celular (Baumgardt *et al.*, 2014).

Durante la división de la CMG para dar lugar a las dos células hijas, la ruta de Notch vuelve a jugar un papel fundamental. En este caso, la proteína Numb y su adaptador Partner of Numb (Pon), se distribuyen de forma asimétrica y se localizan únicamente en una de las dos células hijas (Doe y Bowerman, 2001). Numb es un represor de la ruta de Notch que genera una identidad conocida como *Notch Off* (ruta de Notch inactiva) en la célula hija en la que está presente. De la misma forma, genera una identidad *Notch On* (ruta de Notch activa) en la célula hija en la que está ausente (Cau y Blader, 2009) (ver **Figura 9B**).

La actividad o inactividad de la ruta de Notch establece diferentes destinos entre las células postmitóticas hermanas. Uno de estos destinos puede ser la apoptosis o muerte celular programada (PCD, del inglés *programmed cell death*), que puede ser activado tanto en células *Notch On* como en células *Notch Off* (Lundell *et al.*, 2003).



**Figura 9. Factores implicados en la división asimétrica del neuroblasto y la célula madre ganglionar. (A)** División asimétrica del NB. Los factores Bazooka (naranja) y DrPAR6 (amarillo) se posicionan en la zona apical, del mismo modo que Miranda (azul) se localiza en posición basal. Una vez producida la división, Prospero (turquesa) se mantiene en el citoplasma del NB mientras que se transloca al núcleo en la CMG, limitando su capacidad de proliferación. **(B)** División asimétrica de la CMG. El reparto asimétrico de Numb (rosa) en la CMG determina la activación de la ruta de Notch solamente en una de las células hijas. Ésta adquiere una identidad *Notch Off* y su hermana la identidad *Notch On*. Modificada de (Mizutani y Bier, 2008).

Durante el desarrollo embrionario, la PCD controla tanto la estructura de la CNV como el tamaño de los linajes. Este proceso actúa mediante dos mecanismos diferentes: la activación de la muerte del NB y la eliminación de células postmitóticas. En este último caso, la PCD puede iniciarse inmediatamente después del nacimiento de la célula, cuando ésta no presenta ningún signo de diferenciación, o una vez que la célula ya ha iniciado el programa de diferenciación en neurona o glía (Novotny *et al.*, 2002; Baumgardt *et al.*, 2014). En total, se estima que el 30% de las células del SNC mueren por PCD durante el desarrollo (Pinto-Teixeira *et al.*, 2016).

Una vez que se completa la neurogénesis, la CNV embrionaria de *D. melanogaster* contiene aproximadamente 800 células por segmento, resultado de las continuas divisiones de los 60 NBs que formaban cada neurómero en el inicio (Jarman, 2013).

#### **5.4. Establecimiento de la diversidad neural en el linaje del NB**

La división asimétrica, el control de la salida del ciclo celular del NB y la PCD son procesos que actúan en combinación para modelar el tejido neural. Sin embargo, estos mecanismos no contribuyen directamente a la diversidad neuronal. Por ejemplo, actúan independientemente del orden de nacimiento de las células dentro del linaje, característica que resulta realmente relevante en el proceso de adquisición de destino celular. Actualmente, la CNV de *D. melanogaster* es uno de los modelos por excelencia para el estudio de estos mecanismos moleculares de especificación temporal.

Los factores temporales de la CNV son una serie de factores de transcripción que se expresan secuencialmente en los NBs a medida que se dividen y avanza el desarrollo. Estos factores temporales, por orden de expresión, son: Hunchback (Hb), Krüppel (Kr), POU domain protein 1 y POU domain protein 2 (denominados conjuntamente Pdm), Castor (Cas) y Grainyhead (Grh) (Kambadur *et al.*, 1998; Brody y Odenwald, 2000; Isshiki *et al.*, 2001).

La expresión de cada uno de ellos define una ventana temporal que se restringe a un periodo concreto de la división del NB. La progenie nacida durante cada ventana hereda la expresión del factor temporal correspondiente, lo que contribuye al establecimiento de su destino celular (Li, X. *et al.*, 2013) (ver **Figura 10**).

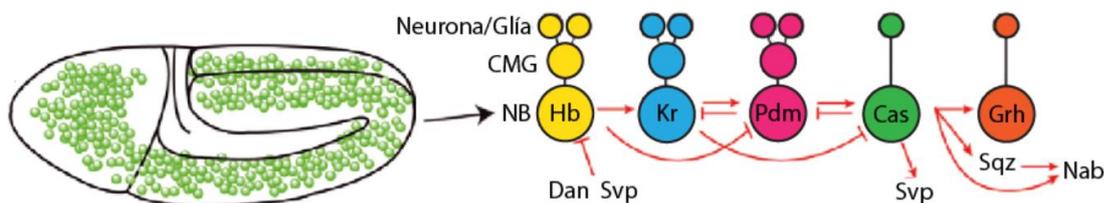
Todos los NBs de la CNV expresan esta secuencia, incluso en condiciones *in vitro*, por lo que se considera intrínseca e independiente de la información espacial u otro tipo de activación extrínseca (Grosskortenhau *et al.*, 2005). No obstante, no todos los NBs se dividen en todas las ventanas temporales (Baumgardt *et al.*, 2009), incluso algunos lo hacen durante una ventana temporal mixta, es decir, mientras expresan de forma transitoria dos factores consecutivos (Cleary y Doe, 2006; Baumgardt *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2010).

La transición entre ventanas temporales es un proceso complejo cuyos mecanismos aún no se entienden con claridad. De manera simplificada, está mediada por una regulación cruzada entre los propios factores. Cada uno de ellos activa al inmediatamente siguiente, mientras que reprime al inmediatamente anterior y, a su vez, al que se encuentra dos ventanas por delante de él mismo (Isshiki *et al.*, 2001; Grosskortenhau *et al.*, 2005) (ver **Figura 10**). Sin embargo, la pérdida de función de uno de estos factores no impide la progresión de la cascada, es decir, un factor temporal no necesita ser activado por el anterior para expresarse, lo cual pone de manifiesto de nuevo su carácter intrínseco. No obstante, sí tiene efectos en el patrón temporal de la cascada. En algunos casos, la eliminación de un factor temporal produce la expresión temprana del siguiente y, por tanto, el inicio del programa de desarrollo correspondiente. En otros casos, se prolonga la ventana temporal anterior (Kambadur *et al.*, 1998; Isshiki *et al.*, 2001).

Es importante destacar que los NBs pierden gradualmente su competencia para generar neuronas en respuesta a los factores temporales. De forma temprana, un pulso de Hb o Kr en el NB es capaz de generar neuronas ectópicas con un destino celular correspondiente a estos factores temporales. Sin embargo, esto no ocurre cuando la sobreexpresión se produce de forma tardía (Pearson y Doe, 2003; Cleary y Doe, 2006; Tran y Doe, 2008). La pérdida de competencia del NB a Hb está limitada por el movimiento del locus *hb* a la lámina nuclear (Kohwi y Doe, 2013), mientras que la pérdida de competencia a Kr depende de la función represiva del complejo Polycomb 1/2 (Touma *et al.*, 2012).

Más allá de la regulación cruzada explicada anteriormente, existe otro tipo de control en este proceso protagonizado por los denominados interruptores

temporales. Se trata de los factores de transcripción Seven up (Svp) (Kanai *et al.*, 2005) y Distal antenna (Dan) (Kohwi y Doe, 2013), los cuales favorecen la transición entre ventanas temporales (ver **Figura 10**). Además, Svp se expresa de forma transitoria en dos etapas de la progresión del NB y realiza funciones diferentes en cada uno de ellos. De forma temprana, participa disminuyendo la expresión de Hb para asegurar la correcta progresión de la cascada temporal (Kanai *et al.*, 2005), mientras que, de forma tardía, en la ventana temporal Cas, reprime la adquisición de destino neuropeptidérgico en las células Tv2-3 (Benito-Sipos *et al.*, 2011).



**Figura 10. Progresión de los factores temporales durante el desarrollo de la CNV de *D. melanogaster*.** Los NBs expresan de forma estereotipada los siguientes factores temporales: Hb (amarillo), Kr (azul), Pdm (rosa), Cas (verde) y Grh (naranja). Tanto la CMG como las células derivadas de la misma mantiene la expresión del gen temporal correspondiente en cada caso. La transición entre ventanas temporales es mediada por una regulación cruzada entre los propios factores (flechas rojas) y los interruptores temporales (Dan y Svp). También se representan los factores subtemporales Sqz y Nab que subdividen la ventana temporal Cas. La mayoría de los NB comienzan a generar su progenie mediante divisiones de tipo I pero muchos de ellos cambian a un modo de división de tipo 0 al final del linaje. Modificada de (Allan y Thor, 2015).

A veces, las ventanas temporales son muy extensas y se mantienen durante varias divisiones del NB. En esos casos, entran en juego los factores subtemporales, como Squeeze (Sqz) y Nab. Éstos son activados directamente por los propios factores temporales y actúan, como su propio nombre indica, subdividiendo las ventanas para diversificar el resultado de la actividad de los factores temporales (Baumgardt *et al.*, 2009). En este sentido, se ha descrito recientemente que el gen *Kr* juega un papel doble durante el desarrollo. Por un lado, actúa como factor temporal y, por otro, se reactiva de forma posmitótica en la ventana temporal Cas para reprimir la acción de Svp y promover un destino neuropeptidérgico en la célula Tv1. Por tanto, *Kr* también puede ser considerado un factor subtemporal (Stratmann *et al.*, 2016).

En resumen, los factores temporales actúan como dispositivos de medida del tiempo que permiten a los NBs cambiar su competencia para dar lugar a diferentes células hijas a medida que progresa el desarrollo.

### **5.5. Especificación del destino terminal**

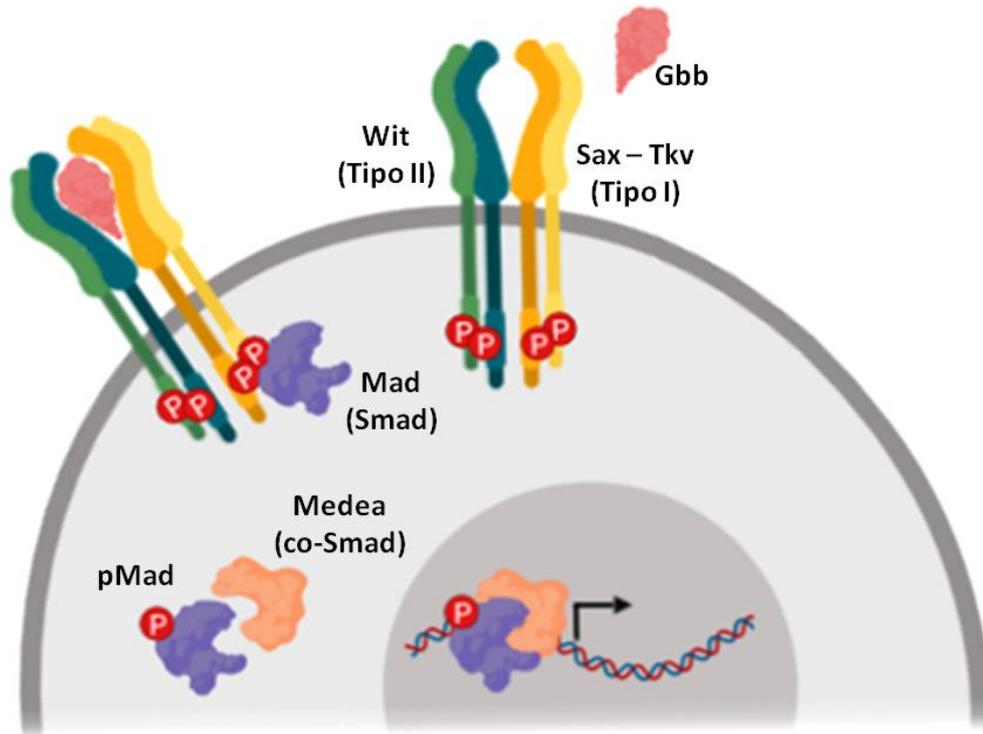
En último término, la adquisición de destinos neurales definitivos requiere la activación de repertorios de genes específicos de cada subtipo celular que definen sus propiedades únicas (características electrofisiológicas, neurotransmisores, morfología del axón y las dendritas, etc.). La mayoría de los estudios otorgan este papel a los selectores terminales. Se trata de determinados factores de transcripción que se activan en la célula postmitótica temprana y favorecen la expresión de genes efectores específicos que definen su identidad y función (Allan y Thor, 2015). Se calcula que *D. melanogaster* cuenta con aproximadamente 150.000 neuronas y 723 factores de transcripción (Hammonds *et al.*, 2013). Esto hace necesario que los selectores terminales actúen de forma combinatoria para establecer destinos únicos (Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009; Gabilondo *et al.*, 2016) y existen muy pocos casos en los que un solo factor sea capaz de establecer un destino. El ejemplo mejor estudiado es Dimmed (Dimm), que se expresa en la mayoría de las neuronas peptidérgicas del SNC. Este factor de transcripción es necesario y suficiente para la activación directa de una cohorte de genes responsables de la capacidad neurosecretora de la neurona, incluyendo aquéllos necesarios para la biosíntesis de vesículas de núcleo denso y enzimas para el procesamiento de neuropéptidos (Hewes, Randall S. *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2005; Hamanaka *et al.*, 2010).

La activación de estos códigos combinatorios terminales específicos depende, por un lado, de la información espacial y temporal de la célula (Allan *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2005; Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009; Gabilondo *et al.*, 2016; Gabilondo *et al.*, 2018). Por otro, son especialmente relevantes determinados factores extrínsecos procedentes de las células o tejidos diana de cada neurona, que secretan de forma paracrina citoquinas, neurotrofinas y factores de tipo transformante,

principalmente TGF- $\beta$ /BMP (Koo y Pfaff, 2002; Allan *et al.*, 2003; Marqués *et al.*, 2003a; Losada-Pérez *et al.*, 2013).

En *D. melanogaster*, la señalización TGF- $\beta$ /BMP tiene lugar en la mayoría, si no en todas, de las motoneuronas de la CNV (Aberle *et al.*, 2002) y resulta también fundamental para la especificación de algunos destinos neuropeptidérgicos. Las neuronas FMRFamidérgicas Tv4 son quizá el caso más paradigmático (Allan *et al.*, 2003). La señalización retrógrada comienza en el órgano neurohemal, tejido diana de las células Tv4, con la liberación paracrina del ligando Glass bottom boat (Gbb). El complejo receptor de Gbb es un heterotetrámero formado por dos tipos diferentes de receptores. Esta estructura se estabiliza a través de la unión de un heterodímero formado por los receptores de tipo I Saxophone (Sax) y Thickveins (tkv), y un homodímero formado por dos unidades del receptor de tipo II Wisful thinking (Wit). La unión del ligando al complejo receptor facilita la fosforilación, por parte de los receptores de tipo I, de la proteína Mothers against dpp (Mad) (familia Smad) en la célula presináptica. Consiguientemente, Mad y su co-factor Medea (familia co-Smad) se unen provocando la translocación al núcleo de dicho complejo, donde ejerce su función de regulador transcripcional (Tanimoto *et al.*, 2000; Dorfman y Shilo, 2001; Allan *et al.*, 2003; Marqués *et al.*, 2003a) (ver **Figura 11**).

Toda esta señalización dota de una gran plasticidad al sistema. De esta forma, neuronas nacidas a partir de NBs diferentes y con una información posicional y temporal distinta, pueden compartir un mismo destino (por ejemplo, la expresión del mismo neuropéptido) si comparten la misma cascada de selectores terminales (Losada-Pérez *et al.*, 2010a; Gabilondo *et al.*, 2016; Stratmann y Thor, 2017). De la misma forma, y gracias también a los selectores terminales, células pertenecientes al mismo linaje y con una información temporal y espacial similar pueden adquirir destinos terminales diferentes (Miguel-Aliaga *et al.*, 2008; Gabilondo *et al.*, 2018).



**Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de activación de la ruta de señalización TGF- $\beta$ /BMP.** El ligando Glass bottom boat (Gbb) procedente del tejido diana se une al complejo receptor. Esta estructura está formada por un heterodímero de Saxophone (Sax) y Thickveins (Tkv) (receptores tipo I) y un homodímero de Wisful thinking (Wit) (receptor tipo II). La unión del ligando induce la fosforilación de la proteína Mothers against dpp (Mad) (familia Smad), la cual se transloca al núcleo tras su unión con el co-factor Medea (co-Smad). Una vez en el núcleo, el complejo pMad actúa como activador transcripcional. Figura creada con *BioRender.com*.

## 6. Sistemas neuropeptidérgicos como modelo para el estudio de la especificación neuronal

Del mismo modo que nos beneficiamos de *D. melanogaster* como organismo modelo por tratarse de un sistema menos complejo y más cómodo, es necesario utilizar sistemas neuronales adecuados para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen la identidad neuronal. Uno de los sistemas más utilizados para este fin son los subgrupos neuropeptidérgicos de la CNV.

La mayoría de estos neuropéptidos presentan patrones de expresión altamente restringidos y sencillos. Es el caso de la leucokina (Lk), la FMRFamida (FMRFa), Neuropeptide like precursor 1 (Nplp1) o Capability (Capa), los cuales han sido

utilizado en los últimos años como marcadores de destino terminal. Todos ellos han permitido avanzar enormemente en el conocimiento sobre los mecanismos intrínsecos y extrínsecos que conlleva la adquisición de un destino terminal (Allan *et al.*, 2003; Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Allan *et al.*, 2005; Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009; Benito-Sipos *et al.*, 2011; Gabilondo *et al.*, 2011; Gabilondo *et al.*, 2016; Stratmann *et al.*, 2016; Stratmann y Thor, 2017; Gabilondo *et al.*, 2018). Por tanto, se siguen considerando una herramienta muy eficaz como modelo para el estudio de la especificación neuronal.

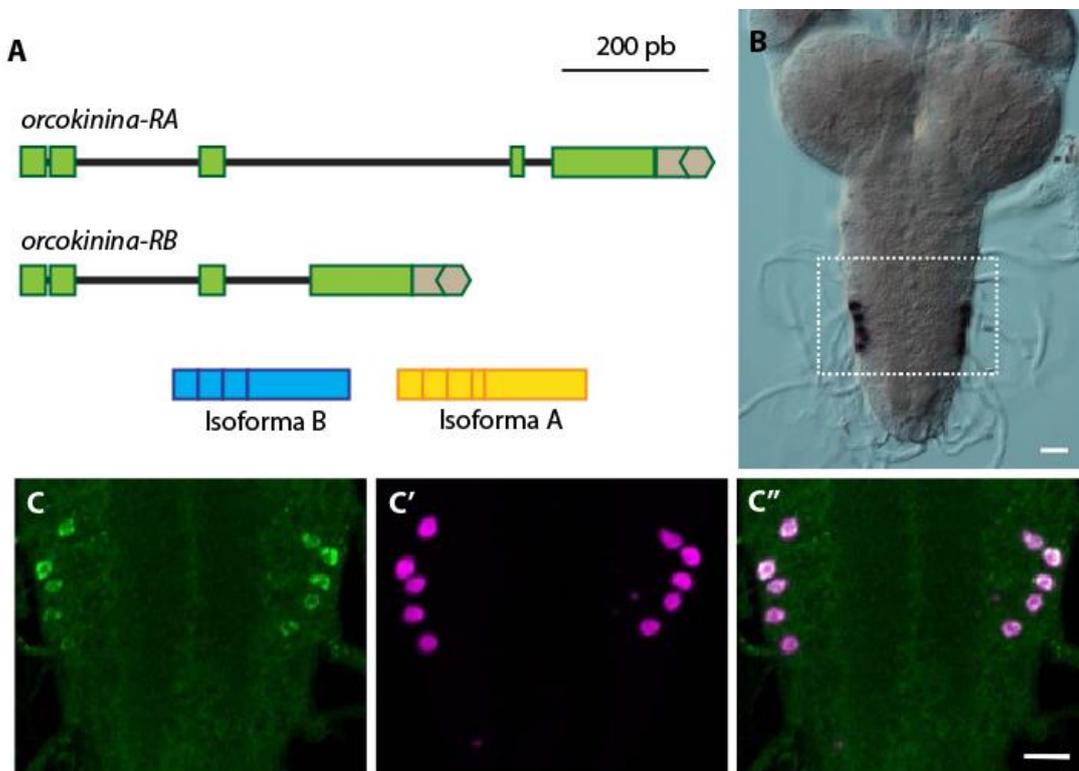
Para el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado dos sistemas neuropeptidérgicos: Orcokinina A y FMRFa.

### **6.1. El neuropéptido Orcokinina A**

Las Orcokininas son una familia de neuropéptidos identificada por primera vez en crustáceos. La primera Orcokinina (NFDEIDRSGFGFN) fue aislada en 1992 a partir de la cuerda nerviosa abdominal del cangrejo de río *Orconectes limosus* y se le otorgó una función como factor mioestimulador del intestino (Stangier *et al.*, 1992). Posteriormente, se han identificado péptidos homólogos en diferentes tejidos de otras especies de crustáceos, como en el ganglio torácico de *Carcinus maenas* (Bungart *et al.*, 1995), en el sistema nervioso y el órgano pericárdico de *Cherax destructor* (Skiebe *et al.*, 2002) y en el cerebro y ganglio torácico de *Cancer borealis* (Huybrechts *et al.*, 2003). No fue hasta 2004 cuando se identificó un neuropéptido de la familia de las Orcokininas en insectos, concretamente en la cucaracha *Blattella germanica* (Pascual *et al.*, 2004). Dos años después, un análisis *in silico* reveló su presencia también en *D. melanogaster* (Liu *et al.*, 2006).

Hasta hoy, se han identificado al menos dos isoformas de este neuropéptido en *D. melanogaster*: Orcokinina A y Orcokinina B. Ambas se producen a partir de la misma secuencia génica, cuyo transcrito sufre un procesamiento por *splicing* alternativo que da lugar a una isoforma u otra (ver **Figura 12A**).

Los estudios del grupo del Dr. Kwon muestran que la Orcokinina A se expresa en 5 pares de neuronas en la CNV larvaria en posición lateral y abdominal (orcoA-LA) (ver **Figura 12B y C-C''**). En el adulto, se expresa en un par de células en la zona central del cerebro (orcoA-PLP), en otros cuatro pares cercanos al lóbulo óptico (orcoA-AME) y en dos pares de neuronas en la CNV (orcoA-VNC). Por su parte, la Orcokinina B se expresa en células endocrinas del intestino larvario y adulto. En el SNC adulto, se expresa en una única célula en el ganglio abdominal (orcoB-uAG) (Chen, J. *et al.*, 2015).



**Figura 12. La Orcokinina A en *D. melanogaster*.** (A) Estructura del gen *orcoA*. La base de datos del genoma de *D. melanogaster* (<http://www.flybase.org>) predice dos variantes del ARNm del gen (*orcoA-RA* y *orcoA-RB*), los cuales codifican para dos isoformas diferentes de Orcokinina. Las cajas verdes y grises representan las regiones traducidas y no traducidas de ambos transcritos, respectivamente. La barra azul representa la isoforma B de la proteína (Orcokinina B), mientras que la barra amarilla representa la isoforma A (Orcokinina A). (B) Hibridación *in situ* contra *orcoA-RA* en la CNV. El cuadro de puntos blancos marca las 10 células abdominales que presentan señal (orcoA-LA). (C) Inmunotinción contra Orcokinina A en la CNV. (C') Patrón de expresión del gen reportero GFP dirigida por el driver *orcoA-Gal4*. (C'') Superposición de las imágenes C y C'. Todas las imágenes muestran larvas de estadio III. Modificada de (Chen, J. *et al.*, 2015).

En cuanto a su función, las Orcokinininas se ha descrito como miomoduladores en el SNC y SNP de crustáceos (Skiebe *et al.*, 2002; Li, L. *et al.*, 2002), actuando especialmente en la regulación de la contracción del intestino posterior (Stangier *et al.*, 1992). Además, las células de Orcokinina A muestran proyecciones eferentes que abandonan la CNV, reforzando la hipótesis de una posible, aunque desconocida, función motora.

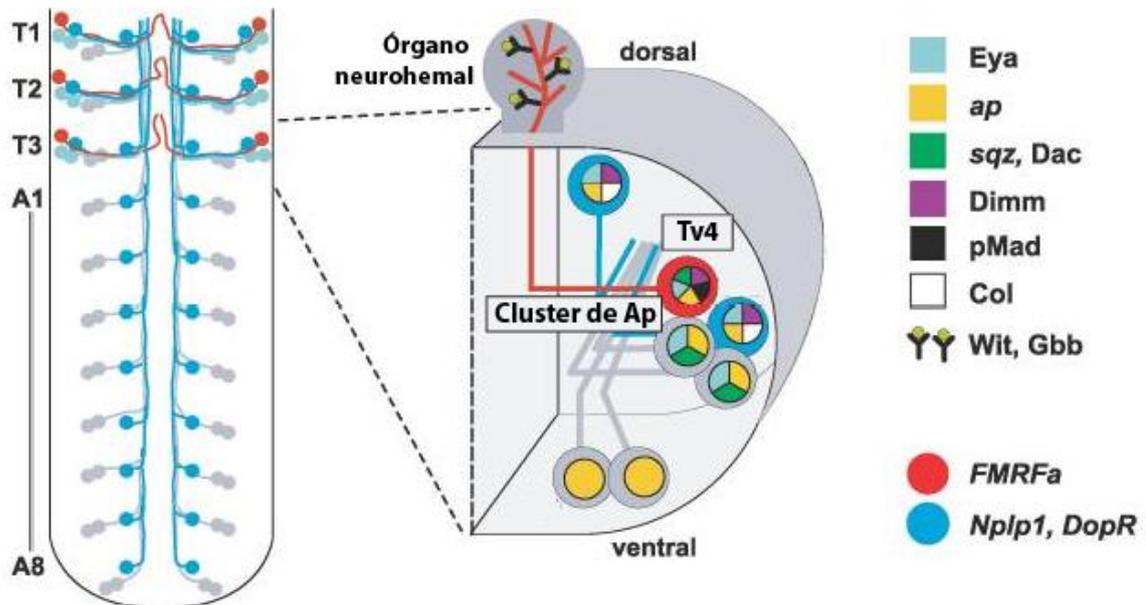
Las células de Orcokinina A han sido seleccionadas como modelo de estudio debido al desconocimiento sobre su origen y sus mecanismos de especificación neuronal, así como por las ventajas que confiere su patrón de expresión tan restringido y reconocible. Todas estas características hacen de este sistema neuropeptidérgico un modelo con gran potencial para este tipo de estudios.

## **6.2. El neuropéptido FMRFamida**

Uno de los NBs mejor estudiados es el NB5-6, del cual se ha identificado todo su linaje, tanto torácico como abdominal (Schmidt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999a; Baumgardt *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2010). Concretamente en los tres segmentos torácicos da lugar a un linaje de 23 células en cada hemineurómero. Las 4 últimas células (Tv1-4 o *cluster* de Ap) nacen a partir de divisiones de tipo 0 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Ap. La última de ellas (Tv4), expresa además el neuropéptido FMRFa. Tras esta división, el NB muere por PCD (Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009; Ulvklo *et al.*, 2012) (ver **Figura 13**).

La FMRFa se expresa en otras 16 subpoblaciones neuronales (Park, D. *et al.*, 2008), sin embargo, las células Tv4 representan un sistema de referencia para el estudio de la especificación neuronal. En estas células, la adquisición del destino FMRFa requiere la expresión de los factores temporales Cas y Grh (Baumgardt *et al.*, 2009), así como del factor posicional Antp y sus cofactores Exd y Hth (Karlsson *et al.*, 2010). Además, se conocen una larga lista de más de 40 posibles selectores terminales, entre los que ya se han confirmado como tal Collier (Col), Squeeze (Sqz), Dimmed (Dimm), Dachshund (Dac), Nab, Chip (Chi) o Eyes absent (Eya) (Benveniste *et al.*, 1998; van Meyel *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 2003; Hewes, Randall S. *et al.*, 2003; Marqués *et al.*, 2003a; Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Allan *et al.*, 2005; Baumgardt *et al.*,

2007; Baumgardt *et al.*, 2009; Bivik *et al.*, 2015). Finalmente, la expresión de la FMRFa es altamente dependiente de la señalización retrógrada a través de BMP proveniente del órgano neurohemal (Allan *et al.*, 2003; Marqués *et al.*, 2003a).



**Figura 13. El cluster de Apterous y su localización en la CNV del embrión tardío de *D. melanogaster*.** El cluster está formado por 4 neuronas (Tv1-4) que aparecen en los tres hemineurómeros torácicos (T1-T3). La neurona Tv4 expresa los factores Eya (azul), Ap (amarillo), Dimm (morado), pMad (negro), Dac (verde) y Col (blanco). Además, es la única que adquiere el destino FMRFa (rojo). Se observa que esta neurona inerva el órgano neurohemal, de donde recibe señalización retrógrada a través de la ruta BMP. La célula Tv1 también es neuropeptidérgica. Expresa los factores Eya, Dimm, Ap y Col, y adquiere el destino Nplp1 (celeste). Este mismo destino es adquirido por otras 11 células en la CNV. Las células Tv1 y Tv2 expresan Eya, Ap y Dac, y su destino permanece desconocido. Modificada de (Baumgardt *et al.*, 2007).

En cuanto a sus funciones, la FMRFa se ha relacionado clásicamente con la contracción del músculo estriado larvario y la contracción cardiaca (Hewes, R. S. *et al.*, 1998). Más recientemente, gracias al estudio de sus receptores, se le ha otorgado un papel en la modulación del vuelo en adultos a través del mantenimiento de la excitabilidad de membrana de células dopaminérgicas (Ravi *et al.*, 2018).

Por tanto, muchas de las etapas básicas de especificación están detalladamente descritas en este sistema. Esto sumado a la gran disponibilidad de herramientas

genéticas hace que las células Tv4 se postulen como un modelo muy interesante para la identificación de nuevos factores implicados en especificación neuronal.

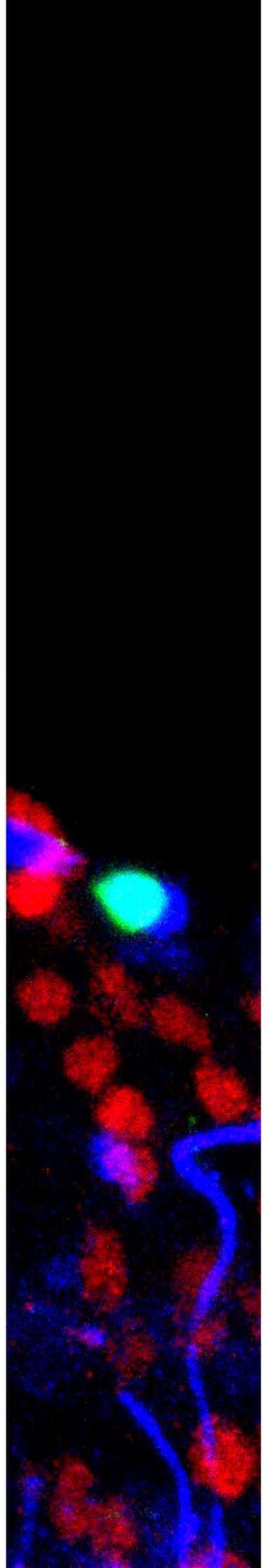
## 7. Helicasas y especificación celular

Las helicasas son enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos y desempeñan funciones importantes en los procesos de replicación, recombinación, transcripción y reparación del ADN. La mayoría de ellas actúan en forma de multímeros, frecuentemente, dímeros o hexámeros (von Hippel y Delagoutte, 2001).

A pesar de que clásicamente se les ha atribuido una actividad pasiva en dichos procesos, en los últimos años ha empezado a crecer el interés sobre el papel específico que podría jugar esta familia de proteínas en la regulación de la transcripción y, por tanto, en la especificación de destinos celulares. En este contexto, se ha descrito el papel de Etl1, una proteína de la familia de helicasas Snf2, como facilitador de la acetilación de histonas mediada por la acetil-transferasa CBP/p300 (Doiguchi *et al.*, 2016). Las acetilaciones se consideran modificaciones epigenéticas de la cromatina que favorecen la activación de la transcripción. Por tanto, este dato evidencia que Etl1 es capaz de modular la expresión génica en función del contexto. En cuanto al SNC, el único ejemplo descrito de este tipo de actividad es Brr2, una ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP) que forma parte de la subunidad U5 del espliceosoma. Presenta actividad helicasa y su implicación en especificación neuronal ha sido recientemente descrita gracias al modelo FMRFaminérgico (Monedero Cobeta *et al.*, 2018).

Este último descubrimiento podría tratarse de un caso excepcional, pero también podrían existir otras helicasas que presenten una actividad similar. Por ello, en esta tesis doctoral se analiza el papel de Mcm5, componente esencial del núcleo de la helicasa replicativa, en la especificación neuronal. De esta forma, la caracterización de factores de tipo helicasa en este contexto abre las puertas a nuevas líneas de investigación muy prometedoras.

# OBJETIVOS





El establecimiento de las bases moleculares que subyacen a la especificación celular continúa siendo una de las grandes incógnitas de la Biología del Desarrollo. Sin embargo, los estudios encaminados a responder esta amplia pregunta resultan hoy en día fundamentales. El conocimiento acerca de cómo una misma célula madre, totalmente indiferenciada pero totipotente, es capaz de generar células diferentes sientan actualmente las bases para explotar su potencial terapéutico en el campo de la reparación y regeneración de tejidos.

En este contexto, el sistema nervioso se establece como referente debido a su alta complejidad celular. La caracterización de una célula nerviosa requiere el estudio de múltiples y diversos factores. Todos y cada uno de ellos son indispensables para la adquisición de su destino terminal y, por tanto, de su competencia completa. Por ello, podría decirse que cada célula nerviosa es única. Esta cualidad abre un abanico muy amplio de mecanismos celulares de especificación, cuyo estudio puede ser abarcado utilizando el sistema nervioso como modelo.

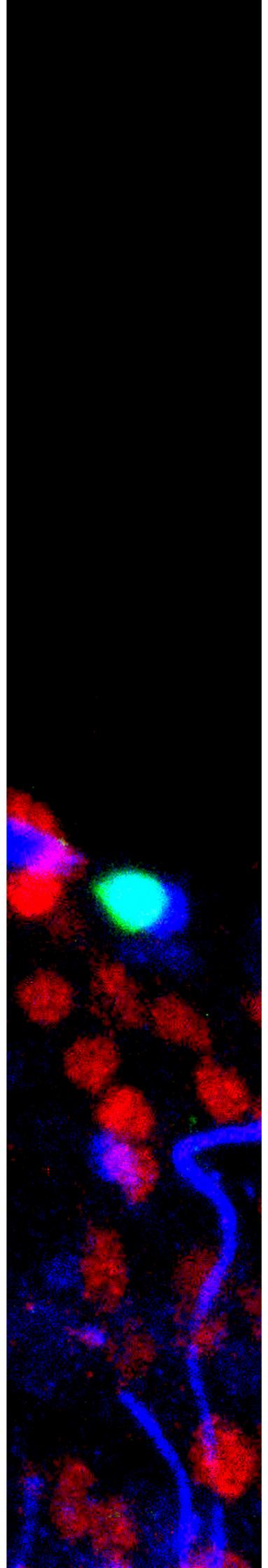
El objetivo principal de esta tesis doctoral es ahondar en el conocimiento de los mecanismos genéticos de especificación celular utilizando como modelo los sistemas neuropeptidérgicos de Orcokinina A y FMRFamida de la cuerda nerviosa ventral de *D. melanogaster*.

Del citado objetivo principal derivan los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar el patrón de expresión de la Orcokinina A en los diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*.
2. Describir las proyecciones eferentes de las células secretoras de Orcokinina A en estadio larvario y adulto.
3. Identificar el neuroblasto progenitor de las células de Orcokinina A.
4. Describir la implicación de los genes temporales y los genes homeóticos en el establecimiento del patrón de expresión de la Orcokinina A.

5. Describir la implicación de la ruta de Notch, la muerte celular programada y la ruta de BMP en la adquisición del destino Orcokinina A.
6. Identificar nuevos genes implicados en la especificación de las neuronas secretoras del neuropéptido Orcokinina A.
7. Establecer relaciones epistáticas entre los genes encontrados para comenzar a definir el código selector terminal de las neuronas de Orcokinina A.
8. Analizar el papel de la helicasa Minichromosome maintenance 5 (Mcm5) en el mecanismo de especificación de las neuronas FMRFamidérgicas Tv4.

# MATERIAL Y MÉTODOS





## 1. Líneas de *D. melanogaster* y mantenimiento de las mismas

Todas las líneas de *D. melanogaster* utilizadas en esta tesis doctoral han sido mantenidas de acuerdo a las técnicas clásicas descritas por Michael Ashburner en 1989 (Ashburner, 1989). Para la alimentación de los individuos se utilizó un medio estándar compuesto por agua (40%), zumo de fruta (20%), levadura fresca (15%) (Lallemand; *Saccharomyces cerevisiae*, N° Cat. 2910-524), azúcar (15%), harina de trigo (8%), agar (1%) (Apex Medical; N° Cat. 66-105), sal y ácido propiónico (Merck; N° Cat. 8.00605.1000) como antimicótico. El mantenimiento de las líneas se llevó a cabo en un incubador (Memmert; modelo ICP750) a 25 °C con una humedad relativa del 60% y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las características genéticas de las líneas empleadas se encuentran detalladas en la **Tabla 1**. No obstante, esta tabla no incluye todas las líneas utilizadas en la búsqueda genética dirigida del **Capítulo II de Resultados**, las cuales aparecen desglosadas en el **Anexo I**.

**Tabla 1. Relación de líneas de *D. melanogaster* utilizadas.** Los genotipos aparecen detallados, ordenados alfabéticamente y asignados a un código numérico. También se indica el origen de cada línea, así como la referencia (en caso de proceder de un proveedor oficial de libre acceso) o la publicación en la que fue descrita cada mutación (en caso de provenir de un laboratorio independiente). Asimismo, se incluye si la línea ha sufrido alguna modificación con respecto a la original (principalmente, cambios en los cromosomas balanceadores o generación de líneas nuevas a partir de construcciones establecidas anteriormente). [\*Abreviaturas. BDSC: *Bloomington Drosophila Stock Center*; DGRC: *Drosophila Genomics and Genetics Resources Kyoto Stock Center*; FlyORF: *Zurich ORFeome Project*].

Nº	Genotipo	Origen
1.	<i>bw[1]; wit[A12] st[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5173
2.	<i>cas[Δ3]/TTG</i>	Ward F. Odenwald (Mellerick <i>et al.</i> , 1992)
3.	<i>cas-Gal4/TTG</i>	Stefan Thor (Gabilondo <i>et al.</i> , 2011)
4.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}gsb[01155]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10999
5.	<i>Df(2L)ED773</i>	BDSC Ref.: #7416
6.	<i>Df(3L)H99</i>	Manuel Calleja (Abbott y Lengyel, 1991)
7.	<i>Df(3L)H99 nab[R52]/TD</i>	Derivado de las líneas N°6 y N°23
8.	<i>Df(3L)H99; nab[SH143]/TD</i>	Derivado de las líneas N°6 y N°25
9.	<i>Df(3R)D6, Ubx[1] e[4]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1897
10.	<i>Df(3R)Ubx109/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3486
11.	<i>GR86D02-lexAp65</i>	Haluk Lacin

Nº	Genotipo	Origen
		(Lacin y Truman, 2016)
12.	<i>grh[IM]/TD</i>	Stefan Thor (Nüsslein-Volhard <i>et al.</i> , 1984)
13.	<i>hkb[5953]-lacZ</i>	Stefan Thor (Chu-LaGraff y Doe, 1993)
14.	<i>Kr[1] Kr[CD]/CTG</i>	Chris Q. Doe (Isshiki <i>et al.</i> , 2001)
15.	<i>lexOP-myrGFP Act&gt;ds&gt;lexp65/CD</i>	Haluk Lacin (Lacin y Truman, 2016)
16.	<i>M{UAS-Mcm5.ORF}ZH-86Fb</i>	FlyORF Ref.: #F001278
17.	<i>M{UAS-pdm2.ORF.3xHA.GW}ZH-86Fb</i>	FlyORF Ref.: #F000465
18.	<i>Mcm5[exc222] prospero-Gal4/TD</i>	Derivado de las líneas N°19 y N°35
19.	<i>Mcm5[exc222]/TTG</i>	Cathleen M. Lake (Page <i>et al.</i> , 2007a)
20.	<i>mwh[1] jv[1] st[1] red[1] Sb[sbd-2] Abd-B[M2] e[11] ro[1] ca[1]/TTG</i>	Derivado de BDSC Ref.: #794
21.	<i>nab[R52] UAS-tsh/TD</i>	Derivado de las líneas N°23 y N°51
22.	<i>nab[R52] UASvg/TD</i>	Derivado de las líneas N°23 y N°62
23.	<i>nab[R52]/TD</i>	Fernando Díaz Benjumea (Terriente Félix <i>et al.</i> , 2007)
24.	<i>nab[SH143] prospero-Gal4/TD</i>	Derivado de las líneas N°25 y N°35
25.	<i>nab[SH143]/TD</i>	Fernando Díaz-Benjumea (Oh <i>et al.</i> , 2003)
26.	<i>orcokinin-Gal4</i>	Akira Mizoguchi (Chen, J. <i>et al.</i> , 2015)
27.	<i>Oregon-R-C</i>	BDSC Ref.: #5
28.	<i>P{hsneo}numb[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4096
29.	<i>P{ry[+t7.2]=en- lacZ(Xho)}en[Xho25]/CD</i>	BDSC Ref.: #5801
30.	<i>P{ry[+t7.2]=hsFLP}1, w[1118]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6
31.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}tsh[04319] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11370
32.	<i>P{w[+mC]=GAL4-elav.L}2/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8765
33.	<i>P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155]</i>	BDSC Ref.: #458
34.	<i>P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155]</i>	BDSC Ref.: #458
35.	<i>prospero-Gal4</i>	Fumio Matsuzaki (Ohshiro <i>et al.</i> , 2000)
36.	<i>sp/CyO; hb[pr] hb [FB]/TD</i>	Chris Q. Doe (Isshiki <i>et al.</i> , 2001)
37.	<i>tsh[04319]/CD; prospero-Gal4</i>	Derivado de las líneas N°31 y N°35
38.	<i>tsh[8] UAS-nab/CD</i>	Derivado de las líneas N°39 y N°47
39.	<i>tsh[8]/CD, P{ry[+t7.2]=en1}wg[en11]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #50763
40.	<i>tsh[8]/CD; UASvg/TD</i>	Derivado de las líneas N°39y N°62
41.	<i>UAS-cas/TD</i>	Stefan Thor (Benito-Sipos <i>et al.</i> , 2010)
42.	<i>UAS-gbb/CD</i>	Stefan Thor (Allan <i>et al.</i> , 2003)
43.	<i>UAS-gbb/CD; Mcm5[exc222]/TD</i>	Derivado de las líneas N°42 y N°19

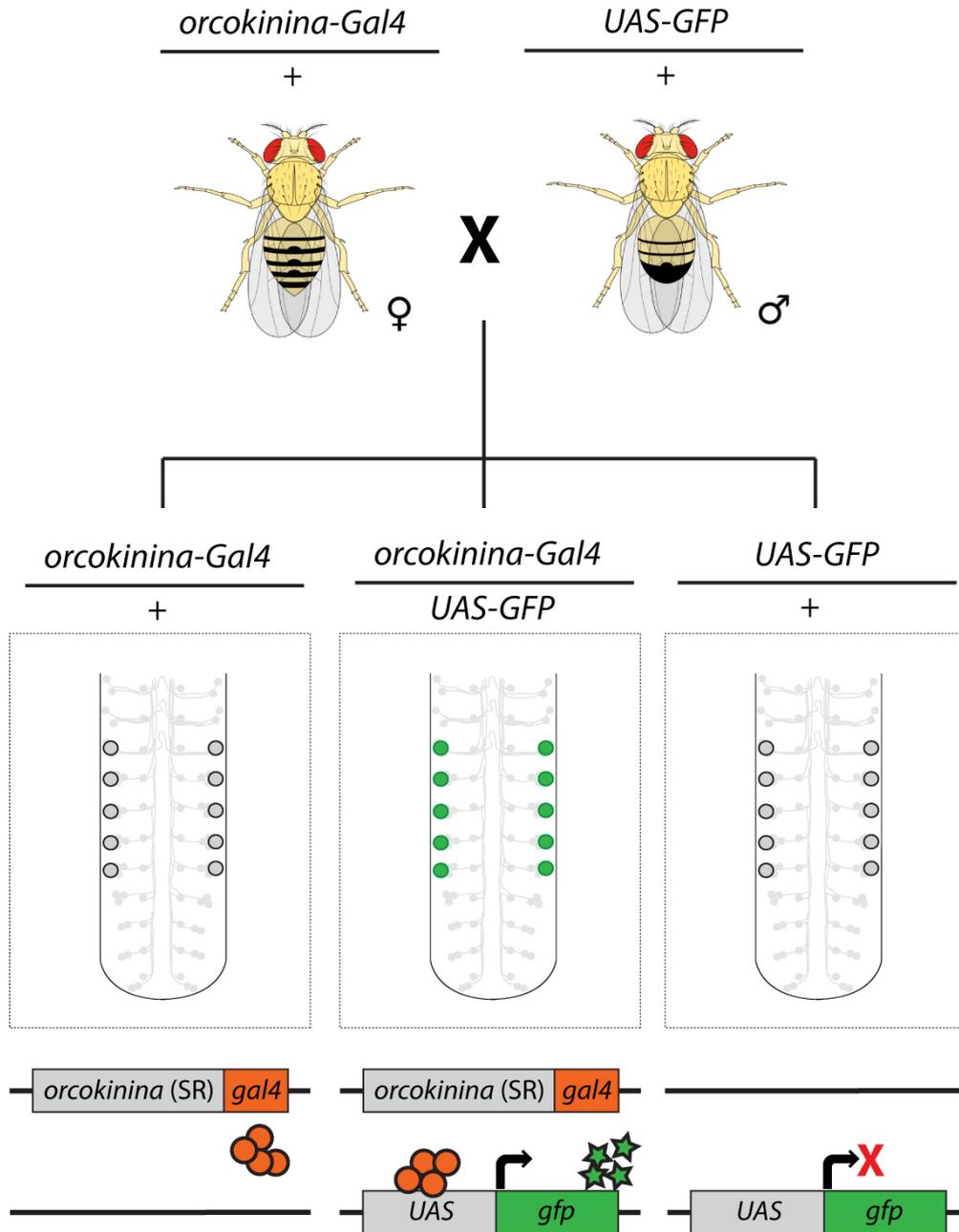
Nº	Genotipo	Origen
44.	<i>UAS-grh/CD; UAS-cas/TD</i>	Derivado de las líneas N°58 y N°41
45.	<i>UAS-Hb/CD; UAS-Hb/TD</i>	Claude Desplan (Wimmer <i>et al.</i> , 2000)
46.	<i>UAS-Kr/CD</i>	Stefan Thor (Benito-Sipos <i>et al.</i> , 2010)
47.	<i>UAS-nab</i>	Fernando Díaz Benjumea (Terriente Félix <i>et al.</i> , 2007)
48.	<i>UAS-nls-myc-EGFP</i>	Douglas W. Allan (Allan <i>et al.</i> , 2003)
49.	<i>UAS-tkvA UAS-saxA/CD</i>	Stefan Thor (Allan <i>et al.</i> , 2003)
50.	<i>UAS-tkvA UAS-saxA/CD; Mcm5[exc222]/TD</i>	Derivado de las líneas N°49 y N°19
51.	<i>UAS-tsh</i>	Stephen Cohen (Wu, Jun y Cohen, 2002)
52.	<i>UAS-Ubx[21]/CD; UAS-abdA/TD</i>	Derivado de las líneas N°65 y N°63
53.	<i>unpg[1912-r37]-lacZ</i>	Fernando Díaz Benjumea (Chiang <i>et al.</i> , 1995)
54.	<i>vg[nw] Hia[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #437
55.	<i>vg[nw]/CD UAS-nab/CD</i>	Derivado de las líneas N°54 y N°47
56.	<i>vg[nw]/CD; prospero-Gal4/TD</i>	Derivado de las líneas N°54 y N°35
57.	<i>vg[nw]/CD; UAS-tsh/TD</i>	Derivado de las líneas N°54 y N°51
58.	<i>w; UAS-grh<sup>15M</sup></i>	Stefan Thor (Benito-Sipos <i>et al.</i> , 2010)
59.	<i>w; UAS-Notch[intra]</i>	Alicia Hidalgo (Griffiths <i>et al.</i> , 2007)
60.	<i>w; UAS-numb</i>	Alicia Hidalgo (Griffiths <i>et al.</i> , 2007)
61.	<i>w;; Antp[12(NS-rvc12)]/TTG</i>	Ernesto Sánchez Herrero (Abbott y Lengyel, 1991)
62.	<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS-vg.K}49</i>	BDSC Ref.: #37296
63.	<i>w[1]; P{w[+mC]=UAS-abd-A.G}21.8</i>	BDSC Ref.: #912
64.	<i>w[1]; P{w[+mC]=UAS-Abd-B.m.C}1.1</i>	BDSC Ref.: #913
65.	<i>w[1]; P{w[+mC]=UAS-Ubx.Ia.C}36.2/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #911
66.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=UAS-Antp.Mb}W1</i>	BDSC Ref.: #7301
67.	<i>w<sup>+</sup>/w; abd-A[MX1], mwh[1] jv[1] st[1] red[1] Sb[sbd-2] abd-A[MX1] e[11] ro[1] ca[1]/TD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #106809
68.	<i>y[1] w[*]; P{y[+t7.7] w[+mC]=ind- GFP.FPTB}attP40</i>	BDSC Ref.: #67717
69.	<i>y[1] w[1118]; P{w[B1- 12]=lacW}mirr[B1-12]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #30023

## 2. El sistema Gal4-UAS

Para la sobreexpresión *in vivo* de las secuencias genéticas de interés se utilizó el sistema de transcripción de levaduras Gal4-UAS, implementado en *D. melanogaster* por Andrea Brand y Norbert Perrimon en 1993 (Brand y Perrimon, 1993). La posibilidad de utilizar este sistema supuso una de las mayores revoluciones para la investigación genética debido a que permite, de una manera práctica y sencilla, la expresión ectópica de cualquier secuencia genética en tejidos o tipos celulares específicos.

El sistema Gal4-UAS se compone de dos elementos: el factor de transcripción Gal4 y sus secuencias de unión específicas en el ADN, conocidas como secuencias UAS (del inglés *Upstream Activation Sequence*). La inserción de la secuencia codificante para Gal4 en posición 3' con respecto a una secuencia promotora conocida determina el patrón espacio-temporal de expresión de dicho factor de transcripción. Posteriormente, la unión de Gal4 a sus secuencias específicas UAS inicia la transcripción de cualquier secuencia genética situada *downstream* de las mismas. De esta forma, se restringe su expresión a únicamente aquellas células en las que la activación del promotor asociado a Gal4 permita su expresión (ver **Figura 14**).

Actualmente existe una amplia librería de líneas Gal4 y líneas UAS de acceso libre que, al combinarse entre ellas, permiten conseguir una gran variedad de patrones espaciales y temporales de expresión de diversas secuencias de interés. Es por ello que este sistema constituye hoy en día una de las herramientas más versátiles y con mayor potencial científico para los estudios con *D. melanogaster*.



**Figura 14. Representación esquemática del funcionamiento del sistema *Gal4-UAS* en *D. melanogaster*.** La figura ejemplifica el cruce de una hembra portadora de un transgén *orcokininina-Gal4* y un macho portador de una secuencia *UAS-GFP*. Como resultado, se obtiene una progenie diversa con diferentes combinaciones en su genotipo. Solamente aquellos individuos que hayan heredado ambas secuencias transgénicas expresarán GFP, y lo harán exclusivamente en las únicas diez células de la CNV en las que la secuencia reguladora *orcokininina* está activa. Los círculos naranjas representan la proteína Gal4 y las estrellas verdes, la proteína reportera GFP.

### 3. Líneas reporteras

Las líneas reporteras se generan utilizando elementos transponibles de tipo P en los que se clona el gen reportero elegido tras la región promotora de un gen de interés. Las líneas reporteras más utilizadas contienen la secuencia correspondiente al gen *lacZ* de *Escherichia coli*, el cual codifica para la proteína  $\beta$ -galactosidasa, o genes codificantes para proteínas fluorescentes (GFP, RFP, YFP, etc.). De esta forma, estas líneas permiten la expresión dirigida *in vivo* del gen reportero, que reproducirá el patrón de expresión del gen de interés pues se expresa bajo el dominio de su promotor. Del mismo modo que ocurría con las líneas Gal4 y UAS, actualmente existe una amplia librería de líneas reporteras de *D. melanogaster* de acceso libre con gran interés como herramienta en estudios genéticos.

### 4. Cromosomas balanceadores

Los cromosomas balanceadores presentan reordenaciones cromosómicas que impiden el apareamiento homólogo durante la profase I de la meiosis. Por ello, son muy útiles para el mantenimiento de líneas transgénicas estables, especialmente aquellas que portan mutaciones que resultan letales en homocigosis.

En estos casos, la ausencia de recombinación evita la pérdida de la mutación en las siguientes generaciones. Además, incluyen marcadores dominantes o genes reporteros en su secuencia que permiten reconocer y discernir entre individuos homocigóticos y heterocigóticos. En la presente tesis doctoral se han utilizado los cromosomas balanceadores que aparecen desglosados en la **Tabla 2**. Todos ellos proceden del *Bloomington Drosophila Stock Center* (Universidad de Indiana, EE UU).

**Tabla 2. Relación de cromosomas balanceadores utilizados.** La tabla incluye los balanceadores utilizados, el cromosoma al que corresponden y los marcadores fenotípicos e inserciones que contienen en su secuencia genética.

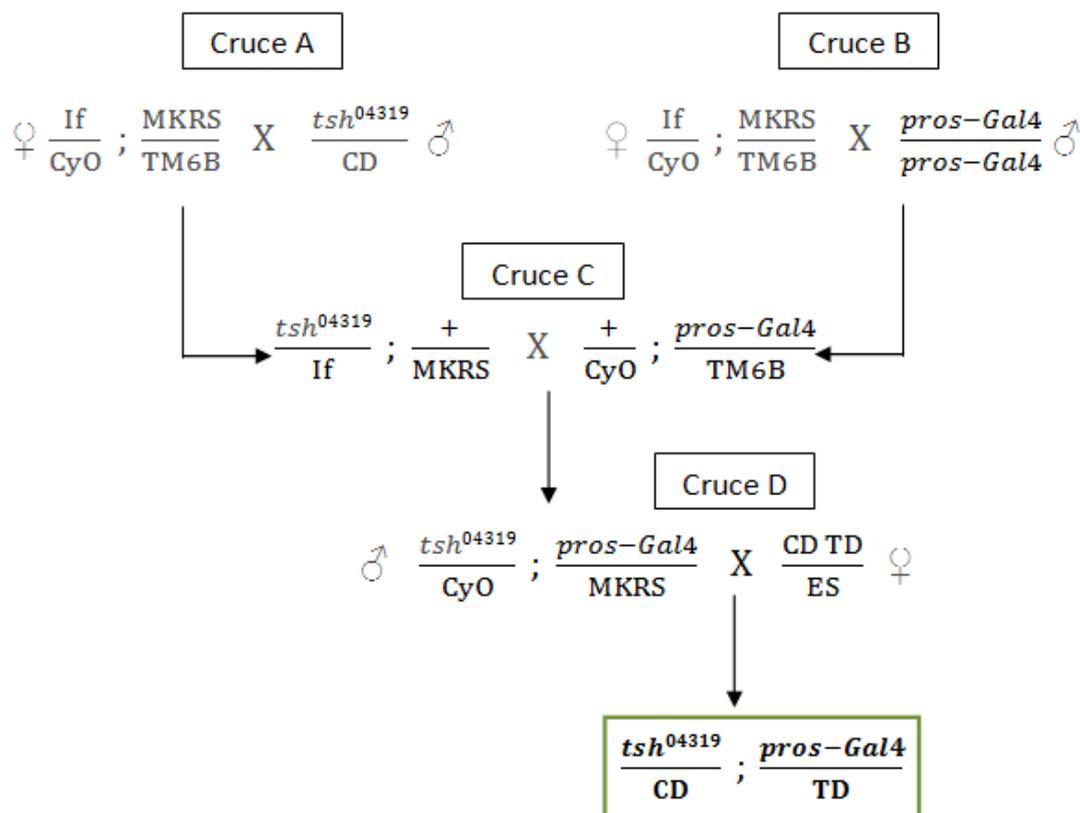
Balanceador	Cromosoma	Marcadores e inserciones
FM7C	X	Inversión (1)FM7, <i>yellow</i> <sup>31d</sup> , <i>scute</i> <sup>8</sup> , <i>white</i> <sup>a</sup> , <i>singed</i> <sup>X2</sup> , <i>vermilion</i> <sup>Of</sup> , <i>garnet</i> <sup>4</sup> , <i>Bar</i> <sup>1</sup>
FM7C, <i>Kr-GFP</i>	X	Inversión (1)FM7, <i>yellow</i> <sup>31d</sup> , <i>scute</i> <sup>8</sup> , <i>white</i> <sup>a</sup> , <i>singed</i> <sup>X2</sup> , <i>vermilion</i> <sup>Of</sup> , <i>garnet</i> <sup>4</sup> , <i>Bar</i> <sup>1</sup> , inserción por elemento P { <i>Kr-GFP</i> }
CyO	II	Inversión (2LR)O, <i>Curly</i> <sup>1</sup> , <i>dp</i> <sup>1vl</sup> , <i>purple</i> <sup>1</sup> , <i>cinnabar</i> <sup>2</sup>
CyO, <i>Kr-GFP</i>	II	Inversión (2LR)O, <i>Curly</i> <sup>1</sup> , <i>dp</i> <sup>1vl</sup> , <i>purple</i> <sup>1</sup> , <i>cinnabar</i> <sup>2</sup> , inserción por elemento P { <i>Kr-GFP</i> }
CD	II	Inversión (2LR)O, <i>Curly</i> <sup>1</sup> , <i>dp</i> <sup>1vl</sup> , <i>purple</i> <sup>1</sup> , <i>cinnabar</i> <sup>2</sup> , inserción por elemento P { <i>Deformed-GFP</i> }
TM6B	III	Inversión (3LR)TM6B, <i>Stubble</i> <sup>1</sup> , <i>Antp</i> <sup>Hu</sup> , <i>Tubby</i> <sup>1</sup> , <i>ebony</i> <sup>1</sup>
TD	III	Inversión (3LR)TM6B, <i>Stubble</i> <sup>1</sup> , <i>Antp</i> <sup>Hu</sup> , <i>Tubby</i> <sup>1</sup> , <i>ebony</i> <sup>1</sup> , inserción por elemento P { <i>Deformed-GFP</i> }
TTG	III	Inversión (3LR)TM3, <i>knirps</i> <sup>ri-1</sup> , <i>pink</i> <sup>p</sup> , <i>septin</i> <sup>1</sup> , <i>Ubx</i> <sup>bx-34e</sup> , <i>ebony</i> <sup>1</sup> , <i>Stubble</i> <sup>1</sup> , <i>Serrate</i> <sup>1</sup> , inserción por elemento P { <i>twist-Gal4</i> }, inserción por elemento P { <i>UAS-2xEGPF</i> }
MKRS	III	Transposición (3;3)MRS, <i>Stubble</i> <sup>1</sup> , <i>karmoisin</i> <sup>1</sup> , <i>rosy</i> <sup>1</sup>
dBYFP	II y III	Inversión (2LR-3LR), <i>Erase</i> <sup>1</sup> , <i>Curly</i> <sup>1</sup> , <i>Humeral</i> <sup>1</sup> , <i>Tubby</i> <sup>1</sup> , inserción por elemento P { <i>Deformed-GFP</i> }

## 5. Obtención de nuevas líneas transgénicas de *D. melanogaster*

Si bien es cierto que actualmente existe una amplia librería de acceso libre de líneas mutantes, Gal4, UAS y reporteras, para este estudio fue necesario obtener varias líneas nuevas que combinaran los elementos genéticos de interés que contenían algunas de las ya existentes. Estas líneas se obtuvieron a partir de cruces entre machos y hembras vírgenes con genotipos concretos en una proporción de 3 hembras por cada macho. Para ello, se utilizaron dos estrategias diferentes en función de la posición cromosómica de las inserciones o mutaciones de interés.

### 5.1. Líneas mutantes o portadoras de inserciones en cromosomas diferentes

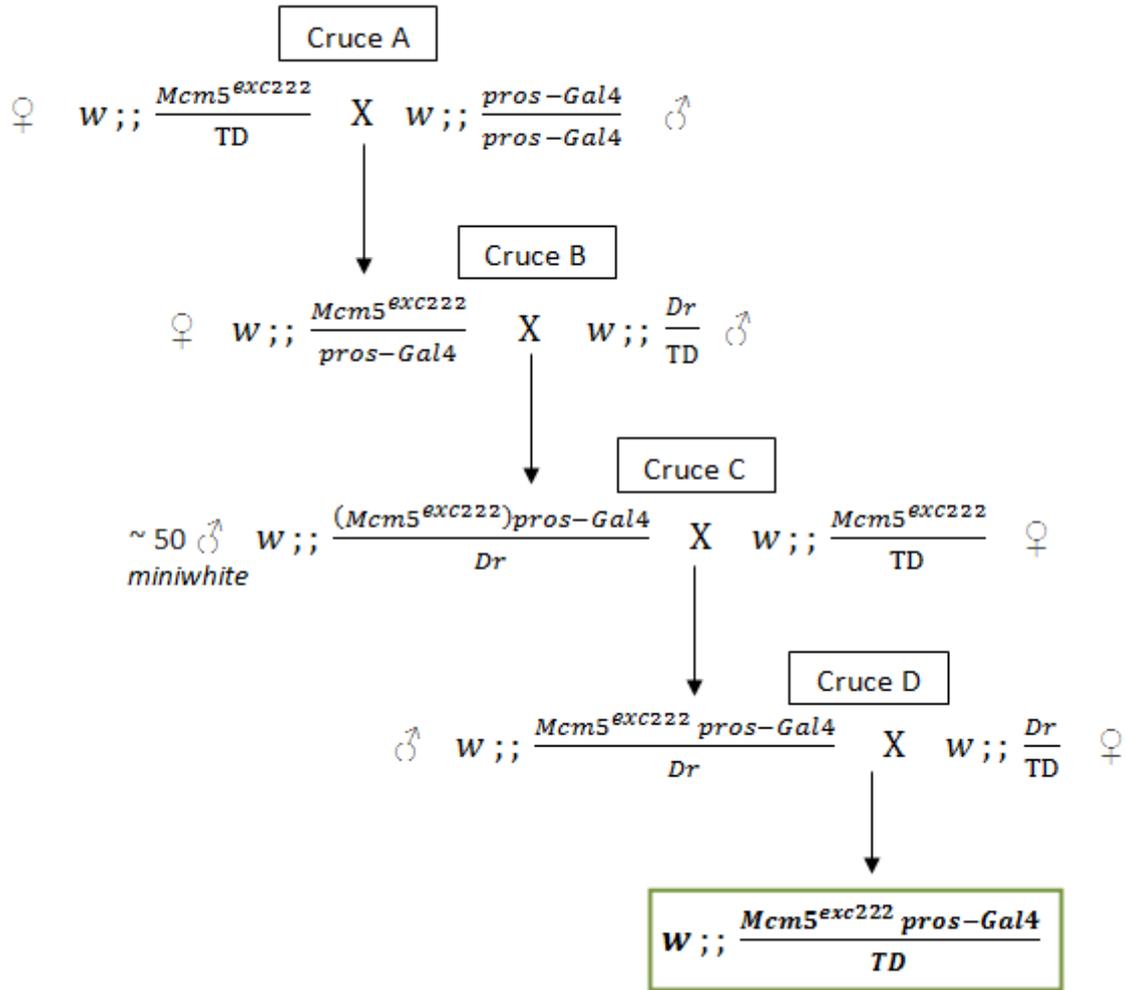
Este procedimiento fue utilizado para la obtención de las líneas N° 37, 40, 43, 44, 50, 52, 55, 56, y 57 cuyo genotipo se encuentra detallado en la **Tabla 1**. Se tomará la línea N°37: *tsh*<sup>04319</sup>/*CD*; *pros-Gal4*/*TD* como ejemplificación del proceso, dado que éste fue equivalente en todos los casos (ver **Figura 15**).



**Figura 15.** Representación esquemática de la obtención de la línea *tsh*<sup>8</sup>/*CD*; *pros-Gal4*/*TD* de *D. melanogaster*. El esquema se presenta como ejemplificación del proceso de obtención de líneas mutantes o portadoras de inserciones en cromosomas diferentes a partir de líneas de *D. melanogaster* ya existentes.

### 5.2. Líneas mutantes o portadoras de inserciones en el mismo cromosoma

Este procedimiento fue utilizado para la obtención de las líneas N° 7, 8, 18, 21, 22, 24 y 38 cuyo genotipo se encuentra detallado en la **Tabla 1**. Se tomará la línea N° 18: *w*; *Mcm5*<sup>exc222</sup> *pros-Gal4*/*TD* como ejemplificación del proceso, dado que éste fue equivalente en todos los casos (ver **Figura 16**).



**Figura 16. Representación esquemática de la obtención de la línea  $w;; Mcm5^{exc222} pros-Gal4/TD$  de *D. melanogaster*.** El esquema se presenta como ejemplificación del proceso de obtención de líneas mutantes o portadoras de inserciones en el mismo cromosoma a partir de líneas de *D. melanogaster* ya existentes.

En estos casos, dado que las mutaciones o inserciones de interés se encontraban en el mismo cromosoma, se hacía necesario que tuviera lugar un proceso de recombinación entre los cromosomas homólogos que permitiera que ambos elementos se localizaran en la misma cromátida. La frecuencia de recombinación fue calculada para cada caso concreto con el objetivo de estimar la probabilidad de obtener el genotipo de interés. Para su identificación y verificación se hizo uso de varias estrategias en función del tipo de inserción o mutación. Por un lado, los elementos P utilizados para la generación de líneas Gal4 y UAS suelen incorporar un marcador fenotípico de tipo *miniwhite* que permite su identificación *de visu* siempre

que la trangénesis tenga lugar en especímenes mutantes para el gen *white*. Por otro lado, aunque las mutaciones no suelen estar asociadas a marcadores fenotípicos, se hizo uso de su efecto letal en homocigosis para la identificación de especímenes portadores de las mismas mediante el cruce de machos candidatos con hembras vírgenes con genotipo mutante para el gen de interés. En estos casos se seleccionaron aquellas cepas en las que no se encontró ningún adulto sin cromosomas balanceadores en la progenie.

## **6. Establecimiento de puestas y recolección de embriones**

Para establecer las puestas se cruzaron especímenes con genotipos concretos en una proporción de 3 hembras por cada macho. Los cruces se realizaron en cajas para la recolección de embriones (Genesee Scientific; N° Cat. FS59-100 / FS59-105) cubiertas con placas de Petri de 35 mm (Grainer Bio One; N° Cat. 627102) o de 55 mm (Deltalab; N° Cat. 200201) fijadas a las cajas con tapas del tamaño correspondiente (Genesee Scientific; N° Cat. FS59-102 / FS59-106) en los extremos. Las placas de Petri contenían medio alimenticio compuesto por zumo de fruta (90%), azúcar (6%), agar (3%) y ácido acético (1%) (Panreac Química SLU; N° Cat. 131008). Para los experimentos se necesitaron embriones de estadio 18 horas AEL (del inglés *after egg laying*), por lo que la recolección se llevó a cabo entre 21 y 24 horas de incubación después del establecimiento de la puesta a 25 °C o 26 °C (según el carácter del experimento).

Posteriormente, los embriones se aislaron con ayuda de una malla de nylon de 100 µm de luz (Filter-Lab; N° Cat. NY100055) y un pincel, y se sumergieron en lejía (Henkel Ibérica®; Conejo) durante 3 minutos para retirar el corion. De esta manera, se posibilita la selección de los individuos homocigóticos del estadio deseado bajo la lupa de fluorescencia (Olympus; modelo SZX12), de acuerdo a los criterios establecidos por Volker Hartenstein y José A. Campos-Ortega (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

## 7. Disección del SNC de embriones de *D. melanogaster*

La disección del SNC de los embriones seleccionados se realizó en placas Petri de 55 mm con Sylgar® 184 (Sigma-Aldrich; N° Cat. 761036-5EA). Una vez depositados los embriones en las placas, se cubrieron con PBS 1X (Gentrox; N° Cat. 40-029) en H<sub>2</sub>O destilada y se procedió a su disección para el aislamiento del SNC con la ayuda de filamentos de tungsteno de 0,125 mm de diámetro (Goodfellow; N° Cat. 1GOODFE095-148-30) afilados y fijados a una jeringa (BD Plastipak; N° Cat. 2012-06). Todo el proceso se llevó a cabo bajo una lupa binocular estereoscópica (Leica; modelo M80). Para el afilado del tungsteno se utilizó una solución de KOH (Sigma-Aldrich; N° Cat. 484016-1KG) al 10% en agua destilada y un alimentador de electroforesis (Groc Instruments; modelo G-200).

## 8. Inmunodetección de marcadores celulares

Una vez obtenido el tejido, las muestras se colocaron en portaobjetos (Menzel-Gläser; N° Cat. 631-0649) previamente tratados con una solución de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich; N° Cat. P1524-1G) y Photo-Flo (Kodak; N° Cat. 146 4510) y se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences; N° Cat. 15735-85) al 4% en H<sub>2</sub>O destilada. Después, se incubaron durante una hora en solución de bloqueo (BBT) compuesta por un 2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich; N° Cat. A7906-50G) y 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich; N° Cat. T8787-100ML) en PBS. Posteriormente, las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (ver **Tabla 3**) durante toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 20 minutos con PBT (PBS con Triton X-100 al 30%) y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios pertinentes (ver **Tabla 4**) a una dilución de 1:500 en BBT. En este caso, las incubaciones tuvieron lugar durante en una cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 20 minutos con PBT y se montaron las preparaciones con VectaShield® (Vector Laboratories; N° Cat. 416397) y un cubreobjetos de 20 x 20 mm (Menzel-Gläser; N° Cat. 630-2888).

**Tabla 3. Relación de anticuerpos primarios utilizados.** La tabla incluye información sobre el antígeno, el huésped (H) y la dilución de uso para cada anticuerpo ordenados alfabéticamente. También se indica el origen, así como la referencia (en caso de tratarse de un anticuerpo comercial) o la publicación en la que fue caracterizado (en caso de provenir de un laboratorio independiente).

Antígeno	H	Origen	Dilución
Castor	Conejo	Cedido por WF. Odenwald (Kambadur <i>et al.</i> , 1998)	1:1000
Collier	Conejo	Cedido por S. Thor (Baumgardt <i>et al.</i> , 2007)	1:1000
Corazonina	Conejo	Cedido por JA. Veenstra (Veenstra <i>et al.</i> , 1995)	1:500
Dimmed	Cobaya	Cedido por S. Thor (Baumgardt <i>et al.</i> , 2007)	1:1000
Dimmed	Conejo	Cedido por S. Thor (Baumgardt <i>et al.</i> , 2007)	1:1000
Eyes absent	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank Ref.: 10H6	1:250
Grainyhead	Rata	Cedido por S. Thor (Baumgardt <i>et al.</i> , 2009)	1:1000
Green fluorescent protein	Pollo	Abcam Ref.: ab13970	1:500
Insulin-like precursor 7	Conejo	Cedido por AP. Gould (Miguel-Aliaga <i>et al.</i> , 2008)	1:5000
Krüppel	Conejo	Cedido por P. Carrera (Gaul y Jäckle, 1987)	1:1000
Leucokinina	Conejo	Cedido por D. Nässel (Chen, Y. <i>et al.</i> , 1994)	1:50
Minichromosome maintenance 5	Cobaya	Generado para este estudio nh2- C+SSNKSAPSEPAEGEI -conh2 nh2- C+FGRWDDTKGEENIDF -conh2	1:200
Nab	Conejo	Cedido por T. Isshiki (Terriente Félix <i>et al.</i> , 2007)	1:1000
Orcokinina A	Conejo	Generado para este estudio nh2- CSQSEFKTKYSVKQ -conh2 ac- SKLKRNFDEIDKASA+C -conh2	1:3000
Pigment- dispersing factor	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank Ref.: C7-s	1:5
Pro Capability	Conejo	Cedido por JA. Veenstra (Graham <i>et al.</i> , 2002)	1:100
Pro FMRFamida	Pollo	Cedido por S. Thor (Baumgardt <i>et al.</i> , 2007)	1:1000
Pro Neuropeptide like precursor 1	Pollo	Cedido por S. Thor (Baumgardt <i>et al.</i> , 2007)	1:1000
Prospero	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank Ref.: MR1A	1:2

Antígeno	H	Origen	Dilución
Reversed polarity	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank Ref.: 8D12	1:50
Serotonina	Conejo	Sigma-Aldrich Ref.: S5545	1:2000
Seven up	Ratón	Cedido por Y. Hiromi (Kanai <i>et al.</i> , 2005)	1:500
Smad1/5 fosforilada	Conejo	Cell Signalling Ref.: 41D10	1:100
Squeeze	Rata	Cedido por T. Isshiki (Tsuji <i>et al.</i> , 2008)	1:750
Teashirt	Conejo	Cedido por S. Cohen y H. Herranz (Wu, J. y Cohen, 2000a)	1:200
Vestigial	Conejo	Cedido por S. Carroll (Williams <i>et al.</i> , 1991)	1:200
$\beta$ -galactosidasa	Pollo	Kamiya Biomedical Company Ref.: PC-181	1:100

**Tabla 4. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.** La tabla incluye información sobre el antígeno, el huésped (H), el fluorocromo al que se encuentra conjugado y la casa comercial para cada anticuerpo ordenados alfabéticamente.

Antígeno	H	Fluorocromo	Casa comercial
IgG de Cobaya	Burro	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch Ref.: 706-545-148
		Rodamina Red™ - X	Jackson ImmunoResearch Ref.: 706-295-148
		Alexa Fluor® 647	Jackson ImmunoResearch Ref.: 706-605-148
IgG de Conejo	Burro	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch Ref.: 611-545-215
		Rodamina Red™ - X	Jackson ImmunoResearch Ref.: 611-295-215
		Alexa Fluor® 647	Jackson ImmunoResearch Ref.: 611-605-215
IgG de Pollo	Burro	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch Ref.: 703-545-155
		Rodamina Red™ - X	Jackson ImmunoResearch Ref.: 703-295-155
		Alexa Fluor® 647	Jackson ImmunoResearch Ref.: 703-605-155
IgG de Rata	Burro	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch Ref.: 712-545-150
IgG de Ratón	Burro	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch Ref.: 615-545-214
		Rodamina Red™ - X	Jackson ImmunoResearch Ref.: 615-295-214
		Alexa Fluor® 647	Jackson ImmunoResearch Ref.: 615-605-214

## 9. Disección *en filete* de larvas de *D. melanogaster* de estadio III

Este protocolo se llevó a cabo en larvas de estadio III con genotipo *orcokina-Gal4>UAS-myrGFP* con el objetivo de exponer el SNC y las terminaciones nerviosas sin alterar la musculatura de pared larvaria. La disección se realizó en placas Petri de 35 mm con Sylgar® 184 cubiertas con PBS 1X en H<sub>2</sub>O destilada. Las larvas fueron seleccionadas en los tubos de cultivo en los que se habían establecido los cruces parentales correspondientes anteriormente. Después, fueron colocadas en las placas de disección con un pincel y, con ayuda de agujas entomológicas, se procedió a inmovilizar las larvas para realizar un corte longitudinal en la pared abdominal haciendo uso de unas microtijeras quirúrgicas. Se utilizaron de nuevo agujas entomológicas para separar la pared abdominal y fijarla a la resina, consiguiendo así la disección *en filete* o *en libro* buscada. Finalmente, se eliminaron la grasa y las vísceras con ayuda de unas pinzas para dejar la musculatura y el SN expuestos. Todo el proceso se llevó a cabo bajo una lupa binocular estereoscópica.

Una vez realizada la disección, se realizó un protocolo de inmunodetección contra GFP siguiendo los pasos descritos anteriormente en el apartado 6. *Inmunodetección de marcadores celulares*. Cabe destacar que, en este caso, la fijación fue realizada en la propia placa de disección. Posteriormente, tras los lavados, se retiraron las agujas entomológicas y se trasladaron las muestras a un tubo *ependorf*, donde se completaron el resto de etapas del protocolo.

Durante la incubación del anticuerpo secundario correspondiente, se añadió a la solución faloidina conjugada con Alexa Fluor® 647 (1:50) (Thermo Fisher Scientific, Nº Cat. A22287) para la identificación de las fibras musculares y un anticuerpo primario contra peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) conjugado con Rodamina Red™ - X (1:500) (Jackson ImmunoResearch Ref.: 123-295-021) para la monitorización de neuronas sensoriales, motoneuronas y NMJs (Lily Yeh Jan y Yuh Nung Jan, 1982).

## 10. Preparación del abdomen completo de adultos de *D. melanogaster*

Para la realización de esta técnica, el abdomen de especímenes adultos de *D. melanogaster* con genotipo *orcokнина-Gal4>UAS-myrGFP* fueron fijados durante 24 horas en paraformaldehído al 2% en PBS a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 4 días a temperatura ambiente y en agitación con una solución compuesta por faloidina conjugada con Texas Red (1:50) (Thermo Fisher Scientific, N° Cat. T7471), Triton X-100 al 1%, DMSO al 0,5% (Sigma-Aldrich; N° Cat. W387520) y escina (0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich; N° Cat. E1378) en PBS. El uso de surfactantes y el largo tiempo de incubación se empleó como estrategia para favorecer la entrada de la Faloidina en los tejidos gruesos, como es el caso de la musculatura abdominal. Tras esto, las muestras fueron lavadas con Triton X-100 al 1% en PBS durante 20 minutos y fijadas de nuevo durante 4 horas en paraformaldehído al 2% en PBS para reducir el riesgo de separación de la Faloidina durante los subsiguientes pasos del protocolo. Para evitar artefactos causados por la contracción osmótica del tejido, las muestras fueron posteriormente deshidratadas de forma gradual en glicerol (del 2% al 80%) (Sigma-Aldrich; N° Cat. 4750-OP) y etanol (del 20% al 100%) (Ott, 2008). Finalmente, se utilizó salicilato de metilo (Sigma-Aldrich; N° Cat. M6752) como medio de montaje para las preparaciones.

## 11. Preabsorción de anticuerpos

En algunos casos, los anticuerpos utilizados no resultaban ser suficientemente específicos para el antígeno correspondiente. Por ello, se realizó este procedimiento con el fin de eliminar las uniones inespecíficas de dichos anticuerpos y obtener tinciones más limpias en los casos en los que se consideró necesario.

Para este procedimiento se utilizaron embriones de estadios muy tempranos puesto que resulta fundamental que las muestras no expresen el antígeno de interés. La recolección se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 4. *Establecimiento de puestas y recolección de embriones*. Después, los embriones se colocaron en tubo de vidrio con 4  $\mu$ L de heptano (Sigma-Aldrich; N° Cat. 246654) y el mismo volumen de paraformaldehído al 4% en H<sub>2</sub>O destilada.

Las muestras se fijaron durante 20 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la fase inferior, correspondiente al paraformaldehído, y se sustituyó por 4  $\mu\text{L}$  de metanol (Sigma-Aldrich; N<sup>o</sup> Cat. 322415). Tras agitar la mezcla durante 1 minuto, se retiró la fase superior (heptano) y se reservaron los embriones incluidos en la fase inferior (metanol). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBT en rotación con el fin de eliminar cualquier residuo de metanol de la muestra. Finalmente, los embriones se incubaron en un tubo *eppendorf* con una solución compuesta por 180  $\mu\text{L}$  de BBT, 20  $\mu\text{L}$  del anticuerpo a preabsorber y 0,6  $\mu\text{L}$  de azida sódica (Sigma-Aldrich; N<sup>o</sup> Cat. S2002) durante toda la noche a 4°C y en rotación. Finalmente, se recogió el anticuerpo preabsorbido y se procedió a su utilización.

## **12. Obtención y análisis de imágenes mediante microscopía láser confocal**

Todas las muestras se visualizaron utilizando microscopía láser confocal de barrido. Para la observación y toma de imágenes del SNC de embriones se utilizó el equipo LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) o a un microscopio vertical Axiovert200 (Zeiss) del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Para las preparaciones de larva III se utilizó un equipo LSM800 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss), mientras que para las preparaciones de adulto se hizo uso de un equipo LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImagerer.M2 (Zeiss), ambos pertenecientes al Servicio de Microscopía Confocal del HHMI *Janelia Research Campus*.

Para la obtención y procesamiento de imágenes digitales se utilizó el software LSM 5 Image Browser (Zeiss).

Para la posterior edición de las imágenes se recurrió a los programas ImageJ, Fiji-win32, Adobe PhotoShop® CS4 y Adobe Illustrator® CS4 (Sistemas Adobe).

### 13. Análisis estadístico de los datos

El análisis de los datos y la representación gráfica de los mismos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software). Para cada conjunto de datos se testó, en primer lugar, la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante el test de Bartlett. Dado que en ningún caso los datos se ajustaban a criterios paramétricos, se procedió a la comparación de medias de poblaciones independientes mediante la prueba U de Mann-Whitney.

### 14. Extracción y secuenciación de ARN

Para la realización de esta técnica se procedió primeramente a la recolección y selección de embriones siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el apartado 4. *Establecimiento de puestas y recolección de embriones*. Para cada muestra, se recolectaron 50 mg de embriones de estadios comprendidos entre 15 y 18 horas AEL que fueron posteriormente congelados. Se utilizaron embriones de dos condiciones: genotipo  $w^{1118}$  (control) y mutantes para el gen *Mcm5*. Se realizaron 3 réplicas biológicas por condición. Una vez obtenidas las muestras, se utilizó el kit comercial “RNeasy Mini Kit 50” (Quiagen; Nº Cat. 74104) para la extracción de ARN, verificando posteriormente su eficiencia mediante la medición de la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Tras la extracción del ARN, se procesaron las muestras para eliminar todo posible ADN remanente de la extracción. Para ello se utilizó el kit comercial “TURBO DNA-free™ Kit” (Invitrogen; Nº Cat. AM1907). Finalmente, se analizó de nuevo la absorbancia de las muestras en el mismo espectrofotómetro para verificar la presencia de ARN tras el tratamiento.

Las muestras de ARN purificado fueron posteriormente procesadas en el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid, donde se realizaron todos los procedimientos descritos a continuación. Primeramente, se calculó el número de integridad (RIN) del ARN en el bioanalizador 2100 Bioanalyzer (Agilent) y se utilizó el kit comercial Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; Nº Cat. Q32855) para su cuantificación. Una vez verificadas las muestras, se procedió a la realización de librerías de ADN complementario (ADNc) utilizando los kits de preparación de muestras de ARN total monocatenario TrueSeq® de Illumina®. Este paso implica la

purificación de ARN para la eliminación del ARN ribosómico mediante el uso de oligonucleótidos específicos, la fragmentación por medio de cationes divalentes y la transcripción inversa con cebadores aleatorios para la obtención del ADNc. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo Illumina® HiSeq 2500 en formato de lectura única (*single read*) de 1x75 pares de bases, obteniendo una profundidad media de 25-30 millones de lecturas por muestra. Posteriormente se realizó un análisis de calidad de los datos de secuenciación, incluyendo la distribución y longitud de las lecturas, el contenido en Guanina-Citosina, el número de bases por secuencia, el número de bases no leídas y el número de duplicados. Finalmente, los datos se almacenaron en formato de texto FASTQ.

## 15. Análisis de la expresión diferencial de genes

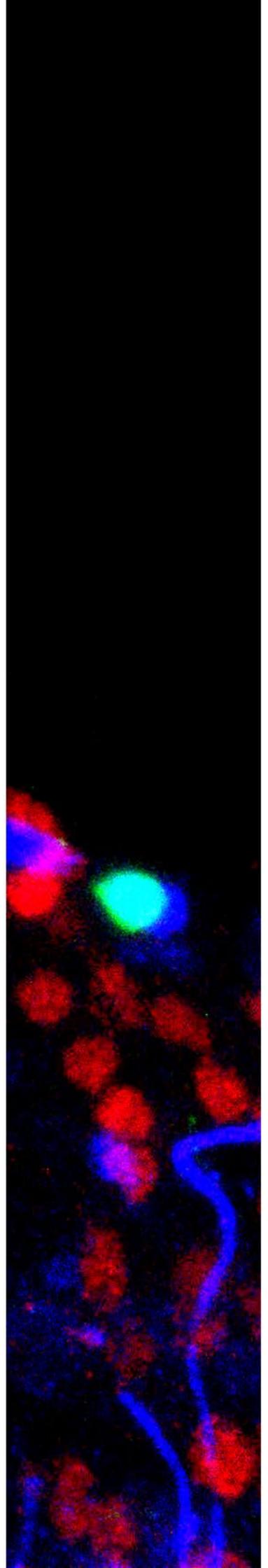
Los ficheros FASTQ obtenidos a partir de la secuenciación del ARN fueron alineados con el genoma de referencia de *D. melanogaster* (BDGP R5/dm3 de abril de 2006) utilizando el programa TopHat (Galaxy Version 2.1.1) (Trapnell *et al.*, 2012) con parámetros estándar. Las lecturas sin procesar se normalizaron como lecturas por kilobase de transcrito por millón de lecturas de secuencia mapeada (RPKM) con el programa Cufflinks (Galaxy Version 2.2.1.2) (Trapnell *et al.*, 2010). Para la cuantificación de los alineamientos se utilizó la función HTseq-count del paquete HTseq (Galaxy Version 0.9.1) usando el modelo génico de ensamblado UCSC dm3\_ensGen en formato GTF (Hinrichs *et al.*, 2016). La normalización del número de lecturas por gen y la cuantificación de la expresión diferencial de los transcritos entre las dos condiciones testadas se llevó a cabo mediante el paquete DESeq2 (Galaxy Version 2.11.40.2) (Love *et al.*, 2014). El método de Benjamini-Hochberg se aplicó para el ajuste del p-valor para comparaciones múltiples con objeto de controlar la probabilidad de falsos positivos (FDR) (Benjamini y Hochberg, 1995). Las tablas de datos se originaron en Excel.

## **16. Análisis de la ontología génica**

El análisis de la ontología génica fue realizado mediante la herramienta para la interpretación de resultados de técnicas experimentales en genómica GeneCodis3 (Benjamini y Hochberg, 1995; Carmona-Saez *et al.*, 2007; Nogales-Cadenas *et al.*, 2009; Tabas-Madrid *et al.*, 2012). Se seleccionaron para el análisis aquellos genes que mostraban un aumento o disminución de la expresión significativo en los mutantes *Mcm5* con respecto al control. El análisis fue realizado a tres niveles: proceso biológico, función molecular y componente celular. Se aplicó además un filtro de número mínimo de genes para análisis de coincidencias. El p-valor fue calculado utilizando una distribución hipergeométrica y aplicando el método de Benjamini-Hochberg para la corrección de la FDR (Benjamini y Hochberg, 1995).



# RESULTADOS





## **CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS SECRETORAS DEL NEUROPEPTIDO ORCOKININA A EN LA CNV DE *D. melanogaster***

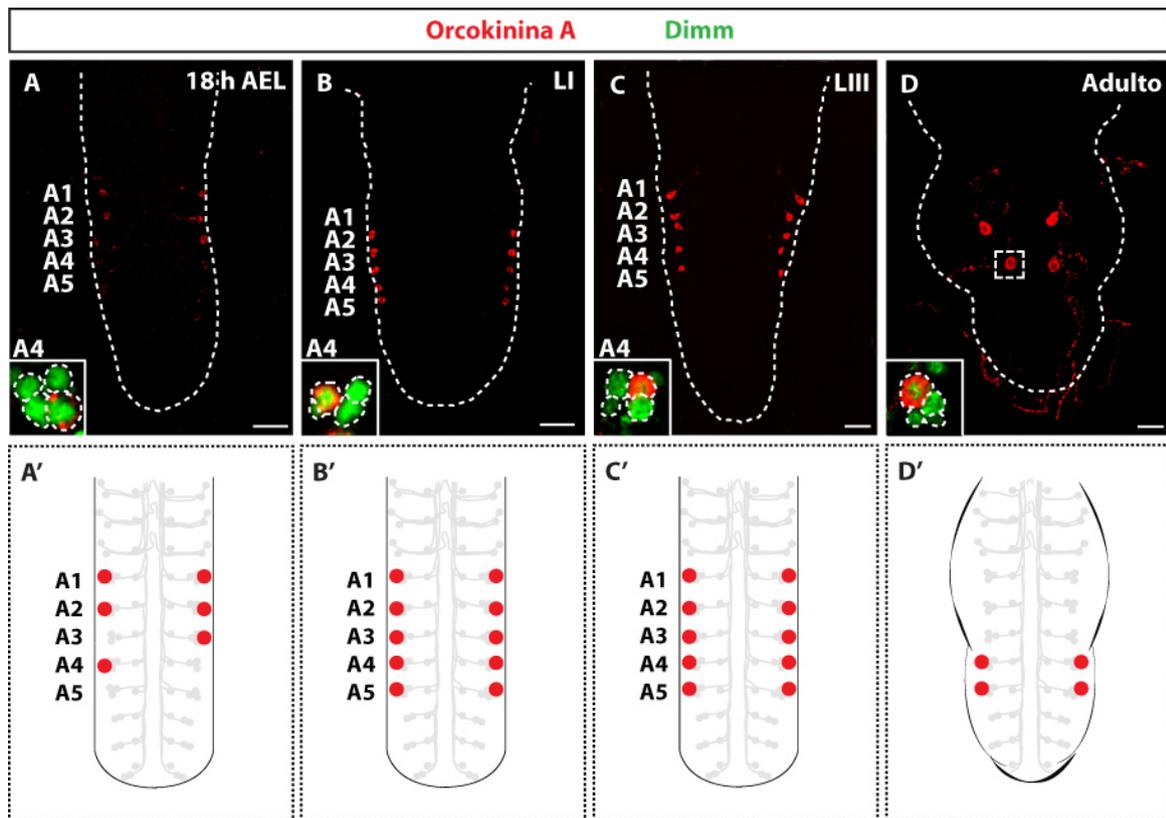
El conocimiento pleno de los mecanismos moleculares que subyacen a la especificación neuronal continúa siendo un reto hoy en día para la Neurobiología del Desarrollo. El uso de sistemas neuropeptidérgicos para el estudio de este proceso se ha consolidado como una herramienta claramente eficaz, permitiendo el avance en el conocimiento en este campo de estudio. Actualmente, muchos neuropéptidos se utilizan como marcadores de diferenciación terminal y el estudio de este tipo de sistemas, cuyo proceso de especificación se desconoce, resulta fundamental para el descubrimiento de mecanismos de desarrollo aún inexplorados. En la presente tesis doctoral se ha caracterizado el sistema orcokininérgico como nuevo modelo de especificación neuronal. Para ello, se comenzó analizando su patrón de expresión y sus mecanismos básicos de desarrollo.

### **1. Patrón de expresión de la Orcokinina A en los diferentes estadios del desarrollo de la CNV**

El estudio del patrón de expresión del neuropéptido Orcokinina A en la CNV de *D. melanogaster* se llevó a cabo mediante la realización de inmunotinciones sobre dicho tejido en diferentes etapas del desarrollo. El anticuerpo utilizado fue generado específicamente para este estudio por la compañía Eurogentec mediante la inmunización con los péptidos nh2-CSQSEFKTKYSVKQ-conh2 y ac-SKLKRNFDKASA+C-conh2 de un espécimen de conejo y la posterior purificación del suero obtenido. Para la elección de dichos péptidos se tomó como referencia el diseño experimental utilizado por el grupo del Dr. Kwon (Chen, J. *et al.*, 2015) para la obtención de un anticuerpo contra el mismo neuropéptido.

Como muestran los resultados, dicho anticuerpo no se hacía evidente hasta el final del estadio 18 h AEL, pudiendo entonces distinguir únicamente 10 células en la CNV que se mantenían durante toda la etapa larvaria. Estas células se localizaban en los segmentos abdominales A1-A5, distinguiéndose una única neurona por hemisegmento (ver **Figura 17A-C**). Por su parte, en el ganglio ventral adulto

solamente encontramos inmunotinción en dos pares de neuronas (ver **Figura 17D**). Estos resultados son concordantes con los estudios previos del grupo del Dr. Kwon (Chen, J. *et al.*, 2015), quien describió estas neuronas y las nombró como orcoA-LA (células larvarias) y orcoA-VNC (células adultas).



**Figura 17. Patrón de expresión del neuropéptido Orcokina A en la CNV de *D. melanogaster* en diferentes estadios del desarrollo.** Tinción por inmunofluorescencia indirecta contra Orcokina A (rojo) y Dimm (verde) de la CNV en diferentes estadios: **(A)** 18 h AEL temprano, **(B)** larva I, **(C)** larva III y **(D)** adulto. En todos los casos, en la esquina inferior izquierda se muestra un aumento de las células del cuarto hemisegmento abdominal izquierdo (A4). **(A'-D')** Esquemas representativos de los resultados. Las neuronas orcokininérgicas forman parte de un grupo de 4 neuronas peptidérgicas con inmunotinción positiva para Dimm, de las cuales sólo una expresa Orcokina A. Este grupo de neuronas se empieza a hacer reconocible a partir del estadio embrionario 18 h AEL. Puede ser identificado en los hemisegmentos abdominales 1 a 4 en posición distal con respecto al eje de simetría A-P. Este patrón de expresión se mantiene durante los tres estadios larvarios. En el organismo adulto, el número de células Orcokina A positivas se reduce a un par por hemiganglio. Escala: 20 µm.

Por tanto, el anticuerpo parecía reproducir fielmente la expresión del neuropéptido Orcokinina A y podía ser utilizado para los estudios siguientes. Además, el patrón de expresión claro, estructurado y restringido evidenciaba que estas neuronas eran buenas candidatas como sistema neuropeptidérgico modelo para el estudio de la especificación celular en el SNC.

Por otro lado, cabía esperar que estas células fueran inmunorreactivas para la proteína Dimm, puesto que éste se considera un factor de transcripción maestro en la adquisición de destinos neuropeptidérgicos. Tras realizar una inmunotinción contra dicho factor, los resultados corroboraron esta hipótesis y además revelaron otro aspecto interesante. Las neuronas de Orcokinina A forman parte de un grupo de cuatro neuronas peptidérgicas (ver **Figura 17A-D**), siendo leucokinina y CCAP el destino terminal de otras dos (datos no mostrados) y permaneciendo el destino de la última aún desconocido.

**Estos experimentos muestran, por tanto, que el neuropéptido Orcokinina A se expresa a partir del estadio embrionario 18 h AEL y hasta el estadio larva III en 10 células abdominales (A1-A5) de la CNV de *D. melanogaster* (orcoA-LA). El patrón de expresión se reduce durante la metamorfosis, pudiendo observar únicamente 4 células en el organismo adulto (orcoA-VNC).**

## **2. Proyecciones eferentes de las neuronas orcokininérgicas en la pared abdominal de la larva de estadio III**

La Orcokinina A fue descrita en el cangrejo de río *O. limosus* como un factor mioestimulante (Stangier *et al.*, 1992). Además, las inmunotinciones realizadas previamente con el anticuerpo contra Orcokinina A mostraban que estas células presentaban inervación fuera del SNC de *D. melanogaster*. Ambos datos indicaban que las células de Orcokinina A podían tener una función motora, por lo que decidimos comprobar si formaban uniones neuromusculares (NMJs, del inglés *neuromuscular junctions*) en la pared abdominal larvaria.

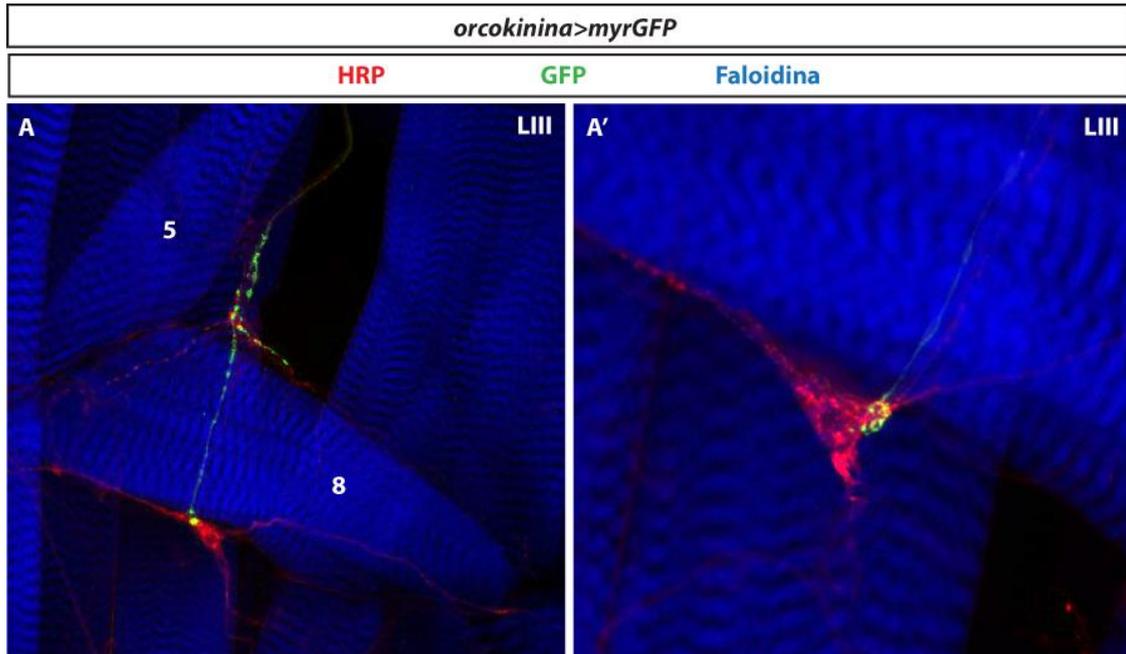
Para ello, se realizó una disección *en filete* en ejemplares *Orcokinina-Gal4>UAS-myrGFP* en estadio larva III. Este tipo de disección conserva en perfectas condiciones el SNC, los nervios periféricos y la musculatura de la pared abdominal de la larva. El

genotipo utilizado permitía la expresión de la proteína GFP miristilada en la membrana de las células de Orcokina A. Por ello, se procedió a la realización de una inmunotinción sobre esta preparación contra la proteína GFP con el fin de obtener una señal más intensa que la de su fluorescencia nativa, permitiendo así la identificación de las neuronas orcokininérgicas, HRP para la monitorización de neuronas sensoriales, motoneuronas y NMJs, y faloidina para la identificación de las fibras musculares. Posteriormente se visualizaron las muestras mediante microscopía de barrido confocal. Este experimento fue realizado en colaboración con el Dr. Haluk Lacin (HHMI *Janelia Research Campus*, EE UU).

Los músculos se clasifican por su orientación como longitudinales, transversales u oblicuos; y en función de la capa que ocupan como externos, intermedios o internos. No obstante, otros factores como su tamaño y su inervación también son relevantes para su correcta identificación. La posición y la orientación de los músculos en la pared abdominal larvaria se repite en cada hemisegmento desde A2 hasta A7. Esta característica, sumada a su reducido número (30 músculos por hemisegmento) hace mucho más sencilla su identificación y nomenclatura, siendo clásicamente designado cada uno de ellos con un número del 1 al 30 (Bate, 1990).

Los resultados obtenidos mostraron que las proyecciones eferentes de las neuronas de Orcokina A se dirigían a dos fibras musculares de la pared larvaria. La primera, tenía una localización oblicua y externa, insertándose en el borde posterior del segmento. Por sus características, determinamos este primer músculo como el número 5. La segunda fibra, transversal y externa, se insertaba posteriormente en el mismo lugar que la primera y contactaba anteriormente con el extremo del músculo 5 correspondiente al segmento previo al observado. Determinamos este segundo músculo como el número 8.

No obstante, la sinapsis no se producía en la NMJ, dado que no se observaban botones sinápticos asociados al tejido muscular. En cambio, sí pudimos observar sinapsis con otras células asociadas a este par de músculos y positivas para la tinción anti-HRP (ver **Figura 18A**). Cabe destacar que el tipo de sinapsis era en todos los casos axosómica (ver **Figura 18A**). Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, no podríamos considerar motoneuronas a las células de la Orcokina A.



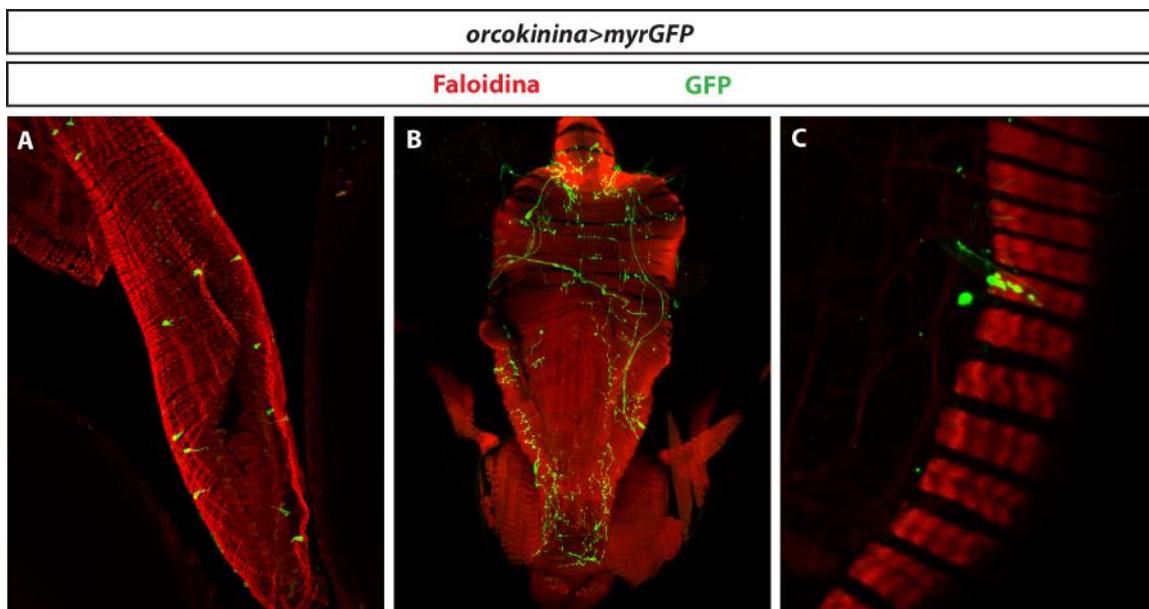
**Figura 18.** Proyecciones eferentes de las neuronas de Orcokininina A en la pared muscular de la larva de estadio III de *D. melanogaster*. Inmunotinción de un ejemplar *Orcokininina-Gal4>UAS-myrGFP* con anti-GFP, anti-HRP y faloidina. **(A)** Posición de la proyección axonal de la célula orcokininérgica (verde) con relación a las fibras musculares (azul) número 5 y 8. **(B)** Detalle de la sinapsis axosomática de la neurona de Orcokininina A y una célula positiva para HRP (rojo) asociada al músculo 8.

Estos resultados evidencian que las proyecciones eferentes de las células de Orcokininina A realizan sinapsis de tipo axosomático con células asociadas a los músculos 5 y 8 de la pared muscular de la larva de estadio III de *D. melanogaster*. Por tanto, no pueden ser consideradas motoneuronas.

### 3. Proyecciones eferentes de las neuronas orcokininérgicas en el organismo adulto

El patrón de expresión de las células orcokininérgicas cambia durante la metamorfosis, pasando de observar 10 células por CNV larvaria a únicamente 4 por ganglio ventral adulto. Dado que se habían analizado las proyecciones eferentes de la Orcokininina A en estadio larvario III, decidimos realizar el mismo experimento en estadio adulto y comprobar si las eferencias eran también diferentes.

Para responder esta pregunta se utilizaron ejemplares adultos con genotipo *orcokininina-Gal4>UAS-myrGFP* para facilitar la monitorización mediante GFP de las proyecciones eferentes de las células orcokininérgicas. Por otro lado, se utilizó faloidina conjugada con TexasRed-X con el objetivo de identificar mediante fluorescencia las diferentes estructuras y tejidos del abdomen completo. Finalmente, se visualizaron las muestras mediante microscopía de barrido confocal. Este experimento se realizó en colaboración con el Dr. Igor Siwanowicz (HHMI *Janelia Research Campus*, EE UU).



**Figura 19. Proyecciones eferentes de las neuronas marcadas con GFP en un organismo adulto de *D. melanogaster* con genotipo *Orcokininina-Gal4>UASmyr-GFP*.** Identificación de los microfilamentos de actina del abdomen mediante faloidina conjugada con Texas Red-X. **(A)** Somas celulares (verde) distribuidos por la pared del intestino. **(B)** Inervación nerviosa (verde) de la región más posterior del tracto digestivo. **(C)** Proyecciones de las células orcokininérgicas (verde) en la musculatura de la pared abdominal.

Las imágenes obtenidas mostraron expresión de GFP en algunos cuerpos celulares repartidos a lo largo del intestino (ver **Figura 19A**). Esta señal parece corresponder a células endocrinas secretoras del péptido Orcokininina B, descritas previamente por el grupo del Dr. Kwon (Chen, J. *et al.*, 2015), dado que el promotor asociado a Gal4 reproduce en este *driver* el patrón de expresión de ambas isoformas. Por otro lado, se encontraron abundantes fibras inervando la parte más posterior del tracto digestivo,

incluyendo el recto, los esfínteres y la válvula rectal (ver **Figura 19B**); así como en la pared muscular abdominal (ver **Figura 19C**). Por tanto, a pesar de que el patrón de expresión de la Orcokinina A se reduce en el adulto de *D. melanogaster*, podemos observar que se mantiene la inervación en la musculatura abdominal y que, además, aparecen nuevas proyecciones eferentes en otros compartimentos.

**A partir de estos resultados se extrae que las células orcokininérgicas en el adulto de *D. melanogaster* inervan el tracto digestivo, principalmente el recto y los esfínteres, y la musculatura de la pared abdominal. Además, se encuentran somas celulares a lo largo del intestino, pertenecientes a células secretoras de Orcokinina B.**

#### **4. Identificación del NB progenitor de las neuronas secretoras de Orcokinina A en la CNV**

Los NBs son las células madre progenitoras de todo el SN. Cada hemisegmento de la CNV en desarrollo se compone de 30 NBs equivalentes que se distribuyen físicamente en 7 filas y 6 columnas. De esta posición relativa deriva su nomenclatura. Esta característica no es irrelevante, puesto que el NB de origen dota a cada célula de una información espacial que finalmente resulta relevante en la adquisición de su identidad terminal. Por ello, el estudio del NB progenitor resulta fundamental para la caracterización del proceso de diferenciación de cualquier célula durante el desarrollo embrionario.

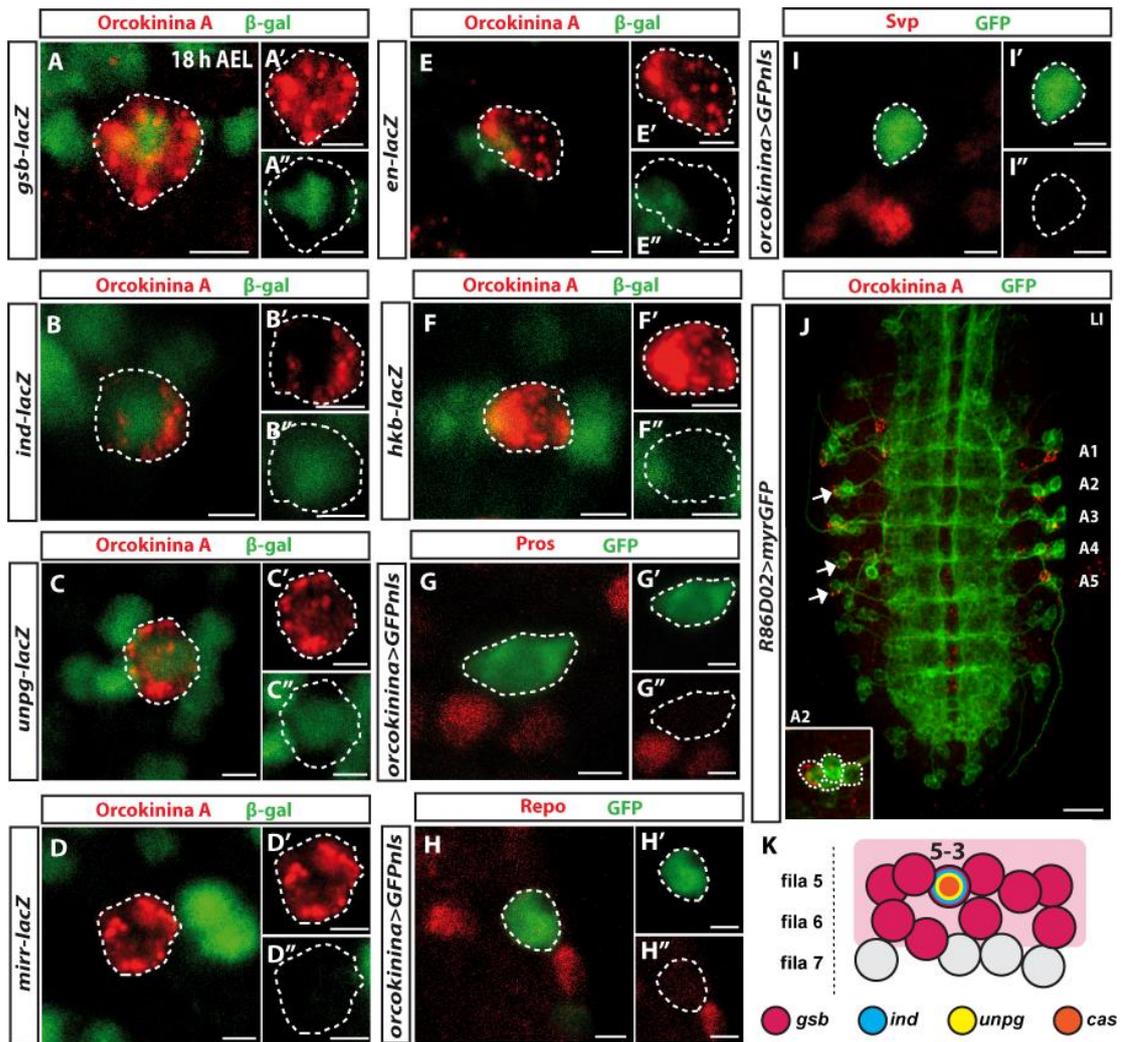
Dada la relevancia de esta información, existen numerosos estudios dedicados al establecimiento de una metodología para la identificación del NB progenitor de una célula nerviosa. Gracias a ellos se ha podido establecer un código de marcadores que permiten la identificación de cada uno de los NBs en función de la expresión de una combinación de determinadas y característicos factores de transcripción (Doe, 1992; Skeath, J. B. y Carroll, 1992; Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999a).

Lo más interesante de esta metodología es que la expresión de estos marcadores suele ser heredada por las células que nacen a partir de cada uno de los NBs. Por tanto,

el estudio de estos marcadores en las células postmitóticas permite inferir la célula de origen según su expresión positiva o negativa para cada uno de ellos. No obstante, este recurso empieza a perder fiabilidad a partir del estadio 13 del desarrollo, ya que en ese momento las neuronas comienzan a modificar su maquinaria transcripcional, pudiendo dejar de expresar alguno de los marcadores necesarios para la identificación de su NB de origen o adquirir marcadores nuevos. Dado que la expresión de la Orcokinina A no es detectable hasta el estadio 18 h AEL y no se conocían marcadores de expresión más temprana para la identificación de estas células, el estudio fue realizado en dicho estadio embrionario.

Para llevar a cabo el análisis se escogieron prioritariamente aquellos marcadores que permitían descartar un gran número de NB. Posteriormente, se seleccionaron marcadores más específicos en función de lo obtenido previamente. En orden, todos los factores de transcripción analizados fueron: Mirror (Mirr), Engrailed (Eng), Gooseberry (Gsb), Hucklebein (Hkb), Intermediate neuroblast defective (Ind), Prospero (Pros), Reversed polarity (Repo), Unplugged (Unpg), Casto (Cas) y Seven up (Svp). Para ello, se utilizaron dos estrategias diferentes: la inmunofluorescencia indirecta contra la proteína en los casos en los que fuera posible y el uso de construcciones reporteras (GFP y lacZ) en caso de no contar con el anticuerpo necesario o por la incompatibilidad de huéspedes para la colocalización con el anticuerpo contra Orcokinina A.

Según los resultados obtenidos, las células orcokininérgicas presentaban inmunodetección positiva para los factores Gsb, Ind, Unpg (ver **Figura 20A, B y C**, respectivamente) y Cas (ver **Figura 20I** del apartado 5 de *Resultados*); y negativo para Mirr, En, Hkb, Pros, Repo y Svp (ver **Figura 20D, E, F, G e I**, respectivamente). Estos datos sugerían fuertemente que el NB 5-3 podría ser el progenitor de estas neuronas, ya que era el único que presentaba una expresión de marcadores congruente con los resultados observados en el experimento.



**Figura 20.** Estudio de marcadores para la identificación del NB progenitor de las neuronas de Orcokinin A. Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) y  $\beta$ -galactosidasa (verde) en embriones de estadio 18 h AEL cuyo genotipo reproduce la expresión de dicha proteína reportera en función de la expresión del promotor de los siguientes genes: **(A)** *Gsb*, **(B)** *Ind*, **(C)** *Unpg*, **(D)** *Mirr*, **(E)** *En* y **(F)** *Hkb*. Inmunotinción en embriones de estadio 18 h AEL con genotipo *Orcokinin-Gal4>UAS-GFPnls* contra GFP (verde) y los siguientes factores de transcripción (rojo): **(G)** *Pros*, **(H)** *Repo* y **(I)** *Svp*. Escala: 2  $\mu$ m. **(J)** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) y GFP (verde) en larvas de estadio I cuyo genotipo reproduce la expresión de dicha proteína reportera en función de la expresión del *driver* R86D02. Este *driver* dirige la expresión de la proteína reportera a parte del linaje del NB 5-3. Las flechas muestran la colocalización de ambas señales, lo cual puede verse en mayor detalle en la imagen ampliada en la esquina inferior izquierda, correspondiente a la célula orcoquinérgica del hemisegmento A2 izquierdo. Escala: 20  $\mu$ m. **(K)** Esquema de la expresión de los marcadores característicos del NB 5-3 así como de su posicionamiento con respecto a los NBs cercanos del mismo hemisegmento.

No obstante, debido a lo anteriormente mencionado, y dado que estos datos fueron recogidos a partir de embriones de estadio 18 h AEL, el resultado no era por sí mismo suficiente para asegurar la procedencia de las neuronas de Orcokinina A. Por ello, en colaboración con el Dr. Haluk Lacin y el Dr. James Truman (HHMI *Janelia Research Campus*, EE UU), se analizó el patrón de expresión de este neuropéptido en el dominio del *driver* R86D02. Esta construcción Gal4 permite dirigir la expresión de cualquier proteína reportera a una parte del linaje del NB 5-3 en estadios embrionarios y larvarios (Lacin y Truman, 2016). En este caso, se utilizó para dirigir la expresión de GFP en las células de interés y realizar posteriormente una inmunotinción contra Orcokinina A buscando una posible colocalización de ambas señales.

El resultado obtenido mostró que efectivamente existía una colocalización de ambas señales (ver **Figura 20f**), evidenciando de nuevo que las células de Orcokinina A parecían provenir del NB 5-3.

**Por tanto, los resultados obtenidos con esta serie de experimentos parecen indicar que las células secretoras del neuropéptido Orcokinina A provienen del NB 5-3.**

## **5. Implicación de los genes temporales en la especificación de las neuronas de Orcokinina A en la CNV**

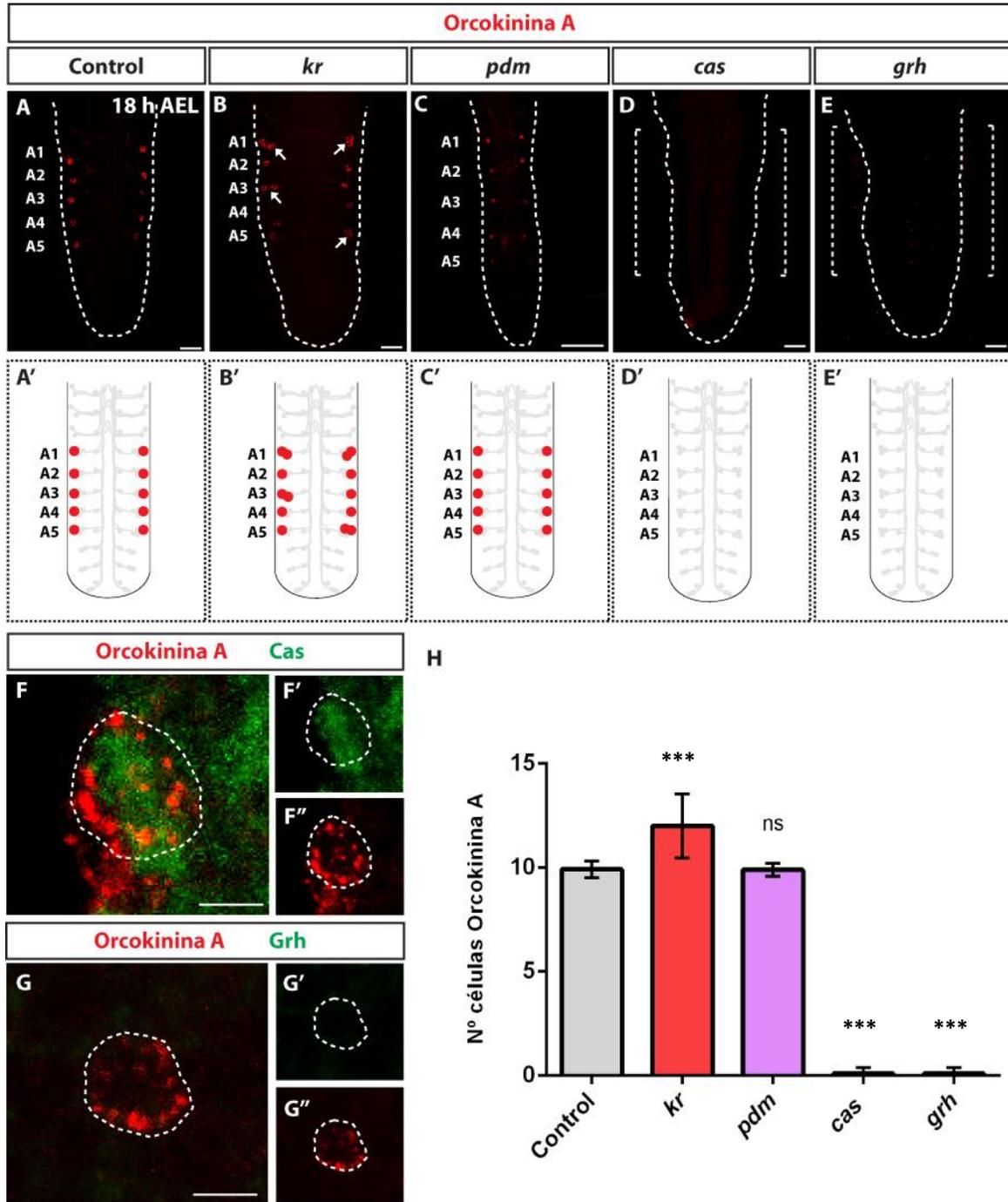
Los genes temporales resultan fundamentales para dotar de identidad temporal a las células en desarrollo. Cada uno de ellos define una ventana temporal de división del NB y su expresión es heredada por toda la progenie que derive de éste en dicho periodo. De esta forma, estos factores de transcripción contribuyen a la determinación del destino celular de las neuronas.

### 5.1. Análisis de mutantes de falta de función de los genes temporales

Dado que existe una compleja regulación intrínseca de estos factores, la activación de cada uno de ellos no es estrictamente dependiente de la actividad del anterior. No obstante, la pérdida de expresión de un factor temporal implica modificaciones en el programa de desarrollo de las células correspondientes, las cuales se especifican según el destino marcado por el factor temporal anterior o posterior. Por ello, el estudio de mutantes de falta de función de los factores temporales permite la identificación de la ventana temporal en la que se produce la división del NB. En ausencia del factor temporal implicado no se produce la especificación de las células de estudio. En base a esta premisa, se realizaron inmunotinciones contra el neuropéptido Orcokinina A en embriones de estadio 18 h AEL sobre el fondo de los distintos factores temporales. El estudio no pudo llevarse a cabo en mutantes *hb* debido a que se trata de una alteración letal que impide que los embriones alcancen un estadio embrionario suficientemente avanzado como para identificar las neuronas orcokininérgicas.

Los resultados obtenidos mostraron expresión de Orcokinina A en ausencia de Kr (ver **Figura 21B**) y pdm (ver **Figura 21C**), mientras que la señal era totalmente ausente en mutantes *cas* (ver **Figura 21D**) y *grh* (ver **Figura 21E**). Por tanto, estos datos sugerían fuertemente que el NB progenitor se dividía en una ventana temporal mixta *cas-grh* para dar lugar a las células de Orcokinina A.

Con el objetivo de obtener más información acerca del papel de los genes temporales en el desarrollo de estas neuronas, se realizaron inmunotinciones contra ambos factores de transcripción buscando su expresión en estas células. Como puede observarse en la **Figura 21**, las células de Orcokinina A muestran expresión de Cas (ver **Figura 21F**) pero no de Grh (ver **Figura 21G**) en estadio 18 h AEL. Como se ha explicado anteriormente, las células en desarrollo pueden modificar su patrón transcripcional, de forma que pueden dejar de expresar determinados factores en estadios tardíos que han sido fundamentales para su especificación en estadios tempranos. Por ello, el experimento de falta de función resulta más concluyente que el de colocalización en la determinación de la ventana temporal de división de estas neuronas.



**Figura 21. Estudio de la identidad temporal de las neuronas de Orcokinin A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control, (B) *Kr*, (C) *pdm*, (D) *cas*, (E) *grh*. Escala: 20  $\mu$ m. Las flechas marcan células ectópicas. (A'-E') Esquemas representativos de los resultados observados. (F) Expresión del factor temporal Cas (verde) en las células de Orcokinin A (rojo). (G) Ausencia de expresión del factor temporal Grh (verde) en las células de Orcokinin A (rojo). Escala: 2  $\mu$ m. (H) Representación del número medio de células de Orcokinin A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)= $p < 0,001$ ; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

## 5.2. Análisis de la sobreexpresión de los genes temporales

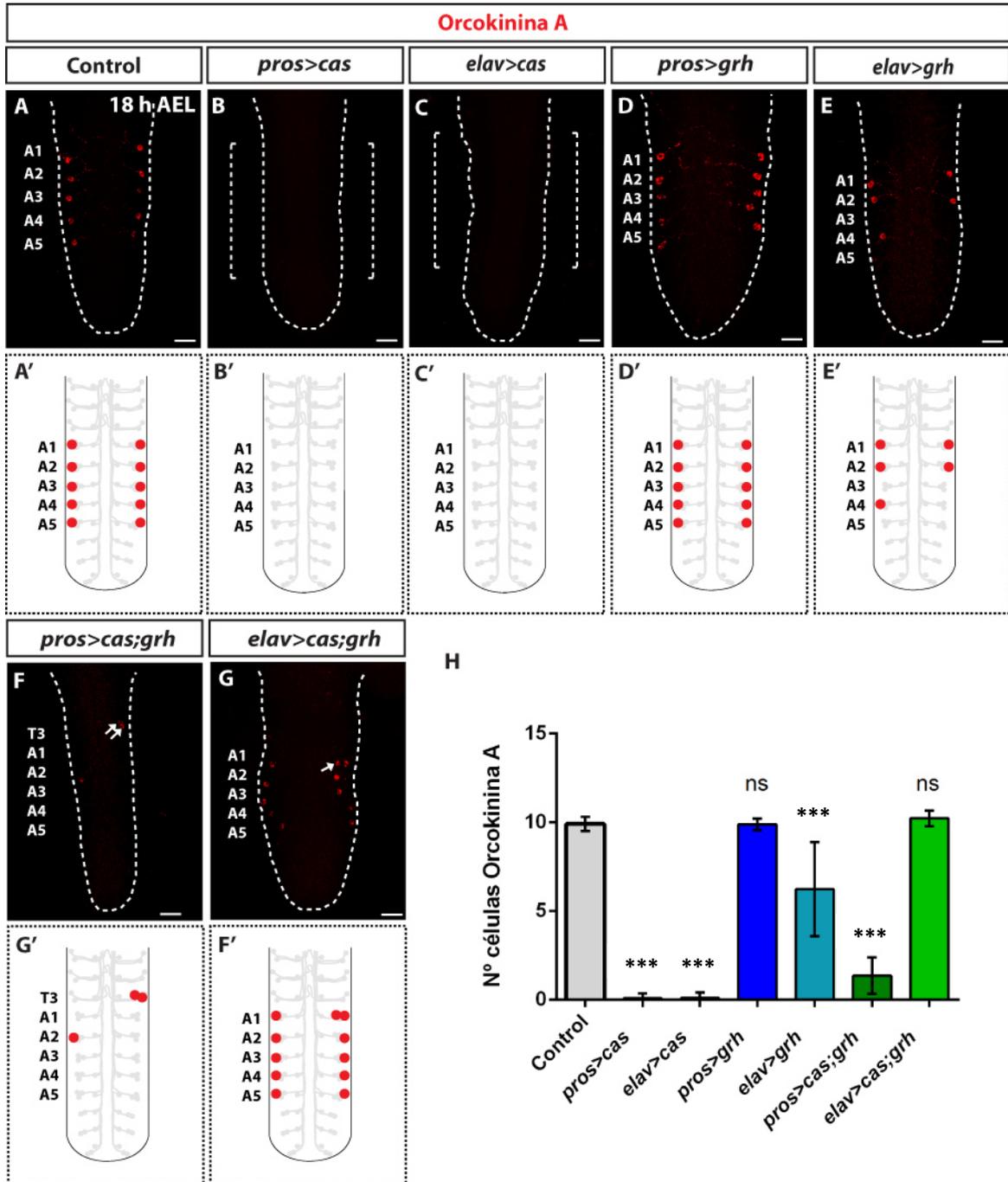
En este punto, los resultados parecían indicar que la expresión de *Cas* y *Grh* era necesaria para la especificación del destino orcokininérgico. No obstante, cabía la posibilidad de que, además de necesarios, fueran también suficientes para la adquisición de dicho destino. Por ello, se realizó la sobreexpresión de ambos genes.

Recientemente se ha descrito que los genes temporales pueden jugar un doble papel en la determinación del destino neuronal durante el desarrollo, pudiendo actuar a nivel de NB o de célula postmitótica (Stratmann *et al.*, 2016). Para discernir entre ambas posibilidades se utilizaron dos *drivers* diferentes para su sobreexpresión: *pros-Gal4* (NB y CMG) y *elav-Gal4* (fundamentalmente neurona postmitótica).

El análisis de los resultados obtenidos reveló que la sobreexpresión del gen *cas* desde ambos *drivers* tenía como resultado la ausencia de señal con el anticuerpo contra Orcokina A (ver **Figura 22B y C**). Por otro lado, la sobreexpresión de *grh* desde *elavGal4* tenía un efecto menos acusado, aunque la reducción del número de células orcokininérgicas en la CNV era significativa con respecto al control (ver **Figura 22E**). En el caso de los ejemplares *pros-Gal4>UAS-grh*, no se observaron diferencias significativas (ver **Figura 22D**). Finalmente, la sobreexpresión de los genes temporales *hb* y *pdm* no produce fenotipo alguno (datos no mostrados).

Como se ha visto anteriormente, la sobreexpresión de los genes temporales puede ocasionar alteraciones no conocidas que afecten al destino terminal de las células implicadas, como puede ser el desplazamiento temporal de una determinada ventana. Dado que la hipótesis de partida atribuye la identidad temporal de estas células a una combinación de ambos genes, los resultados obtenidos podrían ser explicados por el desplazamiento hacia una ventana simple *cas* o *grh* del programa de desarrollo, en lugar de hacia la elongación de una ventana mixta *cas-grh*.

Por esta razón, se decidió estudiar el efecto de la sobreexpresión conjunta de los dos genes, de nuevo, desde ambos *drivers*: *pros-Gal4* y *elav-Gal4*.



**Figura 22. Estudio de la identidad temporal de las neuronas de Orkoinina A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orkoinina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *pros-Gal4>UAS-cas*, **(C)** *elav-Gal4>UAS-cas*, **(D)** *pros-Gal4>UAS-grh*, **(E)** *elav-Gal4>UAS-grh*, **(F)** *pros-Gal4>UAS-cas; UAS-grh* y **(G)** *elav-Gal4>UAS-cas; UAS-grh*. Las flechas marcan células ectópicas. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-G')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(H)** Representación del número medio de células de Orkoinina A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*= $p < 0,001$ ; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos revelaron que la sobreexpresión de *cas* y *grh* a nivel de NB ocasionaba la incorrecta especificación de las células de Orcokinina A, apareciendo un número muy significativamente menor de las mismas con respecto al control. Sin embargo, en algunos casos se producía la especificación de más de una célula en el hemisegmento e incluso aparecía inmunotinción para Orcokinina A en el segmento torácico T3 (ver **Figura 22F**). No obstante, estas alteraciones no resultaron significativas estadísticamente.

Dado que la regulación de los genes temporales resulta aún un tema de controversia, no podríamos asegurar que la sobreexpresión de ambos genes tuviera como consecuencia el establecimiento de una ventana mixta de división en este NB. Por tanto, mecanismos de regulación internos entre los factores Cas y Grh podrían estar generando alteraciones que afectarían al desplazamiento de ventanas.

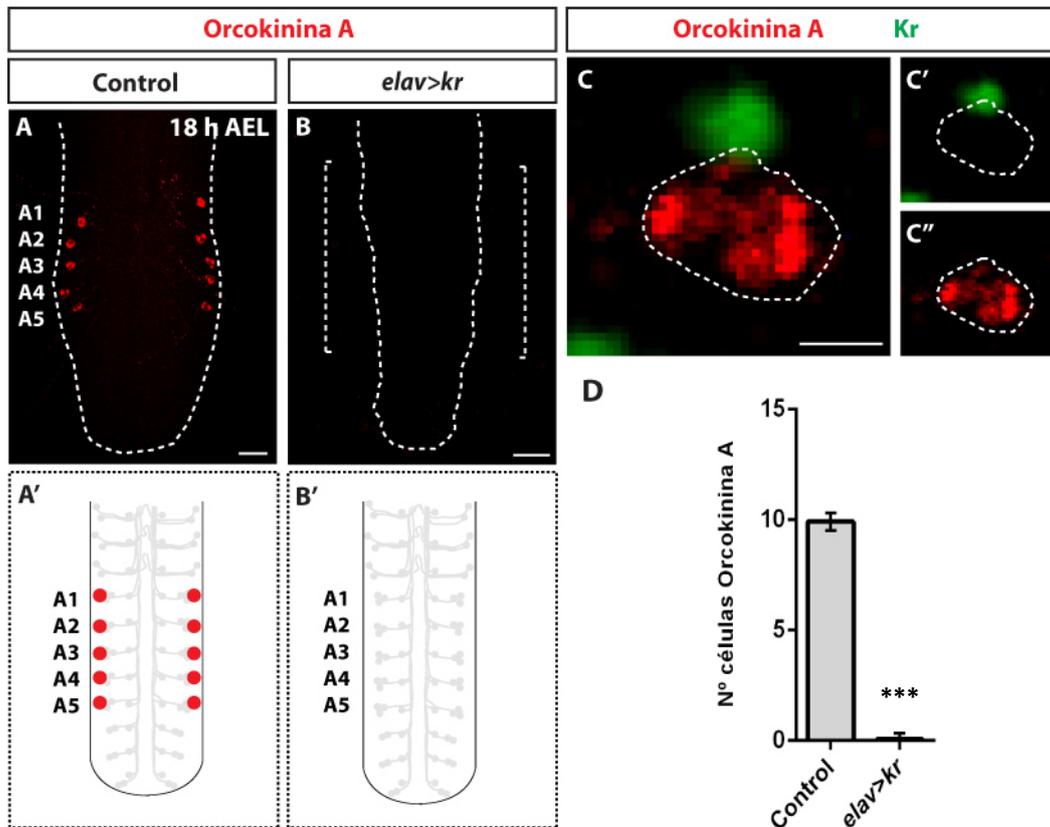
Por otro lado, la sobreexpresión de estos dos genes a nivel postmitótico no tuvo ningún efecto sobre el patrón de expresión de neuropéptido. Algunos especímenes aislados presentaban más de una célula orcokininérgica en algún hemisegmento pero, de nuevo, no resultó un dato estadísticamente significativo (ver **Figura 22G**).

Estos resultados, por tanto, parecen indicar que la mera sobreexpresión de *cas* y *grh* no es suficiente para activar el programa de especificación de la Orcokinina A, ni en otras células del linaje del NB 5-3, ni fuera de este.

### **5.3. Análisis del papel de *Kr* en la especificación de las neuronas de Orcokinina A**

Cabe también destacar que en el estudio de los mutantes de falta de función de los genes temporales (ver 5.1. *Análisis de mutantes de falta de función de los genes temporales*) se observó un aumento significativo del número de células positivas para Orcokinina A en el mutante *Kr* (ver **Figura 23B**). Este resultado sugiere un posible papel postmitótico de este factor temporal en la determinación de este destino neuropeptidérgico, por lo que se procedió a su análisis más detallado. Los resultados obtenidos muestran la ausencia total de señal del anticuerpo contra Orcokinina A en

ejemplares con genotipo *elav-Gal4>UAS-Kr* (ver **Figura 23B**), así como la ausencia de expresión de Kr en estas células en estadio 18 h AEL (ver **Figura 23C**).



**Figura 23.** Estudio del papel postmitótica del gen temporal *Kr* en la especificación terminal de las neuronas de Orcokininina A. Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokininina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control y (B) *elav-Gal4>UAS-Kr*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. (A'-B') Esquemas representativos de los resultados observados. (C) Ausencia de expresión del factor temporal Kr (verde) en las células de Orcokininina A (rojo). Escala: 2  $\mu$ m. (D) Representación del número medio de células de Orcokininina A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)= $p < 0,0001$ ). Prueba U de Mann-Whitney.

A la luz de los resultados obtenidos, las neuronas de Orcokininina A parecen nacer en una ventana temporal mixta *cas-grh*. Sin embargo, la sobreexpresión de estos genes temporales no resulta suficiente para la generación de células ectópicas con este mismo destino terminal. En cambio, la ausencia del factor temporal Kr parece ser necesaria para la determinación del destino neuropeptidérgico Orcokininina A.

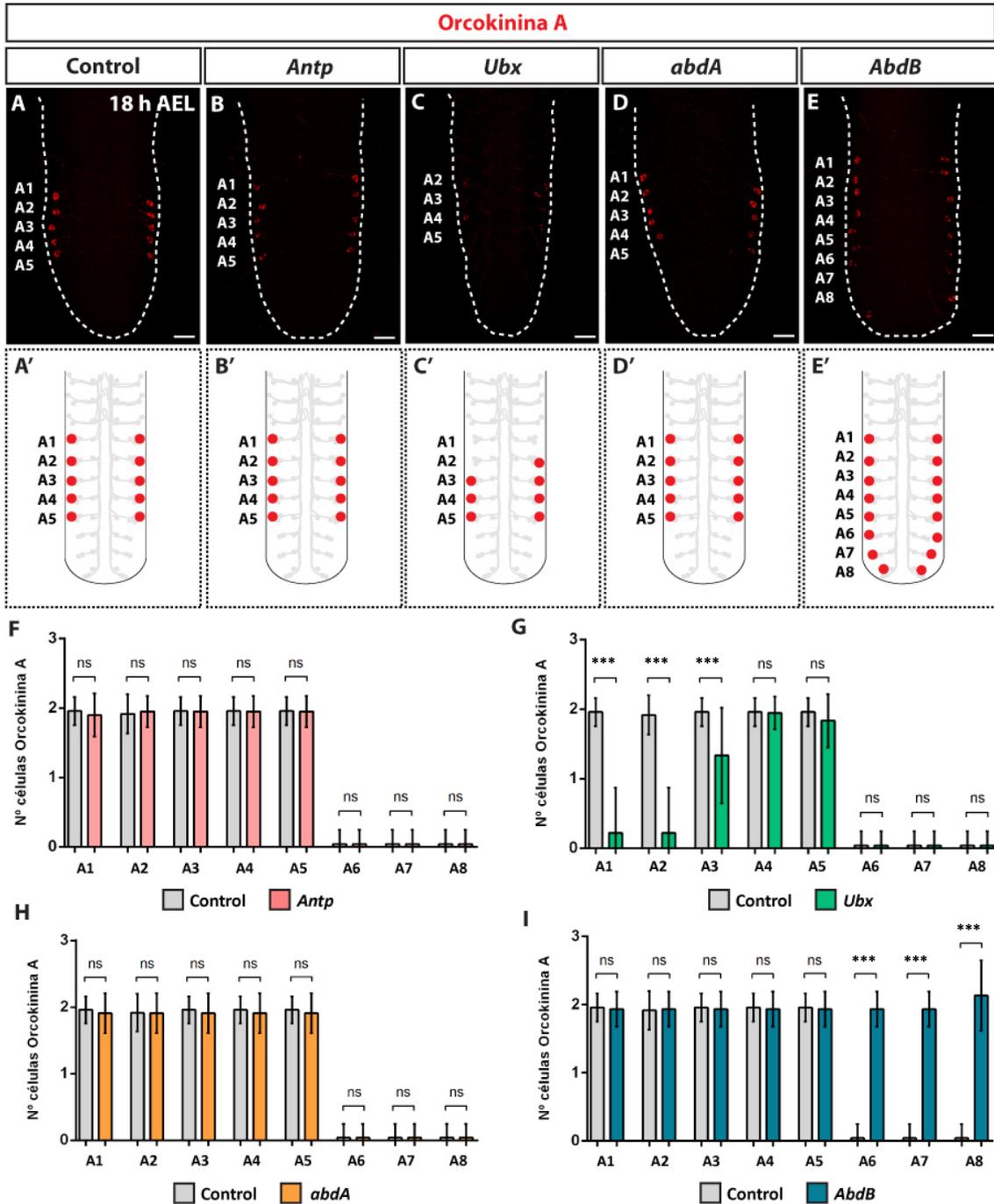
## 6. Implicación de los genes Hox en la especificación de las células de Orcokinina A

Los genes Hox juegan un papel fundamental en el establecimiento de la identidad de segmento durante el desarrollo embrionario. Se expresan en forma de gradientes de concentración a lo largo del eje AP y, de esta forma, dotan de información espacial a aquellas células que ocupan sus territorios. La falta de función de estos genes tiene como consecuencia la modificación de los linajes celulares, bien en el número de células o bien en la identidad de las mismas, dado que sus territorios de acción quedan bajo el gobierno de los Hox adyacentes (Bello *et al.*, 2003; Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Karlsson *et al.*, 2010; Suska *et al.*, 2011).

### 6.1. Análisis de mutantes de falta de función de los genes Hox

Con el fin de identificar el papel de los genes homeóticos en la especificación de las células de Orcokinina A, se realizaron inmunotinciones contra dicho neuropéptido en embriones de estadio 18 h AEL con fondo mutante para los distintos genes Hox. Dado que estos factores establecen una identidad segmental, se atendió al número de células positivas para la inmunotinción en cada segmento de la CNV con respecto al control.

Los resultados mostraron que no existían alteraciones significativas en los mutantes para los genes *Antp* (ver **Figura 24B**) y *abdA* (ver **Figura 24D**). En cambio, el análisis del mutante *Ubx* reveló una disminución en el número de células de Orcokinina A en los segmentos abdominales A1 y A2 con respecto al control (ver **Figura 24C**). Finalmente, los ejemplares mutantes para el gen *AbdB* contaban con células positivas para Orcokinina A en todos los segmentos abdominales, desde A1 hasta a A8 (ver **Figura 24E**).



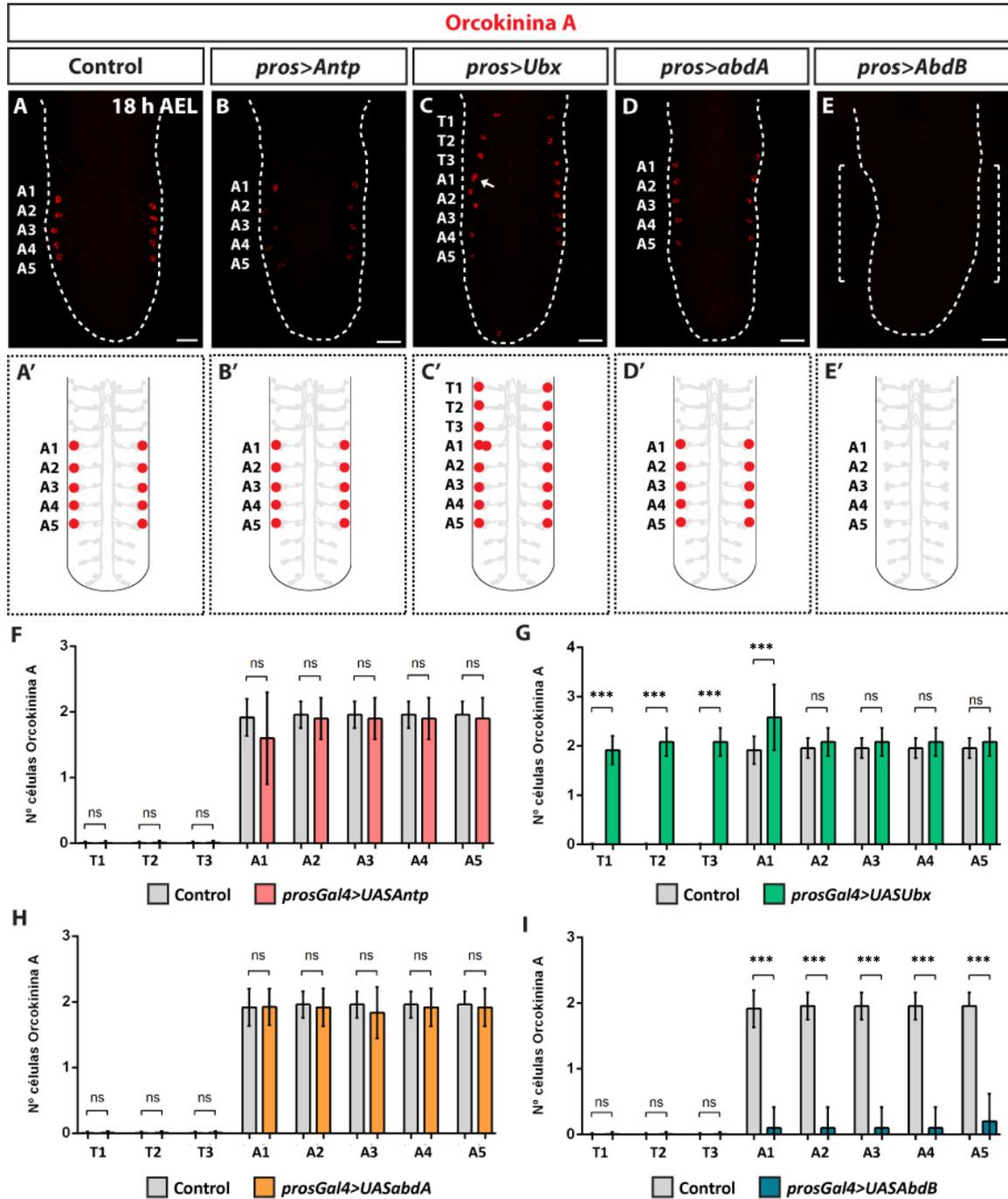
**Figura 24.** Efecto de la falta de función de los genes Hox en la especificación de las neuronas de Orcokinin A. Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control, (B) *Antp*, (C) *Ubx*, (D) *abdA* y (E) *AbdB*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. (A'-E') Esquemas representativos de los resultados observados. (F-I) Representación del número medio de células de Orcokinin A por segmento de la CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control (n $\geq$ 10 CNVs en todos los genotipos): (F) *Antp*, (G) *Ubx*, (H) *abdA* y (I) *AbdB*. Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)=p<0,001; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

## 6.2. Análisis de la sobreexpresión de los genes HOX

Posteriormente, se llevó a cabo la sobreexpresión de estos mismos genes Hox desde dos *drivers* diferentes: *pros-Gal4* y *elav-Gal4*. Dado que la actividad de estos genes no es estática durante el desarrollo y pueden actuar tanto a nivel de NB como de célula postmitótica, el objetivo de estas sobreexpresiones era discernir qué papel juega cada uno de ellos y en qué momento.

Por un lado, la sobreexpresión de los genes HOX desde el *driver prosGal4* dio lugar a los siguientes resultados:

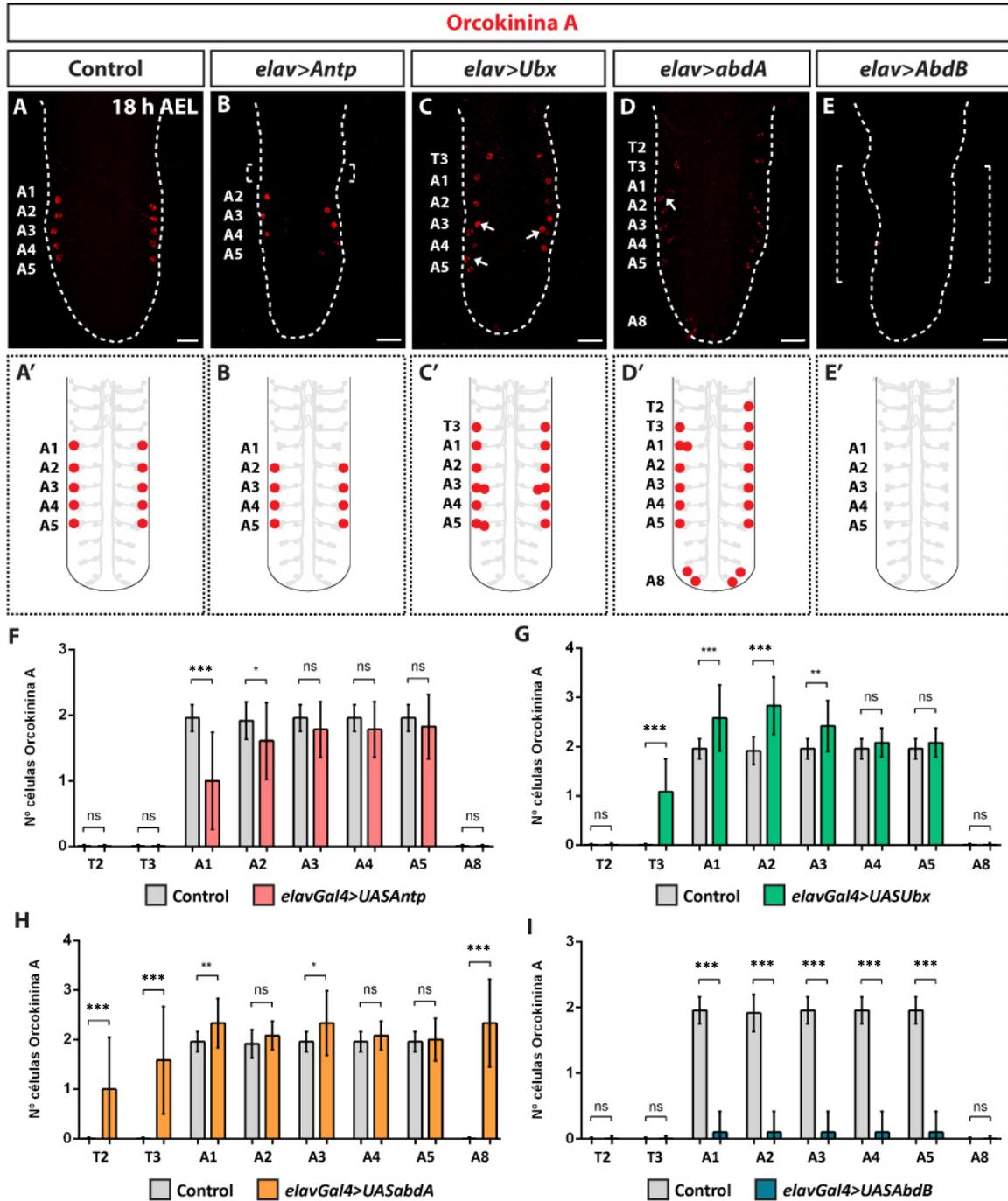
- La sobreexpresión de los genes *Antp* y *abdA* no produjo cambios significativos en el número de células de Orcokinina A en ninguno de los segmentos de la CNV con respecto al control (ver **Figura 25B y D**).
- La sobreexpresión del gen *Ubx* tuvo como consecuencia la aparición de células ectópicas positivas para Orcokinina A en los tres segmentos torácicos de la CNV (T1-T3). Además, se observó un aumento significativo del número de células orcokininérgicas en el segmento A1 con respecto al control (ver **Figura 25C**).
- La sobreexpresión del gen *AbdB* supuso la desaparición casi total de células de Orcokinina A en todos los segmentos de la CNV (ver **Figura 25E**).



**Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de los genes Hox a nivel de NB en la especificación de las neuronas de Orcokinin A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control, (B) *prosGal4>UAS-Antp*, (C) *prosGal4>UAS-Ubx*, (D) *prosGal4>UAS-abdA* y (E) *prosGal4>UAS-AbdB*. Las flechas marcan células ectópicas. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. (A'-E') Esquemas representativos de los resultados observados. (F-I) Representación del número medio de células de Orcokinin A por segmento de la CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control (n $\geq$ 10 CNVs en todos los genotipos): (F) *prosGal4>UAS-Antp*, (G) *prosGal4>UAS-Ubx*, (H) *prosGal4>UAS-abdA* y (I) *prosGal4>UAS-AbdB*. Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)= $p < 0,001$ ; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

Por otro lado, la sobreexpresión de los genes HOX desde el *driver elav-Gal4* dio lugar a los siguientes resultados:

- La sobreexpresión del gen *Antp* condujo a la reducción significativa en el número de células orcokininérgicas en los segmentos abdominales A1, principalmente, y A2 con respecto al control (ver **Figura 26B**).
- La sobreexpresión del gen *Ubx* dio lugar a la aparición ectópica de células de Orcokinina A en el segmento torácico T3, así como al aumento significativo del número de células en los segmentos A1, A2 y A3 (ver **Figura 26C**).
- La sobreexpresión del gen *abdA* tuvo como consecuencia la aparición de células ectópicas de Orcokinina A en los segmentos torácicos T2 y T3, así como en el segmento abdominal A8. También aumentó significativamente el número de células orcokininérgicas en el segmento A3 (ver **Figura 26D**).
- La sobreexpresión del gen *AbdB* supuso la desaparición casi total de células de Orcokinina A en todos los segmentos de la CNV (ver **Figura 26E**).



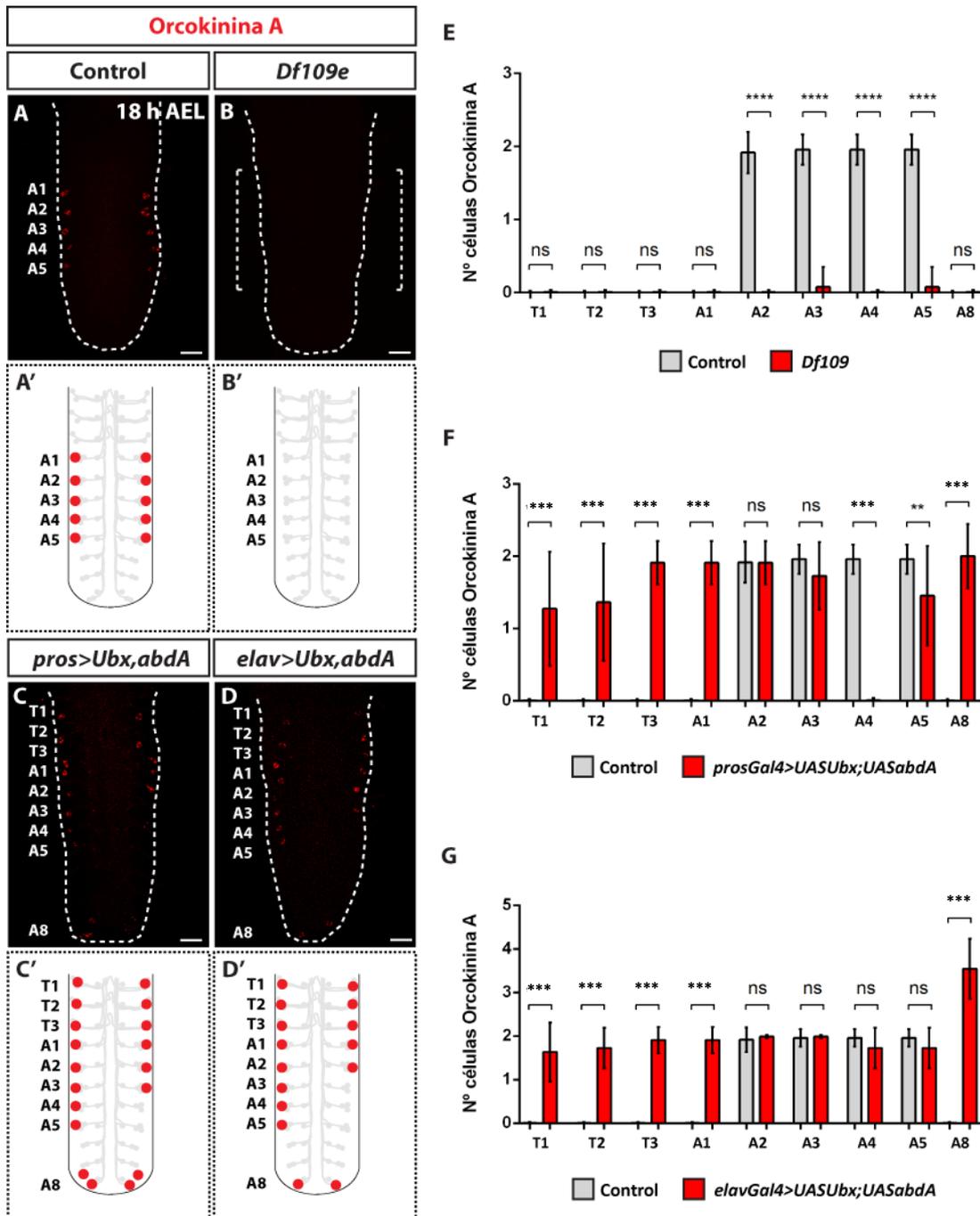
**Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de los genes Hox a nivel postmitótica en la especificación de las neuronas de Orcokinin A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *elav-Gal4>UAS-Antp*, **(C)** *elav-Gal4>UAS-Ubx*, **(D)** *elav-Gal4>UAS-abdA* y **(E)** *elav-Gal4>UAS-AbdB*. Las flechas marcan células ectópicas. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-E')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(F-I)** Representación del número medio de células de Orcokinin A por segmento de la CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos): **(F)** *elav-Gal4>UAS-Antp*, **(G)** *elav-Gal4>UAS-Ubx*, **(H)** *elav-Gal4>UAS-abdA* y **(I)** *elav-Gal4>UAS-AbdB*. Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\* $=p < 0,001$ ; \*\* $=p < 0,01$ ; \* $=p < 0,1$ ; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

### **6.3. Análisis del papel de *Ubx* y *abdA* en la especificación de las neuronas de Orcokinina A**

Los resultados obtenidos parecían evidenciar que era necesaria la combinación de los genes homeóticos *Ubx* y *abdA* para la adquisición del destino neuropeptidérgico Orcokinina A en los segmentos A1-A5. Para reforzar esta hipótesis, se quiso comprobar si la mera sobreexpresión de ambos genes era suficiente para el establecimiento de este destino terminal, utilizando para ello de nuevo los *drivers* *prosGal4* y *elavGal4*. De la misma forma, también se analizó el patrón de expresión de este neuropéptido en embriones de estadio 18 h AEL con fondo mutante *Df109e*, el cual descubre los genes homeóticos *Ubx* y *abdA*.

El análisis de los resultados reveló, primeramente, que no se producía la correcta especificación de las células de Orcokinina A en ausencia de los genes homeóticos *Ubx* y *abdA* (ver **Figura 27B**). Por otro lado, la sobreexpresión conjunta de ambos genes, tanto desde *prosGal* como desde *elavGal4*, tuvo como consecuencia la aparición de células ectópicas positivas para Orcokinina A en los tres segmentos torácicos T1-T3 y en el segmento abdominal A8 (ver **Figura 27C y D**). Estos resultados refuerzan la hipótesis planteada, señalando que la combinación de ambos genes homeóticos resulta necesaria en el proceso de especificación de las neuronas de Orcokinina A.

**Los resultados obtenidos indican que los genes homeóticos *Ubx* y *abdA* parecen fundamentales para la adquisición del destino Orcokinina A en los segmentos abdominales A1-A5. La sobreexpresión de estos genes consigue arrancar la cascada de especificación de dicho destino neuropeptidérgico de forma ectópica en otros segmentos de la CNV. Por otro lado, *Antp* parece restringir este mismo destino en los segmentos torácicos T1-T3, mientras *AbdB* lo hace en los segmentos abdominales más posteriores A6-A8.**



**Figura 27. Efecto de la falta de función y la sobreexpresión conjunta de los genes *Ubx* y *abdA* en la especificación de las neuronas de Orcokinin A.** Inmuntinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control, (B) *Df109e*, (C) *pros-Gal4>UAS-Ubx; UAS-abdA* y (D) *elav-Gal4>UAS-Ubx; UAS-abdA*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. (A'-D') Esquemas representativos de los resultados observados. (E-G) Representación del número medio de células de Orcokinin A por segmento de la CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos): (E) *Df109e*, (F) *pros-Gal4>UAS-Ubx; UAS-abdA* y (G) *elav-Gal4>UAS-Ubx; UAS-abdA*. Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

## 7. Implicación de la ruta de Notch en la especificación de las células de Orcokinina A

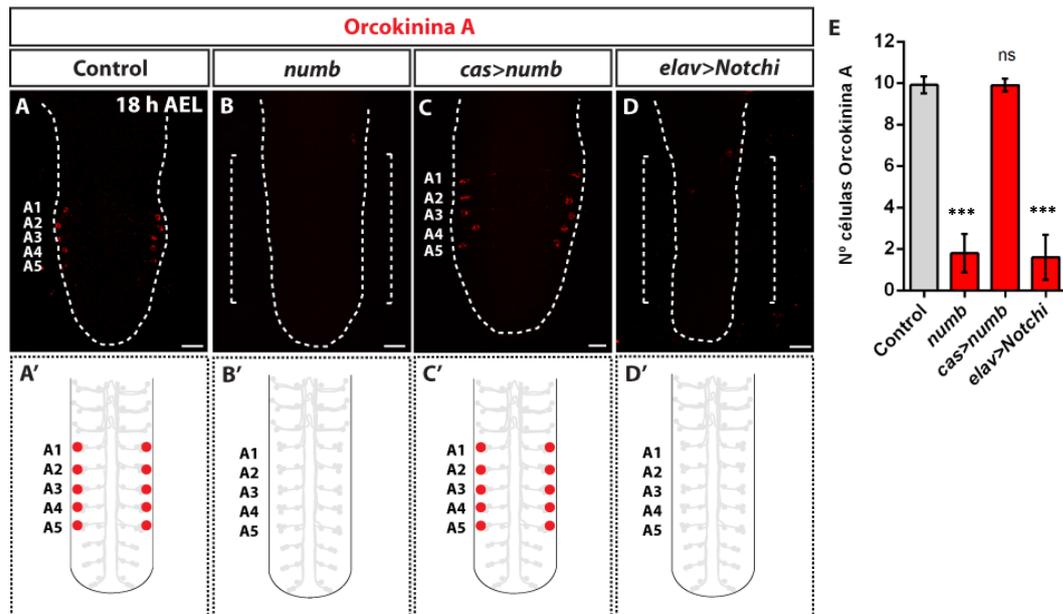
Durante la división asimétrica de la CMG, la ruta de Notch está implicada en la diferenciación del destino de las células hijas que derivan de ella. Este destino puede ser incluso la PCD, la cual tiene una gran relevancia a nivel postmitótica en algunos linajes neuropeptidérgicos (Spana y Doe, 1996; Skeath, J. B. y Doe, 1998; Lundell *et al.*, 2003; Karcavich y Doe, 2005). Por ello, se decidió estudiar el papel que juega esta ruta de señalización en la especificación de las neuronas orcokininérgicas.

Las mutaciones clásicas para el estudio de la ruta de Notch permiten analizar la falta de función de los genes *sanpodo* (*spdo*) y *mastermind* (*mam*). Sin embargo, los ejemplares homocigóticos para estas mutaciones no son viables en los últimos estadios del desarrollo embrionario. Como se ha descrito anteriormente, la Orcokinina A no comienza a detectarse hasta el estadio 18 h AEL, por lo que no fue posible el análisis de estos genotipos.

En este caso, para conocer el efecto de la falta de función de la ruta de Notch, se hizo uso de la sobreexpresión del gen *numb*, el cual codifica para una proteína de membrana que actúa como represor de la ruta (Spana *et al.*, 1995). Para dirigir la sobreexpresión se utilizó el *driver cas-Gal4* dado que el análisis previo de la identidad temporal reveló que las neuronas de Orcokinina A nacían en una ventana temporal mixta *cas-grh* (ver 5.1. *Análisis de mutantes de falta de función de los genes temporales*). El objetivo de este experimento era conseguir la inactivación de esta ruta en las dos células hijas derivadas de la CMG y observar su consecuencia.

Los resultados indicaron que la sobreexpresión de *numb* no generaba modificaciones en la especificación de las neuronas de Orcokinina A, teniendo estos ejemplares un patrón de distribución del neuropéptido igual al control (ver **Figura 28C**). Por otro lado, se analizó el efecto de la activación de la ruta de Notch sobre la especificación de la Orcokinina A. Con este fin, se utilizaron dos estrategias para conseguir la activación de la ruta en las dos células hijas derivadas de la CMG. Primeramente, se realizó un análisis de la falta de función de *numb*. En consonancia con lo ocurrido anteriormente, no se produjo la especificación de las neuronas de estudio en este contexto, indicando que la inactivación de la ruta parecía fundamental

para la adquisición de este destino neuropeptidérgico (ver **Figura 28B**). La segunda aproximación consistió en la sobreexpresión de uno de los efectores finales de la ruta: el dominio intracelular de Notch (Notchi) (Rebay *et al.*, 1993). En este caso, el resultado confirmó que la activación de la ruta de Notch impedía la correcta especificación de las neuronas de Orcokina A (ver **Figura 28D**).



**Figura 28. Caracterización del papel de la ruta de Notch en la especificación de las neuronas de Orcokina A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *numb*, **(C)** *cas-Gal4>UAS-numb* y **(D)** *elav-Gal4>UAS-numb*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-D')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(E)** Representación del número medio de células de Orcokina A por CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)= $p < 0,001$ ; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que la inactivación de la ruta de Notch tiene un papel determinante en la especificación de las neuronas de Orcokina A, siendo estas las células hermanas con identidad *Notch Off*.

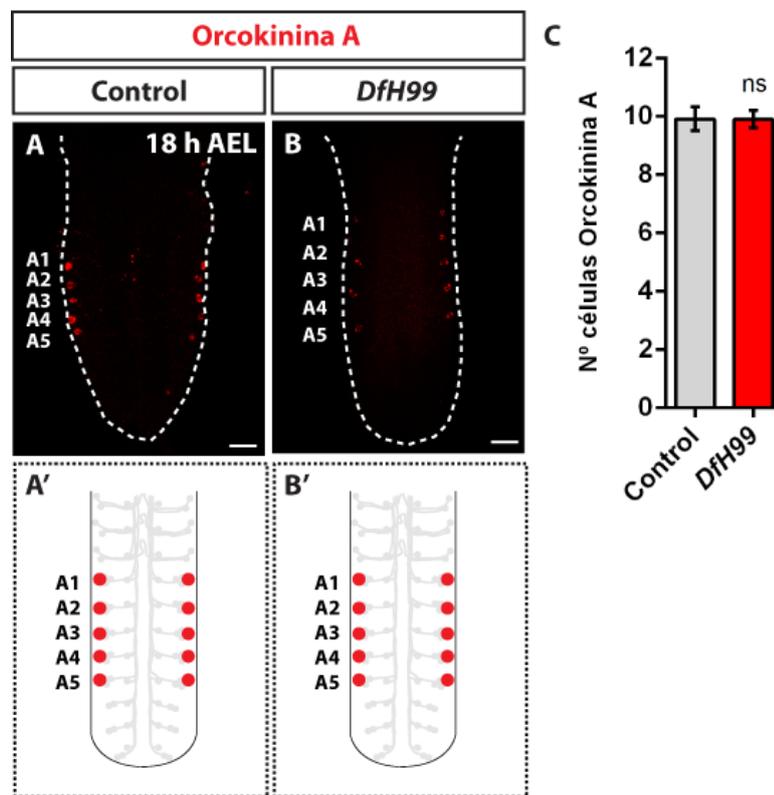
## 8. Papel de la muerte celular programada (PCD) en la especificación de las células de Orcokinina A

La PCD es un mecanismo celular de alta relevancia durante el proceso de desarrollo, especialmente en el SNC de *D. melanogaster*, donde actúa controlando el tamaño de los linajes y la estructura del tejido. De hecho, es relativamente frecuente que las células nerviosas experimenten PCD poco después de nacer a partir de la división asimétrica de su CMG progenitora. Por ello, este proceso ha sido estudiado y descrito minuciosamente en varios sistemas neuropeptidérgicos en los que la apoptosis se postula como un mecanismo imprescindible para establecer su patrón de expresión definitivo (Karcavich y Doe, 2005; Benito-Sipos *et al.*, 2013).

Dos hechos fundamentales incentivaron la realización de este estudio con las células de Orcokinina A. Por un lado, el análisis previo del papel de los genes Hox en la especificación de estas neuronas mostró que determinadas mutaciones favorecían la aparición de células de este tipo en segmentos anteriores y posteriores a los habituales (ver 6. *Implicación de los genes Hox en la especificación de las células de Orcokinina A*). Por ello, cabía la posibilidad de que las células de Orcokinina A se generaran en todos los segmentos de la CNV y, posteriormente, sufrieran PCD antes de adquirir este destino neuropeptidérgico. Por otro lado, podía ocurrir que la CMG que origina estas neuronas generase al mismo tiempo una célula hermana que sufriera apoptosis temprana. Esta hipótesis estaría reforzada por el resultado obtenido a partir de la inactivación de la ruta de Notch mediante la sobreexpresión de *numb* (ver 7. *Implicación de la ruta de Notch en la especificación de las células de Orcokinina A*). Como pudo extraerse de ese resultado, esta estrategia no condujo en ningún caso a la aparición de dos células con destino Orcokinina A en cada hemisegmento, pudiendo ser la PCD temprana de la célula hermana motivo de ello.

Para la realización de este estudio se analizó mediante inmunodetección el patrón de expresión de la Orcokinina A en un contexto de bloqueo de la apoptosis. Para ello, se utilizaron embriones de estadio 18 h AEL homocigóticos para la deficiencia cromosómica Df(3L)H99, la cual descubre los genes proapoptóticos *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) y *grim* (White, K. *et al.*, 1994; Grether *et al.*, 1995; Chen, P. *et al.*, 1996). Estos ejemplares no son capaces de desencadenar apoptosis en sus células.

Los resultados mostraron que no se producían alteraciones en la especificación de neuronas secretoras de Orcokina A en los ejemplares con genotipo *Df(3L)H99* con respecto al control (ver **Figura 29**). Dado que no aparecían neuronas en los segmentos torácicos ni en los abdominales posteriores (A6-A8), estos resultados parecen descartar que estas neuronas se generen en todos los segmentos del eje A-P y posteriormente sufran PCD. Al no aumentar tampoco el número de células de Orcokina A por hemisegmento, este experimento descarta también que, en caso de haberlas, las células hermanas de estas neuronas experimenten apoptosis temprana.



**Figura 29. Estudio del papel de la muerte celular programada en la especificación de las neuronas de Orcokina A.** Inmuntinción contra el neuropéptido Orcokina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control, (B) *DfH99*. Escala: 20  $\mu$ m. (A'-B') Esquemas representativos de los resultados observados. (C) Representación del número medio de células de Orcokina A por CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

**Los resultados obtenidos parecen indicar que la PCD no es un mecanismo fundamental para el establecimiento del patrón de expresión correcto del neuropéptido Orcokinina A. La inhibición de la apoptosis no provoca alteraciones en estas neuronas ni la aparición de células ectópicas con este mismo destino.**

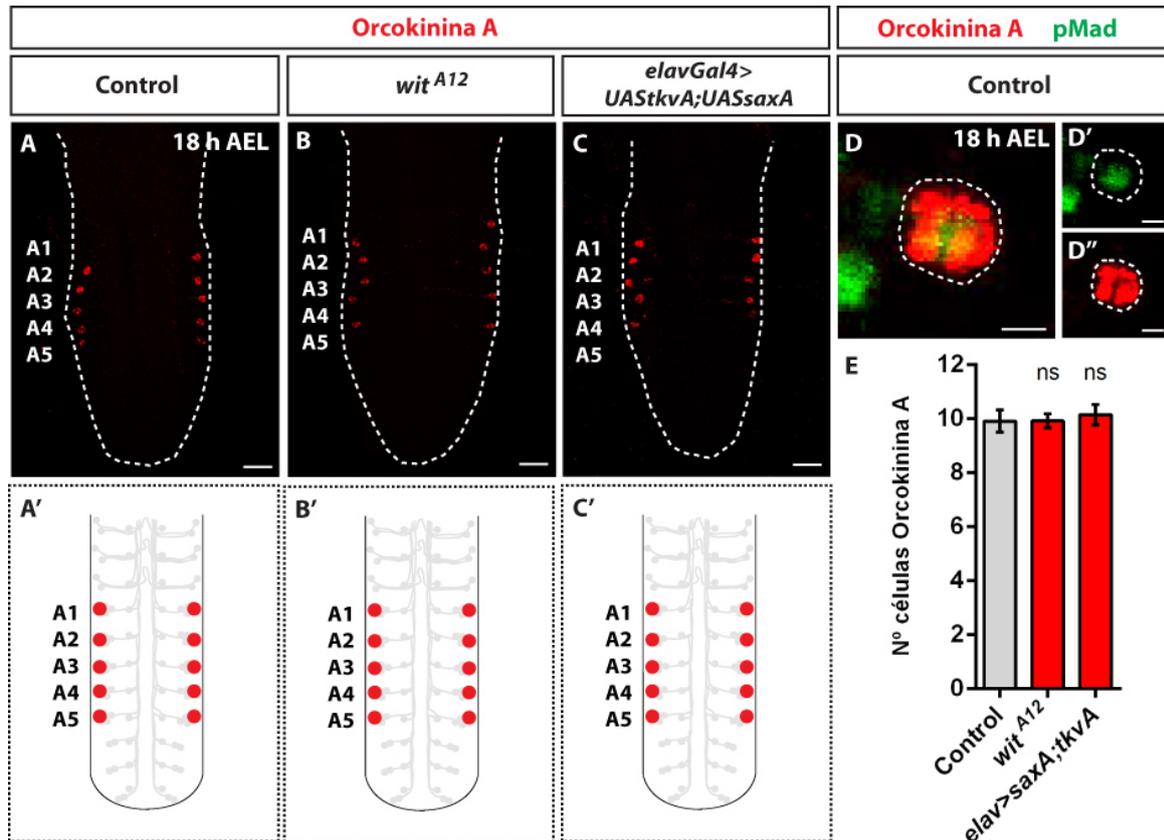
### **9. Implicación de la ruta de BMP en la especificación de las células de Orcokinina A**

Para la adquisición del destino terminal, las neuronas necesitan recibir información tanto intrínseca como extrínseca, siendo la última normalmente procedente de sus tejidos diana. Además, esta señalización extrínseca suele ser dependiente de la liberación de factores de tipo BMP. En este contexto, el transporte retrógrado, es decir, desde el axón hacia el soma, resulta imprescindible en distintos sistemas neuronales para permitir la señalización paracrina a través del ligando Gbb (Allan *et al.*, 2003; Baumgardt *et al.*, 2009). Por ello, la interrupción de este tipo de transporte inactiva la ruta de señalización de BMP, pudiendo afectar a la activación del código combinatorio terminal necesario para la correcta especificación de una neurona.

En base a estos datos, se comenzó analizando el papel que juega la ruta de BMP en la especificación de las neuronas de Orcokinina A mediante la inmunodetección de pMad en estas células. Los resultados mostraron presencia de esta proteína en el núcleo de las neuronas, lo cual indicaba que Mad se encontraba ejerciendo su acción y la ruta de BMP estaba activa (ver **Figura 30D**).

No obstante, este resultado no indicaba que la ruta de BMP fuera fundamental para el establecimiento del destino Orcokinina A en estas neuronas. Para comprobarlo, se estudió la expresión de este neuropéptido mediante inmunodetección en ejemplares con un genotipo de falta de función en el gen *wit*. En estos mutantes se impide la tetramerización del receptor y, por tanto, se inactiva la ruta a pesar de la presencia de Gbb. Este hecho se confirmó mediante una inmunotición contra pMad, la cual resultó negativa (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos evidenciaron que la inactivación de la ruta de BMP no impedía la correcta especificación de las neuronas orcoquinérgicas, por tanto la ruta de BMP no parecía ser imprescindible para la adquisición de este destino terminal (ver *Figura B*).



**Figura 30. Caracterización del papel de la ruta de BMP en la especificación de las neuronas de Orcokinin A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *wit<sup>A12</sup>* y **(C)** *elav-Gal4>UAS-saxA;UAS-tkvA*. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-C')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(D)** Expresión de la proteína pMad (verde) en el núcleo de las células de Orcokinin A (rojo). Escala: 2  $\mu$ m. **(E)** Representación del número medio de células de Orcokinin A por CNV en cada genotipo estudiado con respecto al control (n ≥ 10 CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

Finalmente, se comprobó si la activación postmitótica de la ruta de BMP era suficiente para activar el destino Orcokinina A en otras neuronas. Para ello, se utilizó el *driver elav-Gal4* para dirigir la expresión de la forma activada de las proteínas Sax y Tkv, forzando la activación de la ruta. Los resultados indicaron que esta activación ectópica de la ruta no tenía como consecuencia la aparición de más células positivas para Orcokinina A (ver **Figura 30C**).

**Esta serie de experimentos muestra que, a pesar de que las neuronas secretoras de Orcokinina A presentan la ruta de BMP activa, ésta no es requerida para la determinación de las mismas como células orcokininérgicas.**



## **CAPÍTULO II. GENES IMPLICADOS EN LA ESPECIFICACIÓN DE LAS NEURONAS SECRETORAS DEL NEUROPEPTIDO ORCOKININA A EN LA CNV DE *D. melanogaster***

La especificación celular requiere la combinación de numerosos factores de transcripción que actúan de forma conjunta para establecer un determinado destino terminal. Además, estos factores suelen establecer jerarquías de activación y represión altamente precisas entre ellos, dando lugar a un mecanismo estrictamente regulado y muy concreto para cada subtipo neuronal. Por ello, aún no se conoce el código combinatorio completo de ningún destino neuropeptidérgico. En este contexto, la búsqueda dirigida de genes resulta ser una metodología claramente eficiente para la descripción de nuevos factores implicados en la especificación neuronal. *D. melanogaster* se postula como una herramienta muy potente en este campo dada la facilidad de generación de cepas mutantes para diferentes genes, así como la disposición de bancos biológicos que ponen a disposición de los investigadores multitud de recursos para su estudio.

### **1. Búsqueda genética dirigida para la identificación de factores implicados en la especificación de las neuronas de Orcokinina A**

En el *Capítulo I* de *Resultados* de la presente tesis doctoral se han descrito los mecanismos de información temporal y espacial necesarios para la especificación de las neuronas de Orcokinina A. No obstante, la determinación de un destino celular es un proceso complejo que requiere, tras la integración de esta información espacio-temporal, la expresión de un conjunto de factores selectores terminales que refinan la identidad de la célula. En este sentido, no había sido descrito hasta ahora ningún gen implicado en la especificación de estas neuronas.

Con el objetivo de identificar nuevos factores que jueguen un papel clave en la cascada de especificación terminal de las neuronas orcokininérgicas se llevó a cabo una búsqueda genética dirigida o *targeted screening*. Para ello, se recurrió a la base de datos *Berkeley Drosophila Genome Project* (University of California, Berkeley), la cual recoge información sobre el patrón de expresión de 8463 genes durante el desarrollo

de *D. melanogaster* (<http://www.fruitfly.org/index.html>). Gracias a esta información, se realizó una primera selección de genes utilizando como criterio su expresión en la CNV durante los estadios 11 a 16, y encontrando 1200 referencias que cumplieran ambos requisitos. Posteriormente, se realizó una criba en la que se eliminaron aquellas referencias correspondientes a genes duplicados y genes de los cuales no se había obtenido aún una cepa de mutantes amórficos de falta de función. De esta forma, el número de referencias a estudiar se redujo a 450. Además, se decidió incluir en el *screening* 166 genes que presentaban interacciones directas con factores cuya falta de función afectaba a la especificación de estas células.

Las cepas de *D. melanogaster* necesarias para el estudio fueron obtenidas de diferentes fuentes: 549 cepas del *Bloomington Drosophila Stock Center* (Indiana University), 27 cepas del *Drosophila Genetic Resource Center* (Kyoto Institute of Technology) y 40 cepas cedidas personalmente por otros investigadores. También se añadieron 48 genes clásicos de desarrollo puesto que se contaba con mutantes para los mismos entre la colección de cepas del laboratorio. Así, el número de genes sujetos a estudio ascendía a 664.

La mayoría de las cepas utilizadas presentaban las mutaciones para los genes seleccionados en heterocigosis, siendo además portadoras de cromosomas balanceadores. Éstos contienen inversiones cromosómicas que impiden la recombinación durante la profase I de la meiosis y son letales en homocigosis, de forma que posibilitan la formación de sistemas letales equilibrados con las mutaciones correspondientes. Además, suelen incluir marcadores fenotípicos que permiten su identificación *de visu* (Lindsley y Zimm, 1992). Sin embargo, estas cepas presentaban cromosomas balanceadores cuyos marcadores no permitían este tipo de identificación en estadios embrionarios. Por tanto, para poder realizar una correcta selección de mutantes homocigóticos fue necesario sustituirlos por otros cromosomas balanceadores más adecuados. En todos los casos, éstos contaban con diferentes construcciones que incluían la proteína reportera GFP asociada a promotores de expresión embrionaria. De esta forma, se posibilitó la selección de embriones mutantes homocigóticos bajo una lupa binocular acoplada a una lámpara de fluorescencia. El cambio de balanceador se llevó a cabo mediante cruces y, durante este proceso, se perdieron algunas de las cepas seleccionadas previamente. Por esta

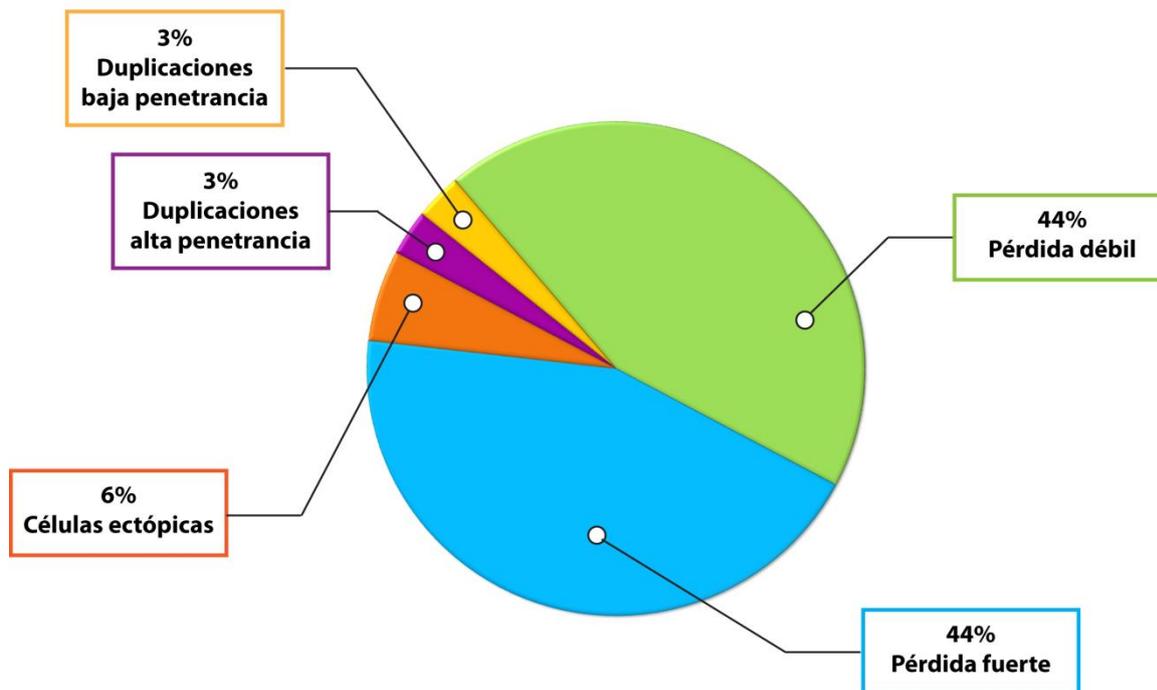
razón, el número de mutaciones analizadas finalmente en esta búsqueda genética dirigida fue de 485.

Cada una de las cepas fue estudiada mediante la disección de embriones mutantes homocigóticos de estadio 18 h AEL y la posterior inmunofluorescencia indirecta para el neuropéptido Orcokina A. Tras observar los resultados, los mutantes fueron clasificados en grupos en función del patrón de expresión obtenido. En la caracterización de los mutantes se consideró alta penetrancia genética para aquéllos que presentaban el fenotipo correspondiente en, al menos, el 50% de los especímenes, y baja penetrancia para aquéllos que lo presentaban en menos del 50%. Por otro lado, se consideró como fenotipo fuerte aquél que ocasionaba una alteración de, al menos, el 50% de las células o hemisegmentos, y como fenotipo débil aquél que afectaba a un porcentaje menor.

Según esta terminología, se realizó la siguiente clasificación del fenotipo de los mutantes (ver **Figura 31**):

- 1) Ausencia significativa de alteraciones: 422 genes (87% del total)
- 2) Presencia significativa de alteraciones: 63 genes (13% del total)
  - a) Disminución en el número total de células por CNV con alta penetrancia:
    - i) Pérdida de células débil: 27 genes
    - ii) Pérdida de células fuerte: 28 genes
  - b) Aumento débil del número total de células por CNV:
    - i) Aparición de células en segmentos diferentes a A1-A5 (referido como células ectópicas) con alta penetrancia: 4 genes
    - ii) Aparición de más de una célula en algún hemisegmento de A1-A5 (referido como duplicaciones):
      - Con alta penetrancia: 2 genes
      - Con baja penetrancia: 2 genes

La lista completa de cepas de *D. melanogaster* utilizadas en esta búsqueda genética dirigida, así como los datos referentes a su genotipo completo y procedencia, se encuentra desglosada en el **Anexo I**.



**Figura 31. Resumen de las categorías fenotípicas encontradas entre los mutantes analizados.** Los fenotipos fueron descritos en base al patrón de expresión del neuropéptido Orcokinina A en cada uno de los mutantes estudiados. De un total de 485 genes analizados, 63 contaban con alteraciones significativas. De ellos, el 44% mostraron un número total de células por CNV menor al 50% de la condición control (azul); mientras que otro 44% mostraron una reducción igual o menor al 50% (verde). Por otra parte, en el 6% de los casos aparecieron células ectópicas en segmentos diferentes a A1-A5 (naranja). Finalmente, también se encontraron genes cuya falta de función producía la aparición de un número mayor de células en cada hemisegmento abdominal A1-A5, referidas como duplicaciones, pudiendo tener este fenotipo una alta penetrancia en algunos casos (morado), y baja penetrancia en otros (amarillo).

Tras la recogida de datos, se seleccionaron como posibles candidatos de estudio aquellos genes cuya pérdida de función ocasionaba un fenotipo fuerte de ausencia de células con alta penetrancia genética (ver **Tabla 5**).

Posteriormente, se realizó una revisión bibliográfica sobre los 34 genes candidatos derivados de este *screening*. Atendiendo a la información encontrada sobre cada uno de ellos, la disposición de herramientas para su estudio y el fenotipo obtenido, se seleccionaron los genes *nab* y *teashirt (tsh)* para la realización de un estudio más detallado de su implicación en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A.

Es interesante resaltar que estos dos factores de transcripción intervienen en la formación del eje proximal-distal (PD) del ala durante el desarrollo de *D. melanogaster*. Para ello, actúan en combinación de otros factores, como Wg (marcador principal de los NBs de la línea 5 y sus linajes) o Dpp (integrante de la ruta de BMP) (Azpiazu y Morata, 2000; Wu, Jun y Cohen, 2002; Clements *et al.*, 2003; Terriente Félix *et al.*, 2007), los cuales parecen jugar un papel relevante en la diferenciación de las neuronas de estudio, según lo visto anteriormente (ver *Capítulo I de Resultados*, apartados 4. *Identificación del NB progenitor de las neuronas secretoras de Orcokina A en la CNV* y 9. *Implicación de la ruta de BMP en la especificación de las células de Orcokina A*).

Además, durante la formación del eje PD del ala resulta fundamental la acción de *vestigial (vg)* (Klein *et al.*, 1998). Este gen también había sido identificado en la búsqueda genética dirigida, aunque su fenotipo se traducía en una pérdida más débil de células. Por ello, fue excluido como gen candidato en la primera criba pero, tras conocer su interacción con *nab* y *tsh* en otros contextos celulares, se incluyó como el tercer gen protagonista del estudio.

Por otro lado, se seleccionó también el gen *Minichromosome maintenance 5 (Mcm5)* para realizar un estudio más detallado de su implicación en la especificación de destinos neuropeptidérgicos. Su función molecular se ha descrito clásicamente como helicasa y participa en procesos biológicos como la recombinación meiótica, la endorreplicación del ADN o la condensación de los cromosomas (Christensen y Tye, 2003; Lake *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2007a; Park, S. Y. y Asano, 2008). Este gen fue elegido debido a que, a pesar de atribuírsele funciones generales y necesarias para la división celular, el fenotipo encontrado era claramente específico. Se estudió la especificación de nueve sistemas neuronales secretores diferentes (Orcokina A, Capa, FMRFa, Nplp1, Serotonina, Corazonina, Insulin-like peptide 7, Lk y Pigment dispersing factor) en mutantes de falta de función para dicha helicasa (datos no mostrados), encontrándose alteraciones únicamente en dos de ellos: Orcokina A y FMRFa. Por ello, se decidió llevar a cabo un estudio más profuso de su función en la especificación neuronal. Se seleccionaron para ello las células FMRFaminérgicas Tv4 como modelo debido a que su código de especificación se conoce con detalle, lo cual

supone una gran ventaja en cuanto a herramientas disponibles para el estudio. Este trabajo constituye el *Capítulo III* del apartado de *Resultados* de esta tesis doctoral.

**Tabla 5. Relación de los 28 genes seleccionados como candidatos de estudio en la búsqueda genética dirigida.** La tabla recoge el nombre del gen, el alelo estudiado, el número de CNVs analizadas (n), la media ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar ( $\sigma$ ) del número total de células de Orcokina A encontradas en la CNV, así como el p-valor (prueba U de Mann-Whitney) y el código numérico correspondiente a cada genotipo en el listado de cepas de *D. melanogaster* utilizadas en este *screening* (ver *Anexo I*).

Gen	Alelo	n	$\bar{x}$	$\sigma$	p-valor	Nº
Control		24	9,92	0,41		
<i>Acn</i>	1	6	0,50	1,22	<0.01	1
<i>aurA</i>	87-Ac3	6	0	0	<0.01	7
<i>barr</i>	L305	4	2,1	0,84	<0.01	419
<i>Cdk1</i>	B47	5	0,80	1,10	<0.01	195
<i>ct</i>	C145	8	0,13	0,35	<0.01	343
<i>CyCE</i>	AR95	7	0	0	<0.01	198
<i>dap</i>	04439	11	0,18	0,40	<0.01	199
<i>Dg</i>	086	6	0,17	0,41	<0.01	396
<i>dpa</i>	1	5	0	0	<0.01	47
<i>Dref</i>	KG09294	7	2,85	0,69	<0.01	475
<i>elav</i>	5	8	1,43	2,44	<0.01	56
<i>Etl1</i>	EP701	3	1,07	0,57	<0.01	280
<i>jumu</i>	E6439	18	1,06	1,11	<0.01	122
<i>kdn</i>	A	4	2,7	1,23	<0.01	345
<i>Klp61F</i>	<i>urc-1</i>	4	0,25	0,50	<0.01	71
<i>kuz</i>	E29-4	17	1	2,42	<0.01	73
<i>lbe</i>	12C005	12	4	2,59	<0.01	286
<i>Liprin-<math>\gamma</math></i>	H1	4	1,84	1,11	<0.01	200
<i>Mcm5</i>	<i>exc222</i>	15	0,07	0,26	<0.01	81
<i>MRG15</i>	j6A3	5	3,80	0,84	<0.01	413
<i>nab</i>	SH143	18	0	0	<0.01	96
<i>Pcl</i>	5	6	0	0	<0.01	219
<i>Rcc1</i>	FF32	6	0,50	0,84	<0.01	139
<i>salr</i>	FCK-20	4	3	0,41	<0.01	38
<i>Scm</i>	D1	5	0	0	<0.01	170
<i>scra</i>	8	4	2,01	0,98	<0.01	158
<i>tsh</i>	8	10	0	0	<0.01	176
<i>VhaAc29-1</i>	<i>cho-1</i>	10	0,40	0,84	<0.01	35

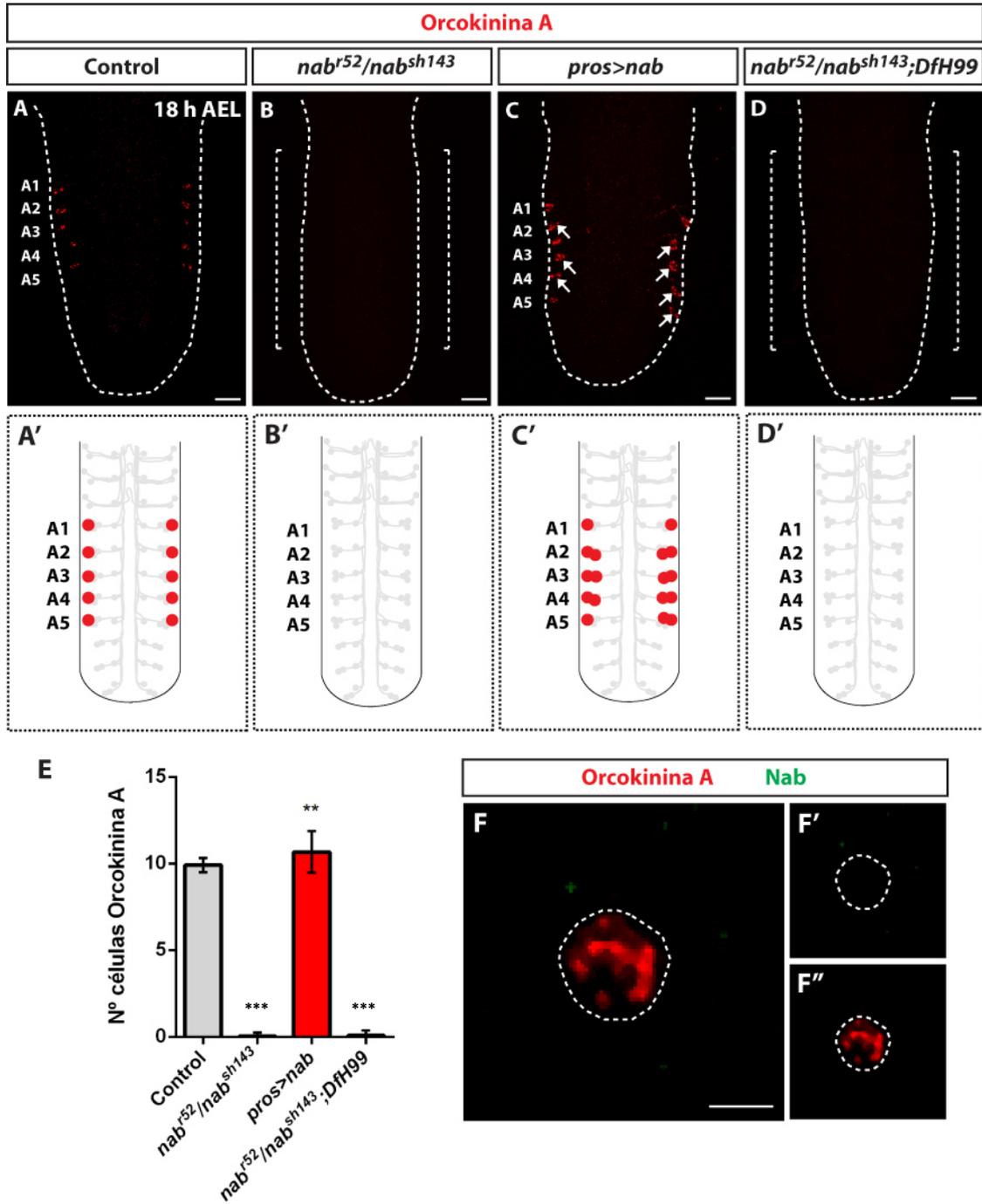
**Por tanto, los factores Nab, Tsh, Vg y Mcm5 parecen ser buenos candidatos como integrantes de la cascada de especificación terminal de las neuronas de Orcokinina A. Por su parte, Mcm5 parece jugar también un papel relevante en el proceso de especificación del sistema FMRFamidéxico.**

## **2. Estudio del papel de Nab como factor selector en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A**

Con el objetivo de analizar con mayor detalle el papel del factor de transcripción Nab en la especificación de las células orcokininérgicas, se realizó una inmunotinción contra Orcokinina A en especímenes de estadio 18h AEL con diferentes genotipos mutantes:  $nab^{r52}/nab^{sh143}$ ,  $pros-Gal4>UAS-nab$  y  $nab^{r52}/nab^{sh143};DfH99$ .

Los resultados obtenidos mostraron que mutantes transheterocigotos para el gen *nab* ( $nab^{r52}/nab^{sh143}$ ) reproducían el patrón de ausencia de células observado anteriormente en mutantes homocigóticos ( $nab^{sh143}$ ) (ver **Figura 32B**). El uso de transheterocigotos, es decir, heterocigotos con dos loci mutantes para el mismo gen en disposición *trans*, permite descartar que el fenotipo observado sea debido a otra mutación desconocida presente en el genoma de los organismos estudiados. Por tanto, con este resultado se podía confirmar que el efecto observado estaba directamente relacionado con la pérdida de función de Nab.

Por otro lado, la sobreexpresión del gen *nab* desde NB a neurona postmitótica con el *driver* *pros-Gal4* ocasionaba un aumento significativo del número de células de Orcokinina A en la CNV. No obstante, cabe destacar que estas células ectópicas aparecían siempre en los segmentos A1-A5 y nunca en segmentos anteriores o posteriores (ver **Figura 32C**).



**Figura 32. Papel del factor de transcripción Nab en la especificación de las neuronas de Orcokininina A.** Inmuntinción contra el neuropéptido Orcokininina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *nab<sup>r52</sup>/nab<sup>sh143</sup>*, **(C)** *pros-Gal4>UAS-nab* y **(D)** *nab<sup>r52</sup>/nab<sup>sh143</sup>; DfH99*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Las flechas marcan células ectópicas. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-D')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(E)** Representación del número medio de células de Orcokininina A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ). Prueba U de Mann-Whitney. **(F)** Ausencia de expresión del factor de transcripción Nab (verde) en las células de Orcokininina A (rojo). Escala: 2  $\mu$ m.

Una de las posibles explicaciones de este fenotipo sería que la falta de función de Nab produjese la PCD de las células orcokininérgicas. Para comprobar esta hipótesis, se estudió el patrón de expresión de la Orcokinina A en un doble fondo mutante *nab* y *DfH99*. De esta forma, al inhibir la apoptosis, observaríamos la aparición de células orcokininérgicas en estos embriones. Los resultados obtenidos mostraron que tampoco se producía la correcta especificación de las células orcokininérgicas en estos especímenes (ver **Figura 32D**), por lo que el fenotipo causado por la ausencia de Nab no era debido a la activación de apoptosis en estas células.

Finalmente, y con el objetivo de obtener más información acerca del papel de Nab en el desarrollo de estas neuronas, se analizó la posible expresión de este factor de transcripción en las células de Orcokinina A. Como puede observarse en la **Figura 32F**, las células orcokininérgicas no muestran expresión de Nab en estadio 18 h AEL. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, la expresión de los factores de transcripción es transitoria a lo largo del desarrollo. Por ello, no resulta llamativa la ausencia de expresión de Nab en estadios tardíos a pesar del fenotipo observado en los estudios de pérdida y ganancia de función. Desafortunadamente, no se conocen marcadores que posibiliten su análisis en estadios más tempranos.

**Los experimentos realizados sugieren que el factor de transcripción Nab resulta necesario pero no suficiente para la adquisición del destino terminal Orcokinina A.**

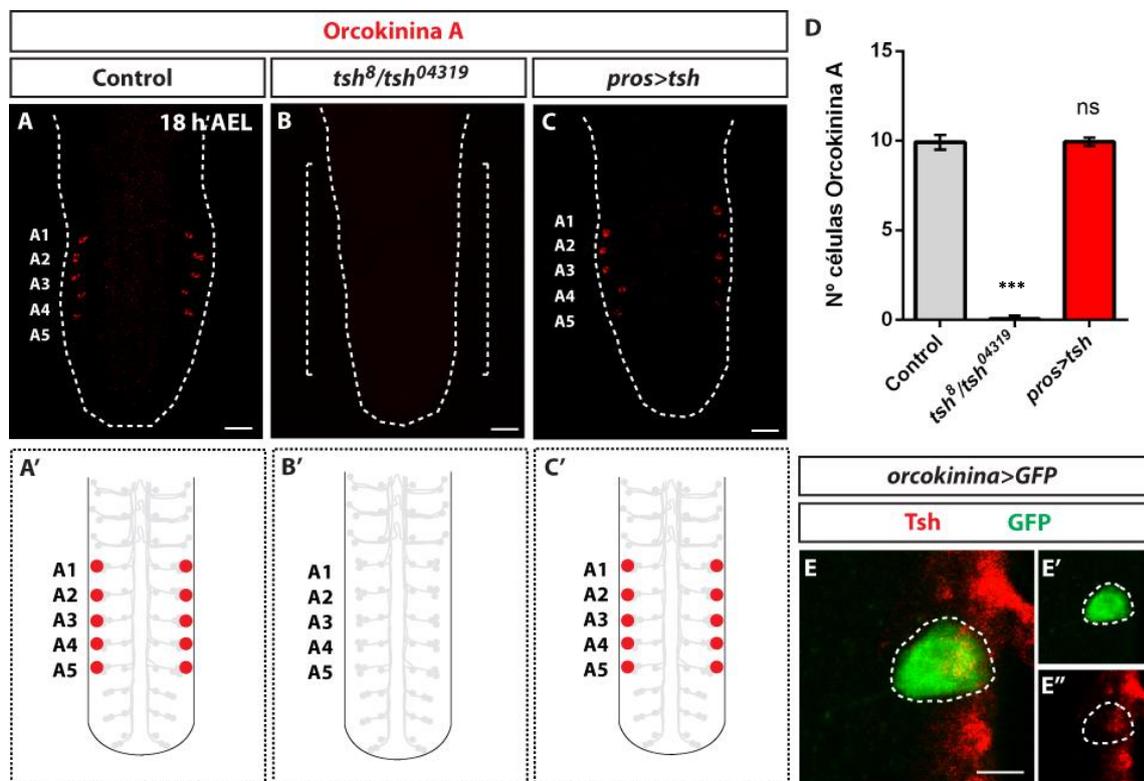
### **3. Estudio del papel de Tsh como factor selector en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A**

Para llevar a cabo un análisis más detallado del papel del factor de transcripción Tsh en la adquisición del destino terminal de las células orcokininérgicas, se realizó una inmunotinción contra Orcokinina A en especímenes de estadio 18h AEL con dos genotipos mutantes diferentes: *tsh<sup>8</sup>/tsh<sup>04319</sup>* y *pros-Gal4>UAS-tsh*.

Por un lado, los resultados obtenidos evidenciaron que la falta de función de Tsh en mutantes transheterocigotos (*tsh<sup>8</sup>/tsh<sup>04319</sup>*) se traducía en el mismo patrón de ausencia de células observado anteriormente en mutantes homocigóticos (*tsh<sup>8</sup>*) (ver

**Figura 33B**). Por lo tanto, este fenotipo parecía estar relacionado con la mutación del gen *tsh*.

Por otro lado, la sobreexpresión de *tsh* desde el *driver pros-Gal4*, es decir, desde NB a neurona postmitótica, no ocasionaba ningún tipo de alteración en el número de células de Orcokina A encontradas en la CNV (ver **Figura 33C**). No obstante, como puede observarse en la **Figura 33E**, las células orcokininérgicas mostraban expresión, aunque débil, del factor Tsh en estadio 18 h AEL.



**Figura 33. Papel del factor de transcripción Tsh en la especificación de las neuronas de Orcokina A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *tsh<sup>8</sup>/tsh<sup>04319</sup>* y **(C)** *pros-Gal4>UAS-tsh*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-C')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(D)** Representación del número medio de células de Orcokina A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)= $p < 0,001$ , ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney. **(E)** Débil expresión del factor de transcripción Tsh (rojo) en las células de Orcokina A (verde) en embriones con genotipo *orcokinaGal4>UAS-GFP*. Escala: 2  $\mu$ m.

**Los resultados obtenidos sugieren que el factor de transcripción Tsh resulta necesario pero no suficiente para la adquisición del destino terminal Orcokinina A.**

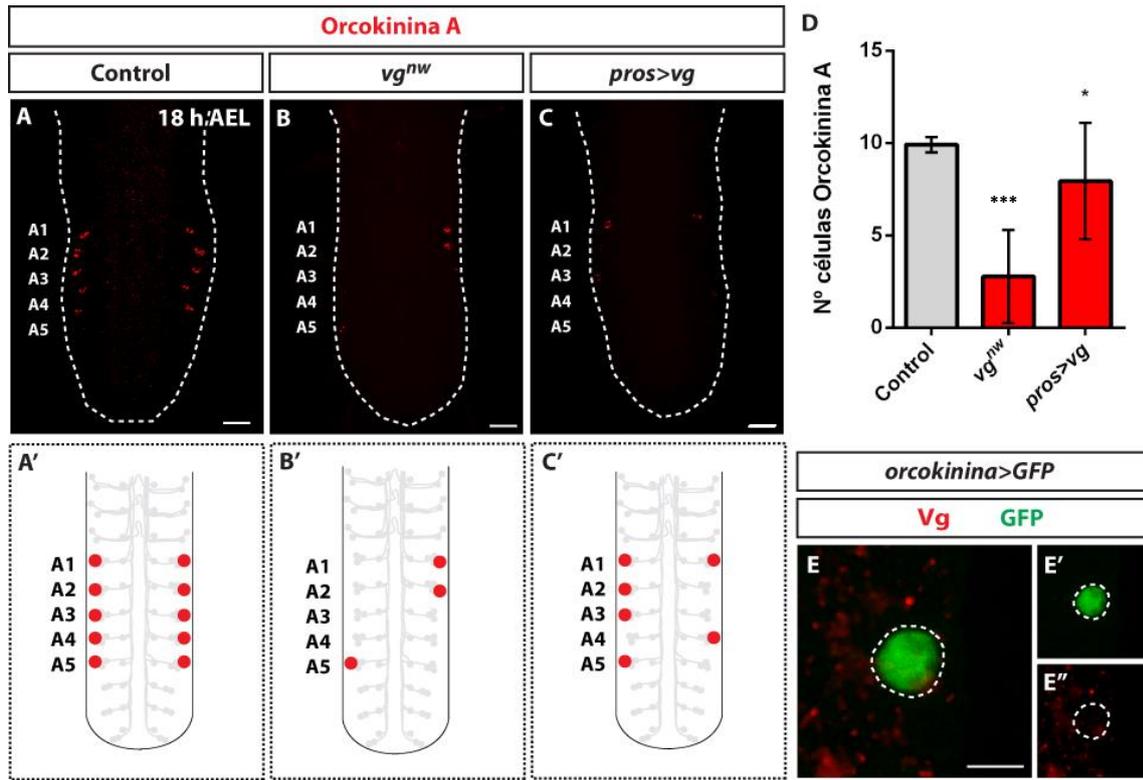
#### **4. Estudio del papel de Vg como factor selector en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A**

Como se ha visto anteriormente, el factor de transcripción Vg no había sido seleccionado como uno de los candidatos de estudio dado que no se encontraba dentro del grupo de factores que ocasionaban un fenotipo fuerte de ausencia de células con alta penetrancia genética. No obstante, debido a que su relación con Nab y Tsh estaba detalladamente descrita en la bibliografía durante su intervención en la formación del borde de ala, se decidió incluir este factor en los candidatos de estudio.

La inmunotinción contra Orcokinina A en especímenes de estadio 18h AEL de genotipo mutante *vg<sup>nw</sup>* reveló una reducción significativa del número de células orcokininérgicas totales (ver **Figura 34B**). No obstante, esta reducción no llegaba a ser completa y existía una alta variabilidad en el número de células encontradas en cada CNV, pudiendo oscilar entre 1 y 7 células.

La sobreexpresión del gen *vg* utilizando el *driver pros-Gal4* provocaba, de nuevo, alteraciones muy variables en el número de células orcokininérgicas encontradas en la CNV. Sin embargo, en todos los casos se reducía el marcaje de Orcokinina A con respecto al control (ver **Figura 34C**). Estos resultados sugerían que el gen *vg* podría estar sometido a un mecanismo de autorregulación, de forma que la sobreexpresión ectópica realizada en este experimento podría haber ocasionado además su propia represión.

Finalmente, se realizó una inmunotinción para detectar la expresión de Vg en las células orcokininérgicas en estadio 18 h AEL. Como puede observarse en la **Figura 34E**, el resultado fue negativo.

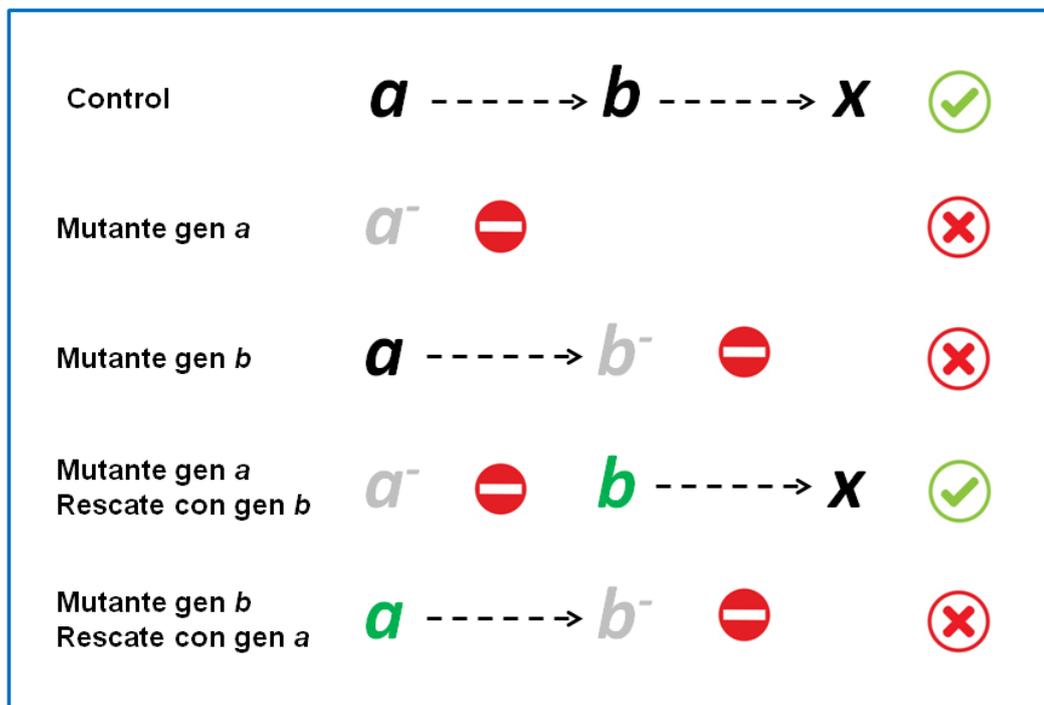


**Figura 34. Papel del factor de transcripción Vg en la especificación de las neuronas de Orcokinin A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinin A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *vg<sup>nw</sup>* y **(C)** *pros-Gal4>UAS-vg*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-C')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(D)** Representación del número medio de células de Orcokinin A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*= $p < 0,001$ ; \*= $p < 0,1$ ). Prueba U de Mann-Whitney. **(E)** Ausencia de expresión del factor de transcripción Vg (rojo) en las células de Orcokinin A (verde) en embriones con genotipo *orcokininGal4>UAS-GFP*. Escala: 2  $\mu$ m.

Por tanto, los experimentos realizados sugieren que Vg podría estar jugando un papel secundario en la especificación de las neuronas orcokininérgicas, sin resultar crítico para la adquisición del dicho destino terminal.

## 5. Estudio de la interacción entre los factores de transcripción Nab, Tsh y Vg en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokinina A

Como se ha señalado anteriormente, los códigos de especificación terminal tienen un carácter combinatorio. Están compuestos por multitud de factores que presentan complejas interacciones de activación e inhibición con los demás e, incluso, con ellos mismos. Por ello, si bien es imprescindible para la identificación de candidatos, el estudio aislado de un solo factor constituye únicamente la punta del gran iceberg que representa la cascada de selectores terminales de cada destino celular.



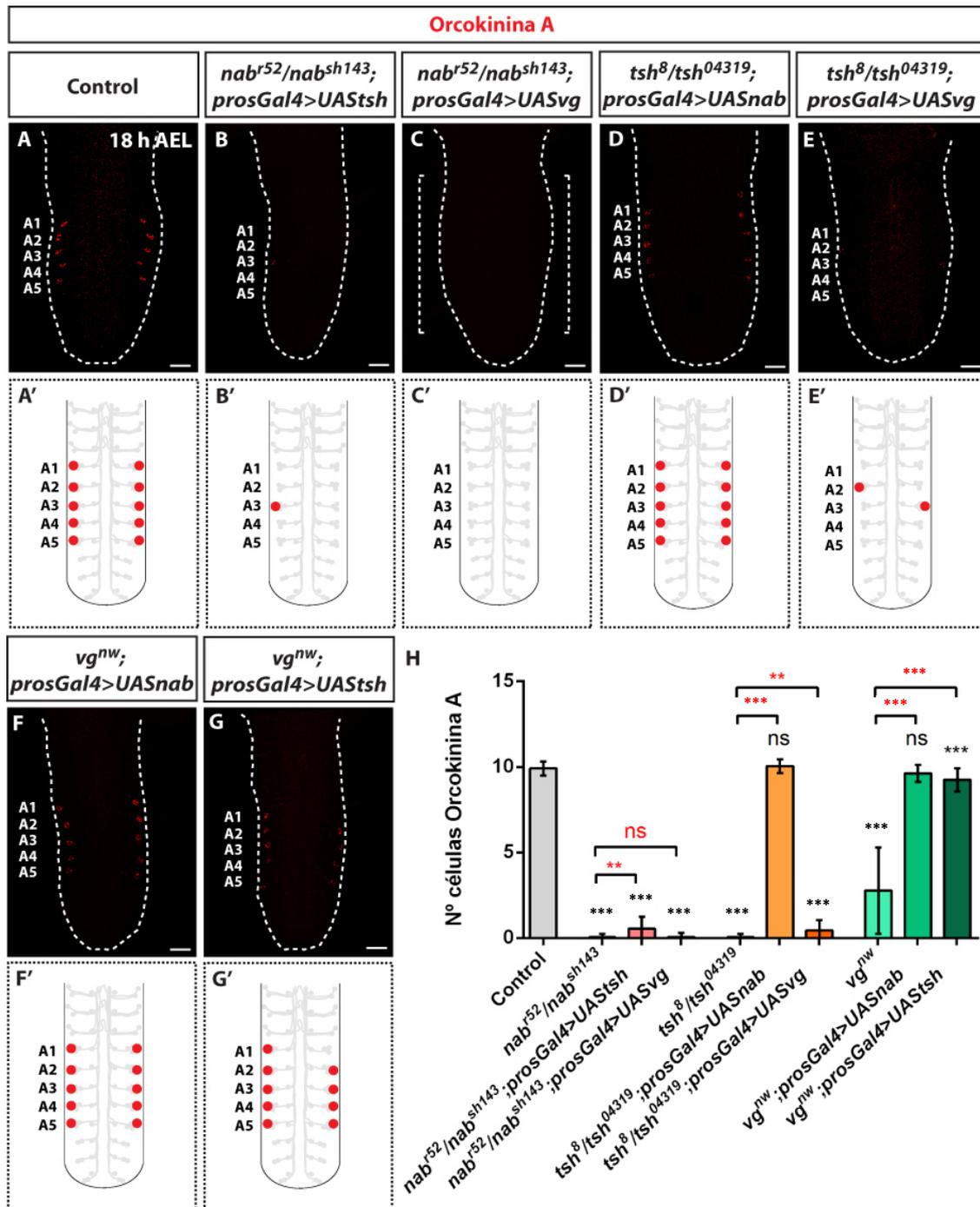
**Figura 35. Representación esquemática de los estudios de epistasia.** La figura describe la cascada de especificación del neuropéptido X en un organismo control. Esta requiere los genes  $a$  y  $b$ . Además, el gen  $a$  se encuentra jerárquicamente por encima de  $b$ . Sin embargo, la mutación de ambos genes causa la ausencia de expresión del gen  $x$ . Por tanto, para poder ordenar jerárquicamente  $a$  y  $b$  se requieren estudios de epistasias. El primer experimento muestra que la sobreexpresión del gen  $b$  en fondo mutante para  $a$  rescata el fenotipo salvaje, mientras que la sobreexpresión de  $a$  en fondo mutante para  $b$  no. Este resultado indica que la ausencia de  $b$  impide la progresión de la cascada y, por tanto, se encuentra jerárquicamente por debajo de  $a$ .

Por este motivo, se llevó a cabo un estudio de relaciones de epistasia entre estos tres factores de transcripción con el objetivo de adquirir un conocimiento más completo de su papel en la especificación de las neuronas de Orcokina A (ver **Figura 35**). Cabe señalar que en todos los casos se utilizaron mutantes nulos para estos estudios.

Para identificar si *tsh* y/o *vg* se encontraban por debajo de *nab* en el código de especificación, se realizó la sobreexpresión de cada uno de estos factores en un contexto mutante para *nab* (*nab<sup>r52</sup>/nab<sup>sh143</sup>*; *pros-Gal4>UAS-tsh* y *nab<sup>r52</sup>/nab<sup>sh143</sup>*; *pros-Gal4>UAS-vg*). Los resultados obtenidos revelaron que en ninguno de los dos casos se producía el rescate del fenotipo salvaje (ver **Figura 36B** y **Figura 36C**, respectivamente). Este dato indicaba que, a pesar de activar ectópicamente estos genes, la cascada seguía truncada en algún punto. Por tanto, *nab* se encontraría en un nivel inferior a *tsh* y *vg* en la cascada selectora terminal de especificación de las neuronas de Orcokina A.

Por el contrario, el rescate realizado mediante la introducción de *nab* en especímenes con fondo mutante para *tsh* y *vg* (*tsh<sup>8</sup>/tsh<sup>04319</sup>*; *pros-Gal4>UAS-nab* y *vg<sup>nw</sup>*; *pros-Gal4>UAS-nab*) conseguía recuperar de forma prácticamente completa el fenotipo salvaje (ver **Figura 36D** y **Figura 36F**, respectivamente). Este resultado era totalmente concordante con el obtenido anteriormente y refutaba el papel posterior de *nab* en esta cascada de especificación. A pesar de las mutaciones en los genes *tsh* y *vg*, la expresión de *nab* era suficiente para conseguir la correcta especificación de las neuronas y, por tanto, el fenotipo observado en estos mutantes podría deberse a un defecto en la activación de la transcripción de *nab* causado por su falta de función.

De la misma forma, el rescate con *tsh* en fondo mutante para *vg* (*vg<sup>nw</sup>*; *pros-Gal4>UAS-tsh*) conseguía recuperar el fenotipo salvaje, aunque en este caso de una forma menos robusta (ver **Figura 36G**). Este dato parecía indicar que el gen *vg* tiene un papel anterior a *tsh* en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokina A, aunque no se podría descartar que *vg* activara también algún gen posterior de la cascada debido a que el rescate no era totalmente completo.



**Figura 36. Relaciones de epistasia entre los genes *nab*, *tsh* y *vg* en la especificación de las neuronas de Orcokina A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo (A) control, (B) *nab<sup>r52</sup>/nab<sup>sh143</sup>; pros-Gal4>UAS-tsh*, (C) *nab<sup>r52</sup>/nab<sup>sh143</sup>; pros-Gal4>UAS-vg*, (D) *tsh<sup>8</sup>/tsh<sup>04319</sup>; pros-Gal4>UAS-nab*, (E) *tsh<sup>8</sup>/tsh<sup>04319</sup>; pros-Gal4>UAS-vg*, (F) *vg<sup>nw</sup>; pros-Gal4>UAS-nab* y (G) *vg<sup>nw</sup>; pros-Gal4>UAS-tsh*. Los corchetes representan la ausencia de células. Escala: 20  $\mu$ m. (A'-G') Esquemas representativos de los resultados observados. (H) Número medio de células de Orcokina A por CNV en cada genotipo estudiado (n $\geq$ 10 CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos negros indican diferencias significativas con respecto al control y los rojos diferencias significativas con respecto al mutante correspondiente a cada rescate (\*\*\*=p<0,001; \*\*= p<0,01; ns = no significativo). Prueba U de Mann-Whitney.

Finalmente, como muestra la **Figura 36E**, la introducción de *vg* en fondo mutante para *tsh* (*tsh*<sup>8</sup>/*tsh*<sup>04319</sup>; *pros-Gal4*>*UAS-vg*) no conseguía rescatar el fenotipo salvaje. Este resultado era esperable debido a que la sola sobreexpresión de *vg* tenía efectos muy variables en el número de células orcokininérgicas encontradas en la CNV (ver **Figura 36C**). Por tanto, este resultado no era suficiente para apuntar que *vg* actuara posteriormente a *tsh* en esta cascada de especificación terminal.

**Por tanto, los resultados obtenidos parecen indicar que el factor de transcripción Nab se localiza jerárquicamente por debajo de Tsh y Vg en la cascada de especificación terminal de las neuronas de Orcokinina A. Por su parte, la actuación de Tsh parece situarse por debajo de Vg.**

## **6. Estudio del papel de la helicasa Mcm5 en la correcta especificación terminal de las células de Orcokinina A**

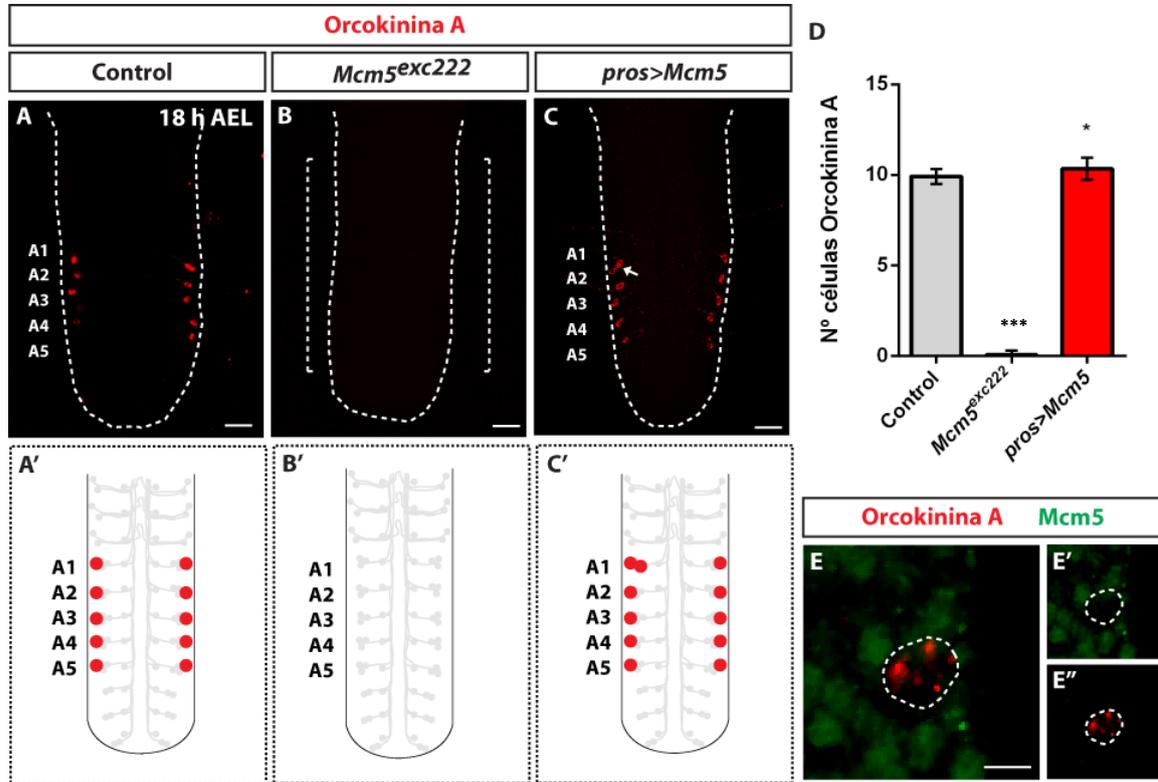
El estudio del papel de *Mcm5* en la adquisición del destino terminal de las células orcokininérgicas se llevó a cabo mediante una inmunotinción contra Orcokinina A en especímenes de estadio 18h AEL en contexto de falta de función (*Mcm5*<sup>exc222</sup>) y ganancia de función (*pros-Gal4*>*UAS-Mcm5*).

Los resultados obtenidos revelaron que la falta de función de *Mcm5* ocasionaba un fenotipo de ausencia total de células orcokininérgicas (ver **Figura 37B**), confirmando los datos obtenidos en el *screening* realizado previamente.

Por su parte, la sobreexpresión de *Mcm5* desde NB hasta neurona postmitótica, utilizando para ello el *driver pros-Gal4*, daba lugar a un ligero pero significativo aumento del número de células de Orcokinina A encontradas en la CNV. Cabe destacar que estas células ectópicas aparecían siempre en los segmentos A1-A5 y nunca en segmentos anteriores o posteriores (ver **Figura 37C**).

Finalmente, se realizaron inmunotinciones contra *Mcm5* y se analizó su expresión en las células de Orcokinina A con el objetivo de obtener más información acerca del papel de dicha helicasa en la especificación de estas neuronas.

Como puede observarse en la figura, las células de Orcokinina A no muestran expresión de Mcm5 en estadio 18 h AEL (ver **Figura 37E**).



**Figura 37. Papel del factor de la helicasa Mcm5 en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.** Inmunotinción contra el neuropéptido Orcokinina A (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *Mcm5<sup>exc222</sup>* y **(C)** *pros-Gal4>UAS-Mcm5*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Las flechas marcan células ectópicas. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-C')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(D)** Representación del número medio de células de Orcokinina A por CNV en cada genotipo estudiado ( $n \geq 10$  CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*= $p < 0,001$ ; \* =  $p < 0,1$ ). Prueba U de Mann-Whitney. **(E)** Ausencia de expresión de Mcm5 (verde) en las células de Orcokinina A (rojo). Escala: 2  $\mu$ m.

Los experimentos realizados sugieren que la helicasa Mcm5 resulta necesaria pero no suficiente para la adquisición del destino terminal Orcokinina A.

## 7. Estudio del papel de la helicasa Mcm5 en la correcta especificación terminal de las células de FMRFa

Como se ha descrito previamente, Mcm5 presenta actividad biológica de tipo helicasa participando en procesos relacionados con la replicación del ADN y la división celular. Para poder entender en qué tipo de procesos biológicos podría estar implicado este factor en el contexto de la especificación celular, se analizó el fenotipo de este mutante en otros modelos celulares que permiten una mayor resolución debido a la disponibilidad de herramientas, marcadores y conocimiento previo.

El resultado obtenido en la mayoría de los casos fue una ausencia total de alteraciones en la especificación celular. Este dato parecía indicar que el fenotipo observado podía ser debido a un papel específico de Mcm5 en la determinación de este destino neuropeptidérgico. No obstante, cabe señalar que en este estudio complementario se obtuvo un fenotipo similar de ausencia de especificación celular en el caso de las neuronas Tv4. Por ello, se llevó a cabo un análisis más detallado de la implicación de Mcm5 en la adquisición del destino FMRFa.

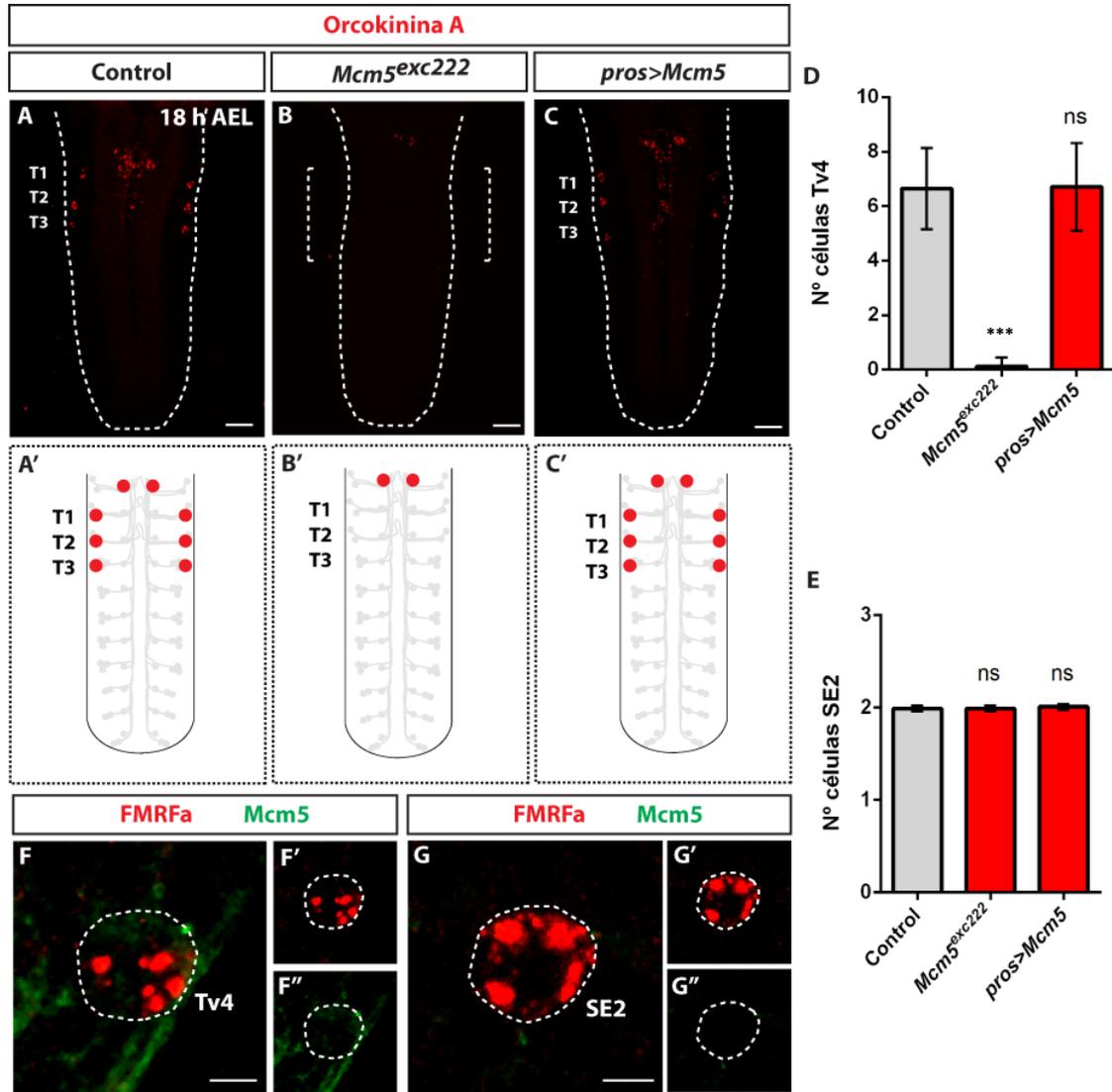
Para ello, se realizaron inmunotinciones contra el neuropéptido FMRFa en especímenes de estadio 18h AEL en contexto de falta de función (*Mcm5<sup>exc222</sup>*) y ganancia de función (*pros-Gal4>UAS-Mcm5*).

Los resultados obtenidos revelaron que la falta de función de Mcm5 daba lugar a la ausencia total de especificación de las células Tv4 (ver **Figura B**), confirmando los datos obtenidos en el estudio realizado previamente.

En cambio, la sobreexpresión del gen *Mcm5* desde el *driver pros-Gal4*, es decir, a nivel de NB, no ocasionaba ningún tipo de alteración en la especificación de las neuronas Tv4 (ver **Figura 38C**).

Cabe señalar que, en todos los casos, los fenotipos observados en relación a las células FMRFamidérgicas de la CNV afectaban únicamente a las células Tv4. No obstante, *D. melanogaster* cuenta con otro subgrupo neuronal en la CNV que expresa dicho neuropéptido: las dos células subesofágicas SE2 (Losada-Pérez *et al.*, 2010b). Sin embargo, éstas no se veían afectadas en ninguna de las condiciones estudiadas

(ver **Figura 38**). Este dato reforzaría aún más la hipótesis de un papel específico de Mcm5 en la especificación de los conjuntos celulares de Orcokina A y Tv4.



**Figura 38. Papel del factor de la helicasa Mcm5 en la especificación de las neuronas FMRFamidérgicas.** Inmunotinción contra el neuropéptido FMRFa (rojo) en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo **(A)** control, **(B)** *Mcm5<sup>exc222</sup>* y **(C)** *pros-Gal4>UAS-Mcm5*. Los corchetes representan la ausencia de células con respecto al control. Escala: 20  $\mu$ m. **(A'-C')** Esquemas representativos de los resultados observados. **(D-E)** Representación del número medio de células Tv4 y SE2, respectivamente, por CNV en cada genotipo estudiado (n $\geq$ 10 CNVs en todos los genotipos). Las barras de error representan errores estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (\*\*\*)= $p<0,001$ ). Prueba U de Mann-Whitney. **(E)** Expresión de Mcm5 (verde) en las células Tv4 (rojo). **(F)** Ausencia de expresión de Mcm5 (verde) en las células SE2 (rojo). Escala: 2  $\mu$ m.

Finalmente, las inmunotinciones conjuntas contra Mcm5 y FMRFa revelaron que las células Tv4 muestran expresión de Mcm5 en estadio 18 h AEL (ver **Figura 38F**), mientras que las células SE2 no (ver **Figura 38G**).

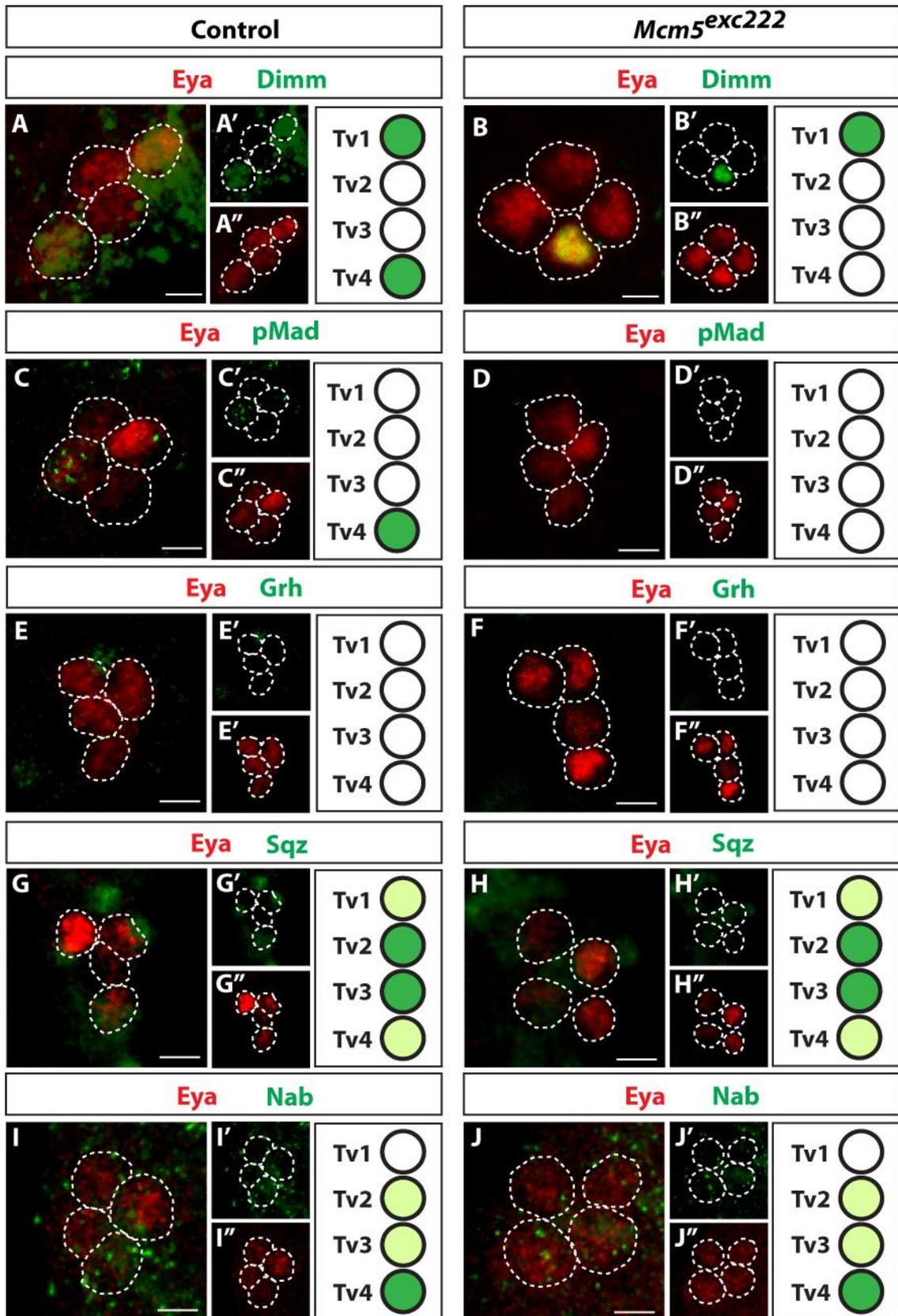
**Los experimentos realizados sugieren que la helicasa Mcm5 resulta necesaria pero no suficiente para la adquisición del destino terminal FMRFa en las células Tv4. Sin embargo, no es necesaria para la especificación de las células SE2.**

#### **8. Análisis de la expresión de los marcadores del *cluster* de Ap en fondo mutante para el gen *Mcm5***

Dado los resultados anteriores, cabía la posibilidad de que el fenotipo del mutante *Mcm5* en las células Tv4 estuviera relacionado con la alteración de alguno de los factores de transcripción implicados en la especificación de estas neuronas. Con el objetivo de comprobarlo, se realizaron diferentes inmunotinciones contra marcadores de las células del *cluster* de Ap en genotipos control y mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*. Para la identificación de estas neuronas se utilizó un anticuerpo contra Eyes absent (*Eya*), factor con el que puede identificarse inequívocamente el grupo de Ap (Miguel-Aliaga *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos revelaron que se perdía la expresión de los factores Dimmed (*Dimm*) (ver **Figura 39A y B**) y Mad fosforilada (*pMad*) (ver **Figura 39C y D**), mientras que el resto no estaban afectados ni en las células Tv4 ni en el resto del *cluster* de Ap (ver **Figura 39G-J**). Cabe destacar que los dos marcadores afectados son, precisamente, los que comienzan a expresarse más tardíamente en este grupo de neuronas.

**Por tanto, los resultados obtenidos parecen indicar que la pérdida de neuronas FMRFamidérgicas en mutantes *Mcm5* es debida, fundamentalmente, a la falta de activación de la ruta TGF- $\beta$ /BMP.**



**Figura 39. Expresión diferencial de marcadores en el *cluster* de Ap.** Inmunotinción en embriones de estadio 18 h AEL de genotipo control y *Mcm5<sup>exc222</sup>* para Eya (rojo) y los siguientes marcadores del *cluster* de Ap (verde): (A-B) Dimm, (C-D) pMad, (E-F) Grh, (G,H) Sqz y (I,J) Nab. Escala: 2  $\mu$ m.



### **CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN EMBRIONES DE *D. melanogaster* MUTANTES DE FALTA DE FUNCIÓN PARA EL GEN *Mcm5***

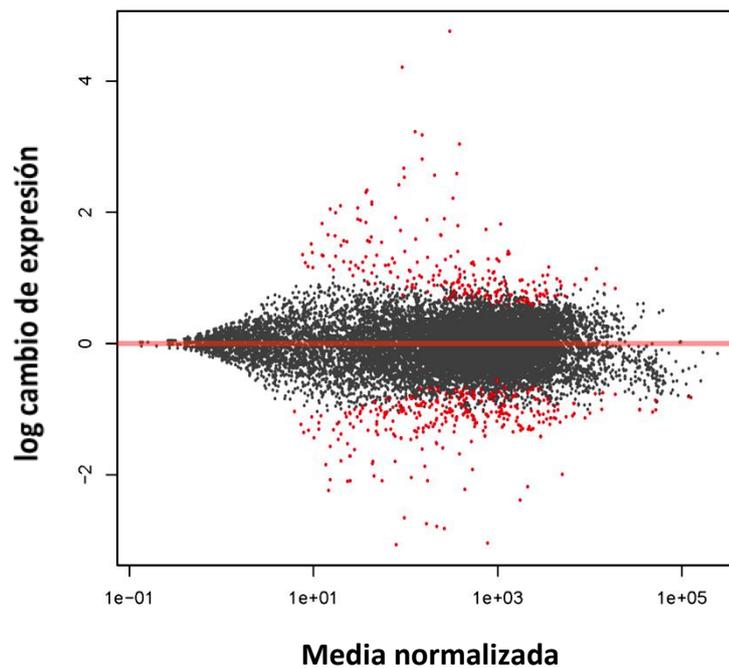
Se denomina transcriptoma al conjunto de moléculas de ARN mensajero (ARNm) que contiene una célula o un grupo de células en un momento concreto y bajo unas condiciones fisiológicas determinadas. El estudio y análisis del transcriptoma es fundamental para la comprensión de la función y actividad biológica de los genes ya que, en general, si un gen se expresa en un lugar y en un momento determinado es porque está desempeñando una función. La activación o inhibición de la transcripción depende de estímulos internos y externos que activan cascadas de señalización para generar una respuesta. En este sentido, la diferenciación celular es un proceso altamente dependiente de la expresión diferencial de genes. Actualmente, la secuenciación de alto rendimiento del ARN se postula como el método más eficaz para el estudio del transcriptoma. Supone ventajas con respecto a otras herramientas más clásicas, como los *microarrays* de ADNc, puesto que presenta un alto nivel de reproducibilidad, permite identificar isoformas y puede realizarse sin necesidad de contar previamente con un genoma de referencia (Costa-Silva *et al.*, 2017). Esta metodología ha adquirido tal relevancia que actualmente se emplea en proyectos tan ambiciosos como el *NeuroSeq Project*, gracias al cual ya se han conseguido caracterizar más de 200 tipos neuronales diferentes en función de su transcriptoma (Sugino *et al.*, 2019).

#### **1. Validación del análisis del transcriptoma de los mutantes *Mcm5<sup>exc222</sup>***

La helicasa *Mcm5* participa en mecanismos moleculares relacionados con la división celular y la reparación de daño en el ADN. Se trata de procesos muy generales y ubicuos que afectan prácticamente a todas las células del organismo. Sin embargo, esta proteína parece estar implicada de forma muy específica en la adquisición de los destinos terminales neuropeptidérgicos Orcokina A y FMRFa. Dado que las células FMRFamidérgicas Tv4 constituyen uno de los sistemas más sólidos para el estudio de

la especificación neuronal, se han utilizado en esta tesis como modelo para llevar a cabo un estudio más detallado del papel de la helicasa en este contexto.

Para ello, se secuenció el ARN de embriones de estadios comprendidos entre 15 y 18 horas AEL de genotipo  $w^{1118}$  (control) y mutantes para el gen  $Mcm5^{exc222}$ , con el objetivo de estudiar la expresión diferencial de genes entre ellos. Se realizaron 3 réplicas biológicas por condición. Mediante esta técnica se obtuvieron lecturas correspondientes al ARNm de 21.075 isoformas proteicas (ver archivo digital adjunto), de las cuales 415 mostraban diferencias significativas en el enriquecimiento con respecto al control (ver **Figura 40**). De estas, 171 presentaban una expresión significativamente menor en los mutantes de falta de función de  $Mcm5$  (ver **Anexo II**), mientras que 244 se encontraban sobreexpresadas en dicha condición experimental (ver **Anexo III**).

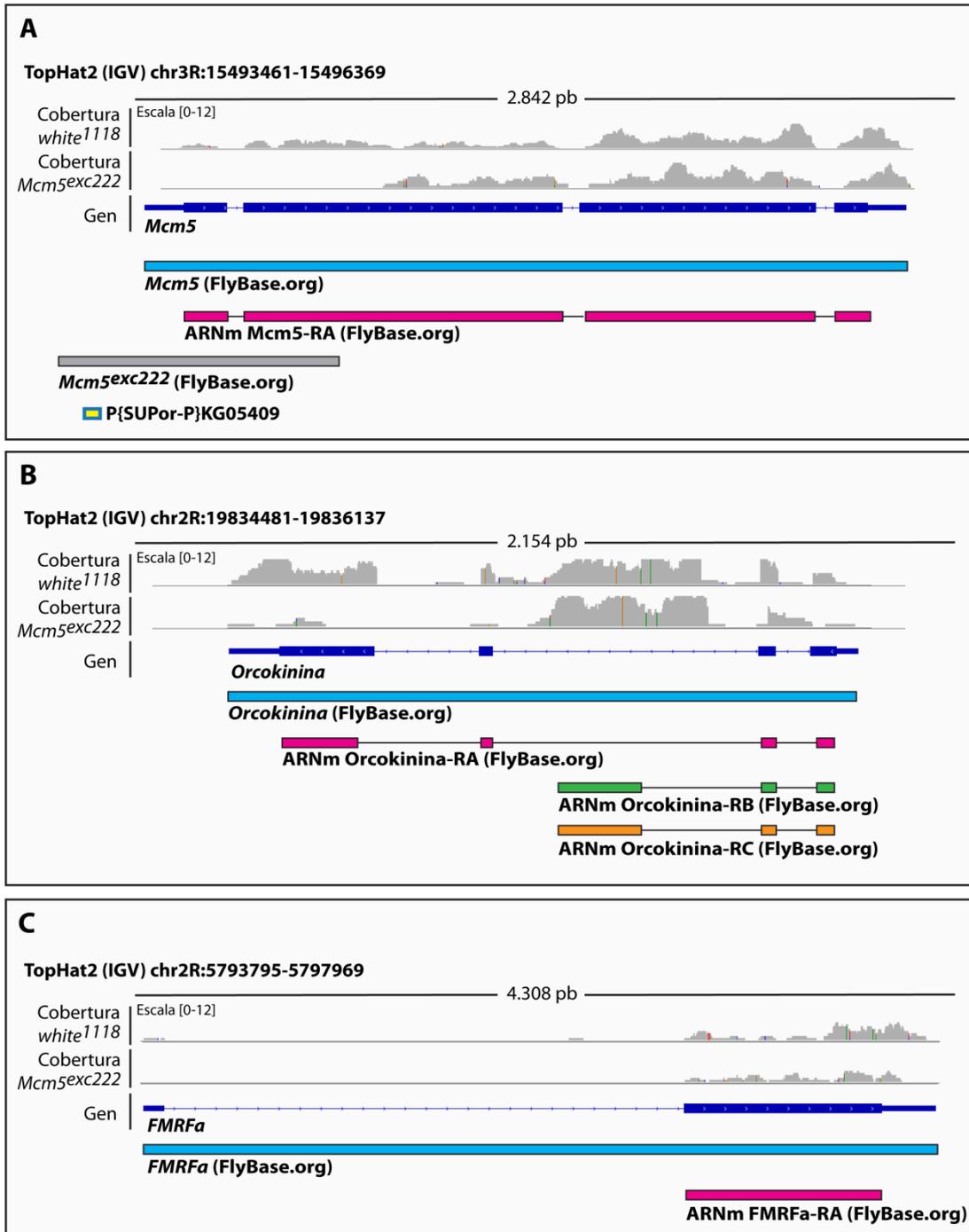


**Figura 40.** Gráfico de Bland-Altman representativo de las diferencias de expresión génica entre los embriones mutantes para el gen  $Mcm5$  y los embriones control. El gráfico muestra el cambio de expresión de cada gen en escala logarítmica frente a la media de expresión normalizada. Cada gen se representa mediante un punto, el cual es rojo o gris en función de que existan o no diferencias de expresión significativas, respectivamente. Los puntos que se localizan en valores de ordenadas positivos corresponden a genes cuya expresión es mayor en mutantes  $Mcm5$ . Por el contrario, aquéllos localizados en valores negativos corresponden a genes cuya expresión se ve reducida. Gráfico realizado con DESeq2. Análisis estadístico por distribución hipergeométrica ajustada por el método de Benjamini-Hochberg; p-valor ajustado < 0,05.

Con el objetivo de validar estos resultados, se analizaron detalladamente los datos obtenidos en la secuenciación para los genes *Mcm5*, *orcokina A* y *FMRFa*. Dados los resultados derivados de los estudios anteriores de inmunomarcaje, se esperaba una reducción significativa en el enriquecimiento de lecturas con respecto al genotipo salvaje en estos genes y, por tanto, eran buenos candidatos como control del experimento. En el análisis se tuvo además en cuenta la distribución de los alineamientos en las secuencias exónicas de cada gen.

Como puede observarse en la **Figura 41A**, los mutantes para el gen *Mcm5* presentaban una reducción muy clara en el enriquecimiento de lecturas en el primer exón y la mitad del segundo exón de la secuencia correspondiente al ARNm de *Mcm5*. Por su parte, no se observaba un cambio acusado en el resto de la secuencia. No obstante, este hecho correspondía a lo esperado. El mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>* se originó a partir de una delección ocasionada por la escisión de un elemento transponible de tipo P(SUPor-P)KG05409 (Lake *et al.*, 2007). Debido a su localización, la delección afectó únicamente al primer exón y a una pequeña parte del segundo, lo cual se refleja en la diferencia en enriquecimiento de secuencias de estas regiones específicamente.

Por otro lado, los mutantes para el gen *Mcm5* presentaban una reducción acusada en el enriquecimiento de lecturas en el ARNm del gen *orcokina*, aunque exclusivamente en el segundo exón (ver **Figura 41B**). Como se ha comentado anteriormente, el neuropéptido Orcokina cuenta con diferentes isoformas, siendo este segundo exón único para la isoforma A. Por tanto, este resultado parece indicar que la falta de función de *Mcm5* afecta a la expresión de la Orcokina A, pero no al resto de isoformas de esta proteína.



**Figura 41. Distribución de los alineamientos obtenidos tras el análisis de la secuenciación de ARN.** Los gráficos muestran el enriquecimiento en secuencias correspondiente a cada región exónica de los genes: **(A)** *Mcm5*, **(B)** *orcokinina* y **(C)** *FMRFa*. Aparecen también las secuencias génicas en color añil (TopHat2) y cian (FlyBase), las diferentes isoformas en magenta, verde y naranja (FlyBase), la región descubierta por la delección *Mcm5<sup>exc222</sup>* en gris y la localización del elemento transponible causante de la misma en amarillo. En la esquina superior izquierda se indican las coordenadas cromosómicas y se establece la escala visual en pares de bases en función de la longitud de cada secuencia. La escala de representación de la cobertura es igual en las tres figuras. Gráficos realizados con TopHat2 (IGV).

Finalmente, los resultados no revelaron diferencias significativas en los niveles de expresión de FMRFa en mutantes para el gen *Mcm5* (ver **Figura 41C**). Los estudios realizados mediante inmunomarcajes habían señalado la ausencia de expresión de este neuropéptido en dicha condición mutante. Sin embargo, la FMRFa no se expresa únicamente en el SNC, sino que también se localiza en otras partes del embrión, por ejemplo, en el sistema digestivo. Como también revelaron los resultados anteriormente citados, la ausencia de FMRFa se producía en las células Tv4 pero no en el resto de células FMRFamidérgicas de la CNV (SE2). Por tanto, parece razonable que no se observe la reducción del enriquecimiento en lecturas de este neuropéptido ya que presumiblemente parece tener lugar en solamente 6 células del embrión completo.

Además, teniendo en cuenta los datos obtenidos en el Capítulo II de Resultados (ver apartado 8. *Análisis de la expresión de marcadores del cluster de Ap en fondo mutante para el gen Mcm5*), se analizaron los valores de RPKM, enriquecimiento de lecturas y significancia estadística de los genes estudiados anteriormente mediante inmunomarcajes.

Como puede observarse en la **Tabla 6**, el único factor que mostraba una expresión diferencial significativa entre los controles y los mutantes *Mcm5* es el factor de transcripción Nab, cuyo enriquecimiento se encontraba disminuido en los mutantes. En el capítulo anterior no se observó una alteración en la expresión de Nab en las células del *cluster* de Ap ocasionada por la falta de función de *Mcm5*. No obstante, es importante destacar que este factor de transcripción ha sido identificado en este trabajo como necesario para la especificación de las neuronas de Orcokinina A, las cuales también ven alteradas su correcta especificación en dicho fondo mutante. Por tanto, este resultado sugiere que el papel de *Mcm5* en la especificación de las células orcokininérgicas podría estar relacionado con el factor Nab.

Por otro lado, los resultados no revelan diferencias de expresión en Dimm y Mad (ver **Tabla 5**), factores que se veían alterados por la falta de función de *Mcm5* en las células Tv4 según los inmunomarcajes realizados anteriormente. No obstante, es necesario tener en cuenta que la secuenciación de ARN se realizó con embriones completos, lo cual puede enmascarar una disminución en la expresión de

determinados factores si ocurre de forma muy específica en pocas células. De hecho, la expresión de Dimm en las células Tv1 se mantiene a pesar de la mutación en *mcm5*. Además, en el caso de Mad, sólo se reportó ausencia de inmunomarcaje en su estado fosforilado. Por tanto, este resultado sugeriría que Mcm5 podría estar actuando en algún punto de la ruta TGF- $\beta$ /BMP, de forma que su falta de función impediría la fosforilación de Mad y, con ello, su correcta actividad.

**Tabla 6. Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial de la secuenciación de ARN de especímenes con genotipo control y mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*.** En la tabla se muestran los datos referentes a algunos de los marcadores de las células del *cluster* de Ap. Para todos ellos se indican los transcritos (T), las isoformas (I), los valores de RPKM de cada muestra (C: control; M: mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*), el enriquecimiento de lecturas (E) y el p-valor ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg (p-aj). Los asteriscos indican diferencias significativas (p-aj < 0,05). Análisis realizado con DESeq2.

T	I	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
Dimm	RA	0.70	0.99	0	1.45	0	0.62	0.20	0.86
Eya	RA	3.22	0.71	1.29	17.78	84.34	2.81	0.20	0.51
Eya	RB	1.06	2.32	3.23	4.82	0	0.56	-0.02	0.91
Mad	RA	1.53	5.00	8.61	7.97	7.95	5.70	-0.26	0.37
Grh	RB	0	18.49	0	24.41	0	0	-0.40	0.67
Grh	RE	10.85	0	60.12	19.17	21.37	0	-0.06	0.95
Grh	RF	0	25.24	10.75	29.94	1.05	0	0.01	0.99
Grh	RG	5.76	2.35	0	0	8.88	1.36	-0.03	0.99
Grh	RI	0	1.32	0	8.86	0	2.41	-0.02	0.99
Grh	RJ	0	5.58	0	3.79	0	22.75	0.02	0.99
Grh	RK	0	0	9.84	0.04	0	0	0.04	0.97
Sqz	RA	5.38	6.41	5.23	5.59	4.16	2.92	-0.34	0.66
Nab	RB	3.78	5.48	6.14	53.68	0	37.41	0.77	*0.04

**Los datos obtenidos parecen indicar que el análisis de expresión diferencial realizado a partir de los datos de secuenciación del ARN de embriones control y mutantes para el gen *Mcm5* se ha realizado correctamente. La distribución de los alineamientos y enriquecimiento de lecturas parece ser concordante con los resultados obtenidos previamente mediante estudios de inmunomarcaje.**

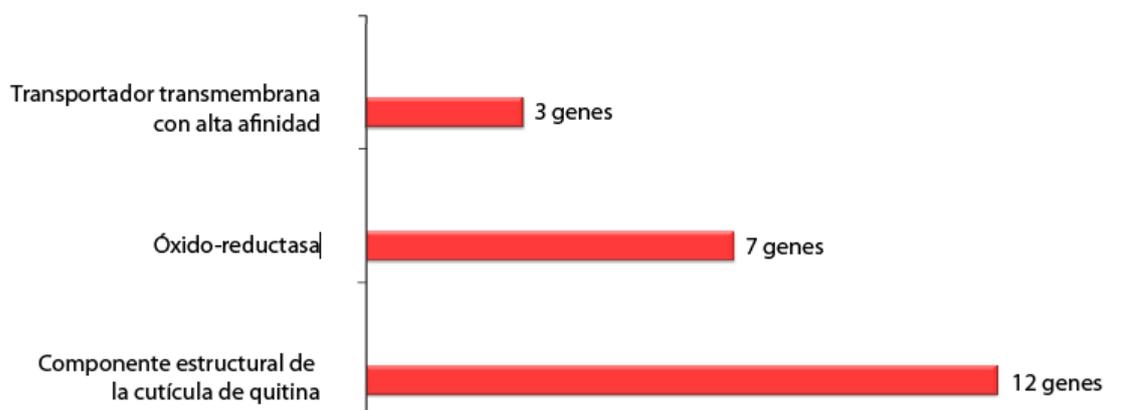
## 2. Análisis del enriquecimiento de la ontología génica

Puesto que el objetivo de este estudio era la identificación de procesos biológicos que pudieran verse alterados debido a la falta de función de *Mcm5*, se llevó a cabo un estudio de enriquecimiento de la ontología génica con los 415 genes que revelaron diferencias significativas.

El análisis fue realizado mediante la herramienta GeneCodis3 a tres niveles: proceso biológico, función molecular y componente celular. Además, se llevó a cabo un análisis modular que englobaba los tres niveles anteriores.

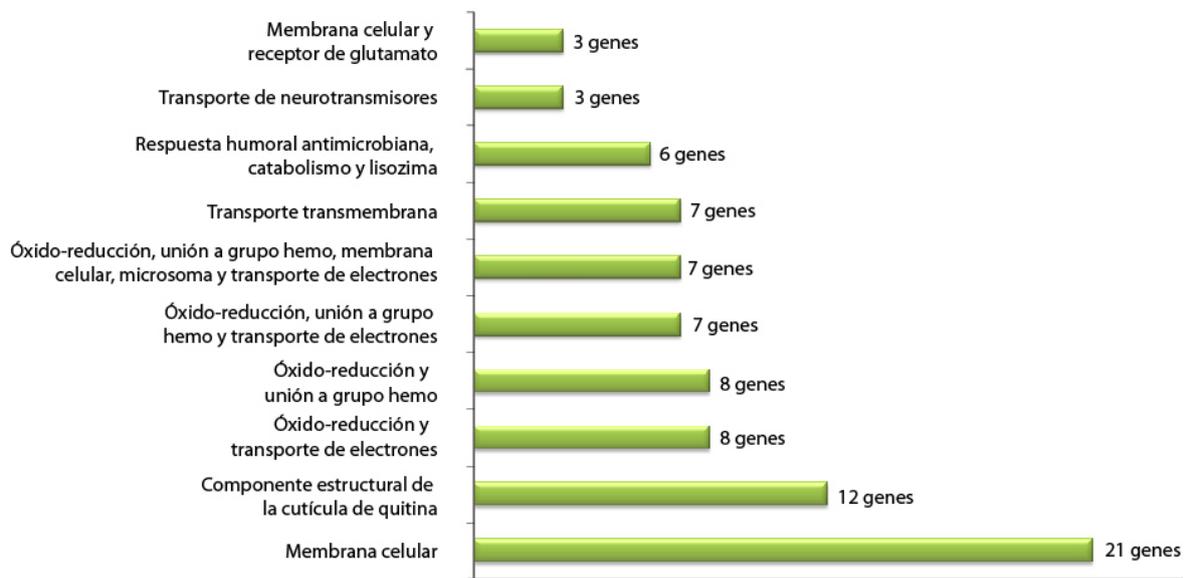
Los resultados obtenidos no revelaron un enriquecimiento significativo en ningún grupo de ontología génica a nivel de proceso biológico ni componente celular. Por su parte, el estudio a nivel de función molecular y el análisis modular sí mostraron diferentes grupos enriquecidos. La significación estadística fue calculada mediante distribución hipergeométrica y ajustada por el método de Benjamini-Hochberg para un p-valor ajustado  $< 0,05$ .

Como puede observarse en la **Figura 42**, el estudio a nivel de función molecular reveló diferencias significativas en tres grupos de ontología génica: transportador transmembrana de alta afinidad (GO:0015381), óxido reductasa (GO:0016491) y componente estructural de la cutícula de quitina (GO:0005214).



**Figura 42.** Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento de la ontología génica a nivel de función molecular. El gráfico de barras muestra el número de genes englobados en cada grupo de ontología. Análisis realizado con GeneCodis3.

Por otro lado, el análisis modular mostró diferencias significativas en varios grupos de ontología génica (ver **Figura 43**). Entre los más representados, cabe destacar los siguientes: membrana celular (GO:0016020), componente estructural de la cutícula de quitina (GO:0005214), óxido-reducción (GO:0055114), transporte de electrones (GO:0009055), unión a grupo hemo (GO:0020037), transporte transmembrana (GO:00055085), transporte de neurotransmisores (GO:0006836) y receptor de glutamato (GO:0004970).



**Figura 43. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis modular de enriquecimiento de la ontología génica.** El gráfico de barras muestra el número de genes englobados en cada grupo de ontología. Análisis realizado con GeneCodis3.

A pesar de los resultados obtenidos, los grupos de ontología identificados no parecían estar directamente relacionado con la especificación de destinos neurales. Por tanto, no se realizaron análisis en mayor profundidad con ninguno de ellos.

**Los datos relativos al enriquecimiento de la ontología génica muestran diferencias significativas a nivel de función molecular y en el análisis modular en varios grupos de ontología. No obstante, ninguno de ellos parece estar directamente relacionado con especificación celular.**

### 3. Análisis de la expresión génica diferencial de factores implicados en axonación y ruta BMP en mutantes para el gen *Mcm5*

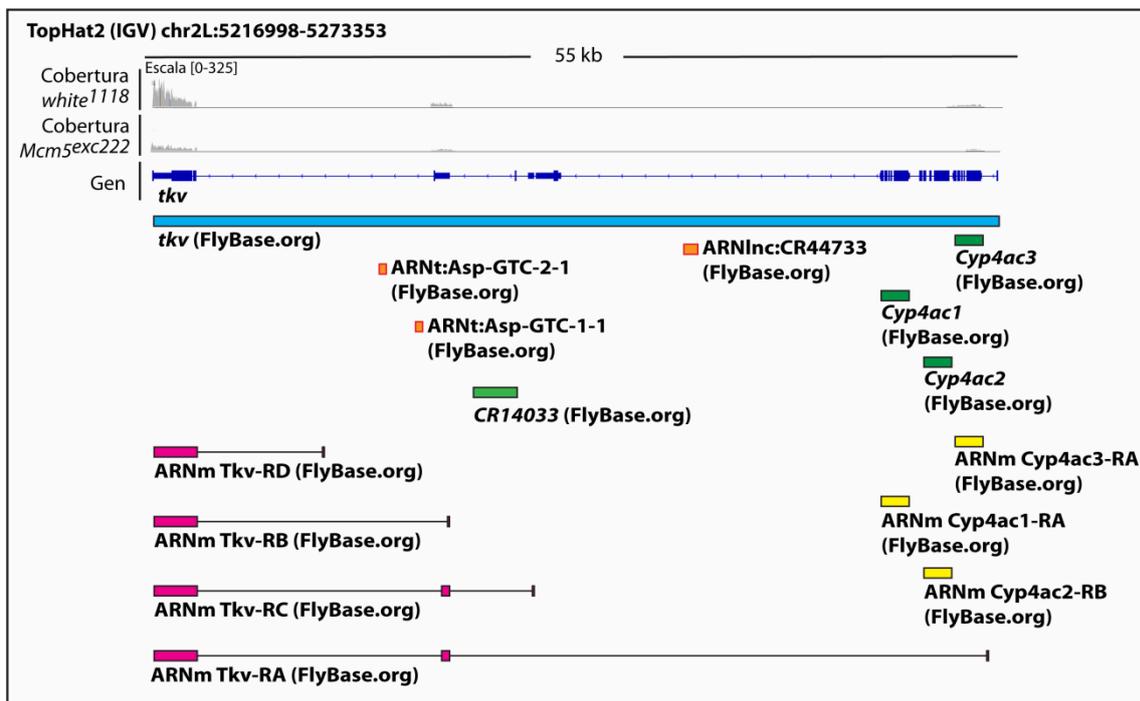
Los resultados anteriores parecían sugerir una posible implicación de *Mcm5* en la señalización de la ruta TFG- $\beta$ /BMP en las neuronas Tv4, la cual podría ser directa o indirecta a través de la participación en el proceso de axonación y búsqueda de la neurona postsináptica.

Por ello, se realizó una búsqueda de factores clásicamente implicados en esta ruta de señalización, así como de otros relacionados con el proceso de axonación neuronal. De todos ellos, se analizaron los valores de RPKM, enriquecimiento de lecturas y significancia estadística, con objeto de encontrar diferencias de expresión significativas entre los controles y los mutantes para el gen *Mcm5*.

**Tabla 7. Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial de la secuenciación de ARN para factores implicados en axonación y ruta BMP.** En la tabla se indican, para cada factor, los transcritos, las isoformas (I), los valores de RPKM de cada muestra (C: control; M: mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*), el enriquecimiento de lecturas (E) y el p-valor ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg (p-aj). Análisis realizado con DESeq2.

Transcrito	I	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
Mad	RA	1.53	5.00	8.61	7.97	7.95	5.70	0.26	0.37
Gbb	RA	16.74	15.03	21.81	25.10	14.32	20.07	0,19	0.79
Med	RA	0.07	1.27	0.24	0.56	0.63	0.09	0.32	0.35
Med	RB	0.08	0.09	0.02	0.87	0.08	0.45	0.08	0.79
Sax	RA	15.56	17.50	0	12.72	0	0	-0.02	0.92
Sax	RB	0	0	0	0	0	0	-0.02	0.92
Wit	RB	7.14	8.28	7.32	33.22	45.47	4.86	-0.06	0.96
Tkv	RA	0.26	0.42	0.06	0	0	0.66	-0.56	0.86
Tkv	RB	0	0	4.33	0	0	0	-0.56	0.42
Tkv	RC	0	0	20.17	0	0.87	0	-0.50	0.41
Smox	RA	10.99	13.23	11.67	4.912	1.683	28.21	0.10	0.62
Dpp	RA	2.22	0	3.30	2.77	0	0	-0.36	0.12
Dpp	RB	0	13.88	0	0	12.06	0	-0.37	0.10
Dpp	RC	0	0	0	0	0	15.77	-0.33	0.16
Dpp	RD	1.55	1.78	13.78	2.60	1.37	0	-0.34	0.15
Dpp	RE	3.44	0	0	2.70	0	0	-0.38	0.10
Fas2	RA	22.23	29.56	18.60	0.02	10.61	12.26	-0.03	0.90
Fas2	RB	5.03	0	8.32	0.56	5.90	4.75	0.03	0.89
Fas2	RC	11.17	15.06	9.11	1.09	3.93	6.02	0.01	0.96
Nerfin-1	RA	12.16	2.474	9.067	16.41	0.34	6.52	-0.32	0.29
Dbx	RC	1.49	24.67	6.99	77.52	2.11	0	-0.01	0.97

Los resultados obtenidos revelaron que no había diferencias significativas de expresión en ninguno de los transcritos analizados (ver **Tabla 7**). No obstante, sí se observaba una tendencia hacia la disminución de la expresión de los factores de la vía TGF-  $\beta$ /BMP en mutantes para el gen *Mcm5*, especialmente del factor Tkv. Por ello, se realizó un análisis más exhaustivo de los datos obtenidos para este integrante de la ruta.



**Figura 44.** Distribución de los alineamientos obtenidos tras el análisis de la secuenciación de ARN para el gen *tkv*. Los gráficos muestran el enriquecimiento en secuencias correspondiente a cada región exónica. Aparecen también las secuencias génicas de *tkv* en color añil (TopHat2) y cian (FlyBase) y las diferentes isoformas de su ARNm en magenta (FlyBase). Asimismo, se indican otros genes localizados en esta misma región cromosómica en verde y sus correspondientes ARNm en amarillo (FlyBase). Finalmente, se indica la presencia de ARNs no codificantes en color naranja (FlyBase). En la esquina superior izquierda se indican las coordenadas cromosómicas y se establece la escala visual en kilobases. Gráfico realizado con TopHat2 (IGV).

Como puede observarse en la **Figura 44**, los mutantes para el gen *Mcm5* presentaban el enriquecimiento de lecturas reducido principalmente en el primer y segundo axón del gen *tkv*. El primer exón es común para las cuatro isoformas de Tkv, mientras que el segundo es común para dos de ellas. Más importante aún resulta que

estas regiones son exclusivas de isoformas de *Tkv*, mientras que el resto de la secuencia es compartida por otros genes y ARNs no codificantes. Por tanto, la ausencia de significación estadística podría deberse a la detección de lecturas para estos elementos, que, al localizarse en el mismo punto del genoma que *tkv*, son contabilizadas como lecturas del propio gen.

El mismo análisis fue llevado a cabo con el resto de factores reflejados en la **Tabla 6**. Sin embargo, en estos casos, la presencia de otros genes o secuencias no codificantes no podía explicar el resultado obtenido (datos no mostrados).

**Por tanto, los datos parecen indicar que la falta de función de Mcm5 podría estar afectando a la señalización vía TGF- $\beta$ /BMP en las neuronas Tv4 a través de la disminución de la expresión de *tkv*.**

#### **4. Análisis de la expresión génica diferencial de factores con función helicasa en mutantes para el gen *Mcm5***

*Mcm5* forma parte del complejo hexamérico *Mcm2-7*, el cual actúa como helicasa esencial para los procesos de iniciación y elongación del ADN durante la replicación (Moyer *et al.*, 2006). Sin embargo, en los mutantes para dicho factor no se observaba un fenotipo atribuible a la falta de esta función helicasa. Además, los mutantes para la mayoría de helicasas del complejo estudiados en el *targeted screening* tampoco daban lugar a un fenotipo de falta de células de Orcokina A ni de FMRFa (datos no mostrados), a excepción de *Dpa* o *Mcm4*, que ocasionaba la ausencia de células de Orcokina A pero no de FMRFa (ver **Tabla 5** en el apartado 1. *Búsqueda genética dirigida para la identificación de factores implicados en la especificación de las neuronas de Orcokina A* del Capítulo II de Resultados). Estos datos parecían indicar que la función de *Mcm5* en este sistema era independiente de su función helicasa en el complejo *Mcm2-7*.

Por ello, se analizó la expresión diferencial de diferentes helicasas (algunas de ellas componentes también del complejo *Mcm2-7*) con el objetivo de validar si alguna

de ellas podría estar supliendo el papel de *Mcm5* mediante el aumento de su expresión en los mutantes para dicho factor con respecto al control.

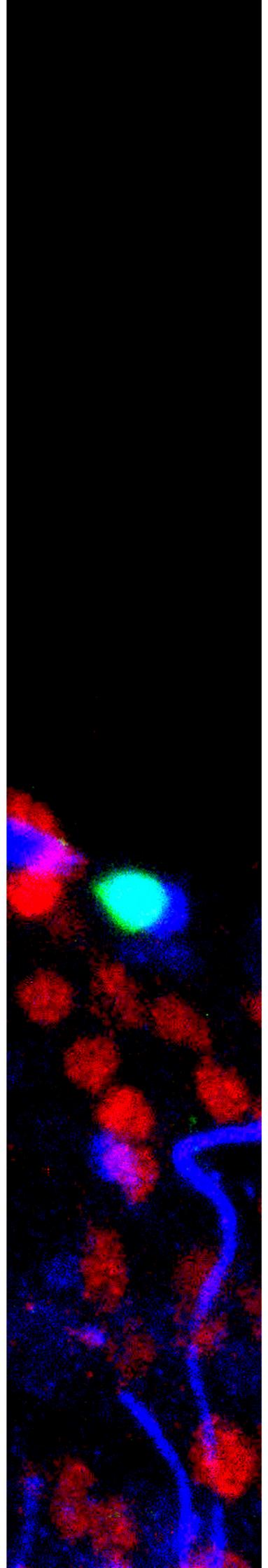
Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la expresión de ninguna de las helicasas analizadas (ver **Tabla 8**). En todos los casos, se analizó también el enriquecimiento de lecturas por exones pero, nuevamente, la presencia de otros genes o secuencias no codificantes no podía explicar la ausencia de diferencias entre los controles y los mutantes para el gen *Mcm5* (datos no mostrados).

**Tabla 8. Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial de la secuenciación de ARN para factores con función helicasa.** En la tabla se indican, para cada factor, los transcritos, las isoformas (I), los valores de RPKM de cada muestra (C: control; M: mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*), el enriquecimiento de lecturas (E) y el p-valor ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg (p-aj). Análisis realizado con DESeq2.

Transcrito	I	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
Mcm2	RA	3.47	3.09	5.33	7.71	0	9.91	0.33	0.66
Mcm3	RA	3.27	2.93	2.09	2.09	4.97	1.86	0.71	0.11
Mcm6	RA	6.04	6.16	12.51	13.20	14.25	8.32	0.15	0.89
Mcm7	RA	8.62	7.80	0	0.32	4.48	12.07	0.25	0.78
Dpa	RA	4.97	6.14	8.65	12.28	4.94	7.42	0.33	0.20
Arp5	RA	3.87	7.73	5.79	4.57	8.70	0	-0.07	0.75
Arp8	RA	4.01	4.06	5.28	10.54	62.15	26.94	0.19	0.36
CDC45L	RA	3.10	9.60	5.03	13.93	30.93	26.43	-0.01	0.98
Ino80	RA	0	3.68	4.39	10.29	0	7.21	-0.02	0.88
Mle	RA	22.62	24.84	21.04	0	24.57	24.91	-0.27	0.17
Mle	RA	24.91	19.14	7.95	26.65	9.22	31.82	0.35	0.19
Mle	RC	6.28	6.81	6.99	5.86	3.18	4.26	-0.03	0.87
Obe	RA	1.92	0.60	1.14	0.91	0.38	0	-0.08	0.69
Psf1	RA	2.17	0.54	2.69	8.02	1.37	1.32	0.69	0.32
Psf3	RA	37.42	27.53	3.96	18.44	19.63	18.37	-0.35	0.19
RecQ4	RA	0.76	0	50.91	7.78	6.92	30.81	0.06	0.79
Sld5	RA	6.88	8.36	36.82	40.29	17.45	0	-0.21	0.41

**Por tanto, los datos no mostraron diferencias de expresión significativas en las diferentes helicasas estudiadas entre los controles y los mutantes *Mcm5<sup>exc222</sup>* que pudieran sugerir un mecanismo compensatorio para la falta de función de dicho factor.**

# DISCUSIÓN





Gracias a este trabajo se ha conseguido avanzar en el conocimiento acerca de la compleja naturaleza de los mecanismos de adquisición de destinos neuropeptidérgicos. Para ello, se han utilizado las células de Orcokina A y las células FMRFamidérgicas Tv4 de la CNV de *D. melanogaster* como modelo. Los diferentes estudios realizados han combinado técnicas de genética clásica (mutaciones, expresión dirigida de genes, análisis epistáticos, experimentos de rescate) y de transcriptómica (secuenciación de ARN, expresión diferencial de genes, enriquecimiento de la ontología génica), lo cual ha permitido comprender de una forma más precisa la regulación subyacente a los mecanismos de especificación celular. El análisis de los interrogantes planteados desde distintos enfoques ha sido clave en este estudio para describir el papel de varios factores implicados en la especificación celular y desde diferentes aproximaciones. Este trabajo abre camino, por tanto, en la búsqueda y descripción de nuevos mecanismos de regulación implicados en la determinación de destinos celulares, los cuales pueden ser relevantes no solo en *D. melanogaster* sino también en vertebrados.

### **1. Orcokina A como modelo para el estudio de destinos neuropeptidérgicos**

Hoy en día sabemos que los mecanismos de diferenciación celular son altamente dependientes de la combinación de factores de transcripción jerárquicamente organizados. En el sistema nervioso, éstos son responsables de la correcta expresión de todos los marcadores fenotípicos que caracterizan una neurona, incluyendo la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos específicos, no sólo en *D. melanogaster* sino también en vertebrados. Sin embargo, este conocimiento no hubiera sido posible sin los estudios realizados en los últimos 50 años en la mosca de la fruta. Por tanto, este organismo modelo ha sido y continúa siendo fundamental en el estudio de los mecanismos de especificación neuronal.

En este contexto, el uso de sistemas neuropeptidérgicos en la CNV para el estudio de la adquisición de destinos terminales resulta un método claramente eficiente avalado por numerosos y relevantes trabajos que han permitido avanzar enormemente en este campo (Allan *et al.*, 2003; Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Allan *et*

*al.*, 2005; Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009; Benito-Sipos *et al.*, 2011; Gabilondo *et al.*, 2011; Gabilondo *et al.*, 2016; Stratmann *et al.*, 2016; Stratmann y Thor, 2017; Gabilondo *et al.*, 2018). En la presente tesis doctoral se describe por primera vez el sistema de la Orcokinina A como modelo para el estudio de destinos neuropeptidérgicos con el objetivo de generar novedosos conocimientos en este ámbito de estudio.

### **1.1. Las neuronas de Orcokinina A nacen del NB 5-3 en una ventana temporal mixta *cas-grh***

La caracterización del NB progenitor, así como de los factores temporales implicados en su división, resulta fundamental como primera aproximación al estudio de los mecanismos de especificación de una neurona.

Los resultados obtenidos en este trabajo a partir del conjunto de marcadores estudiados sugieren con alta probabilidad que las neuronas de Orcokinina A proceden del NB 5-3. No obstante, es necesario señalar que este estudio se realizó en embriones de estadio 18 h AEL, dado que la expresión de Orcokinina A no es detectable hasta este momento del desarrollo. Sin embargo, el mapa de marcadores disponible describe su expresión solamente hasta estadio 13. A partir de ese momento, algunos marcadores se pierden y otros se ganan, por lo que la fiabilidad de este método se reduce.

Por su parte, el linaje embrionario del NB 5-3 se encuentra descrito y parece estar compuesto por entre 9 y 15 interneuronas y una motoneurona por hemisegmento de la CNV (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999b). Esta motoneurona abandonaría la CNV a través de la rama A del nervio segmental (SNa) (Landgraf *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999b), la cual inerva los músculos externos de la pared abdominal larvaria. Además, varios trabajos describen cómo el nervio SNa contiene las proyecciones de una única motoneurona, denominada MNSNa-II, cuya proyección axonal alcanza los músculos 5 y 8 (Hoang y Chiba, 2001; Kim *et al.*, 2009). Los estudios realizados en esta tesis doctoral acerca de las proyecciones eferentes de las neuronas de Orcokinina A mostraron que éstas realizan sus sinapsis con células asociadas a los músculos externos 5 y 8 de la pared abdominal larvaria. Por tanto,

dado su NB de procedencia y su innervación eferente, la célula de Orcokina A podría tratarse de la única motoneurona descrita en el linaje del NB 5-3. Si bien los resultados obtenidos indican que las células de Orcokina A no podrían considerarse motoneuronas, el resultado parece consistente con lo descrito en los trabajos anteriormente mencionados, indicando que la célula MNSNa-II podría ser la neurona peptidérgica de Orcokina A derivada del NB 5-3.

Por otro lado, parece característico que las sinapsis de estas neuronas sean de tipo axosomático. En función de la morfología, la célula postsináptica parece tratarse de una neurona multidendrítica (comunicación personal de la Dra. Zlatic, 2018). Este tipo de neuronas reciben multitud de entradas sensoriales y envían posteriormente una respuesta al SNC. Debido a que la sinapsis se localiza en el soma, la función de la neurona orcokininérgica podría ser modular dicha respuesta. En este sentido, cabe destacar que la Orcokina ha sido descrita como un neuropéptido modulador en el SNC y SNP en crustáceos (Skiebe *et al.*, 2002; Li, L. *et al.*, 2002), especialmente de la frecuencia y la amplitud de las contracciones del intestino posterior (Stangier *et al.*, 1992). Estos datos parecen estar en concordancia, por tanto, con los obtenidos en este trabajo acerca de las conexiones eferentes de las neuronas orcokininérgicas tanto en larva como en adulto.

También resulta interesante destacar que parece observarse una tendencia en cuanto a la procedencia de grupos neuropeptidérgicos a partir de NBs de la fila 5. Este mismo razonamiento es aplicable a la especificación temporal, ya que las células neuropeptidérgicas tienden a generarse en las últimas divisiones de sus NBs de procedencia, es decir, en ventanas temporales tardías. Este es el caso de las neuronas de Capa, Ast-A y DH31 (NB 5-3, ventana *cas*) (Gabilondo *et al.*, 2018), Nplp1 (NB 5-6, ventana *cas*) (Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009), FMRFa (NB 5-6, ventana *cas-grh*) (Baumgardt *et al.*, 2007; Baumgardt *et al.*, 2009), Lk (NB 5-5, ventana *cas-grh*) (Benito-Sipos *et al.*, 2010) y, tras este estudio, Orcokina A (NB 5-3, ventana *cas-grh*). Dado que, a pesar de que cada célula neuropeptidérgica es diferente, todas ellas deben compartir ciertas características, parece razonable que provengan de NBs con una información genética más cercana.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre el papel de *Kr* en la especificación de las neuronas de Orcokina A podría recordar a la función subtemporal que ejerce este gen en las neuronas Tv1 del *cluster* de Ap (Stratmann *et al.*, 2016). Sin embargo, su relación con el destino Orcokina A no parece estar relacionado con un mecanismo de represión por parte de *Svp* o *Nab* como en las células Tv1, ya que no se ha detectado inmunomarcaje de los mismos en estas neuronas. No obstante, el estudio ha sido realizado en un estadio tardío del desarrollo, pudiendo ser esta la razón de no encontrar expresión de estos factores. Además, *Nab* parece jugar un papel fundamental en este sistema y su función en la especificación neuropeptidérgica ha sido ligada a *Cas* previamente en las células ABLKs (Benito-Sipos *et al.*, 2010). Por tanto, no podría descartarse que participara en las células de Orcokina A subdividiendo la ventana *cas* mediante la represión de *Kr* para permitir la progresión de la cascada de especificación. Dados estos resultados, sería muy interesante en un futuro poder estudiar en mayor profundidad la relación de los factores *Kr* y *Nab* en el contexto de la especificación de las neuronas de Orcokina A.

Los trabajos realizados en *D. melanogaster* sobre la actividad de los factores temporales suponen una auténtica punta de lanza en el conocimiento acerca de la generación de diversidad neural debido a que este tipo de mecanismos se encuentran altamente conservados y pueden ser trasladados a organismos más complejos. Estudios relativamente recientes han demostrado cómo el gen *Ikaros* (ortólogo de *hb*) juega un papel relevante en la especificación neuronal en la corteza cerebral de mamíferos (Alsö *et al.*, 2013) y, junto con *Casz1* (ortólogo de *cas*), determina la identidad neuronal de las células de la retina (Elliott *et al.*, 2008; Mattar *et al.*, 2015). Por otro lado, *Coup-tf1* y *Coup-tf2* (ortólogos de *svp*) actúan regulando la transición entre diferentes identidades temporales en el SNC de mamíferos (Naka *et al.*, 2008). Este tipo de trabajos demuestran que la especificación temporal es un mecanismo común y que, aunque puedan variar en función del tejido, es muy probable que los factores de transcripción implicados en la generación de diversidad neuronal en la mosca de la fruta cumplan una función similar en mamíferos.

## **1.2. Los genes homeóticos *Ubx* y *abdA* son fundamentales para la adquisición del destino Orcokinina A en los segmentos A1-A5**

Si bien la propia ubicación de los NBs en el hemineurómero dota a los mismos y a su progenie de una determinada información espacial, los genes Hox participan de forma fundamental en el desarrollo diferencial de cada uno de ellos a lo largo del eje AP.

Las neuronas de Orcokinina A se especifican en los segmentos abdominales A1-A5. En esta región se produce la confluencia entre los dominios de predominancia de los genes *Ubx* (T2-A7) y *abdA* (A2-A7) (Hirth *et al.*, 1998; Miguel-Aliaga y Thor, 2004), los cuales se han descrito en este trabajo como fundamentales y funcionalmente redundantes para la adquisición del destino orcokininérgico. Este mecanismo de acción de los genes Hox resulta prácticamente idéntico al descrito por el grupo del Dr. Díaz-Benjumea para las células leucokininérgicas ABLKs (Estacio-Gómez *et al.*, 2013). En este mismo trabajo se describe también cómo la falta de función de *Ubx* y *AbdA* durante la etapa larvaria provoca la pérdida de expresión de Lk en las células del organismo adulto, indicando que estos factores son necesarios para el mantenimiento de la expresión del neuropéptido. Teniendo en cuenta las similitudes entre ambos sistemas, sería muy interesante trasladar este mismo planteamiento a las neuronas de Orcokinina A.

Por otro lado, y en concordancia con la idea anterior, los resultados muestran una pérdida total de células orcokininérgicas en embriones deficientes para *Ubx* y *abdA*, así como la aparición de células ectópicas, tanto en los segmentos torácicos como en los abdominales A1-A5, en un contexto de sobreexpresión de estos genes por separado o en conjunto. Éstas podrían ser las células equivalentes a las neuronas de Orcokinina A en otros segmentos o sus células hermanas, que en condición salvaje morirían por apoptosis o se especificarían con un destino diferente. También podría tratarse de cualquier otra neurona del propio linaje del NB 5-3 que cambiara su destino terminal debido a la sobreexpresión de estos genes Hox.

En este sentido, cuando se sobreexpresa *AbdB* aparecen neuronas extra en los segmentos abdominales posteriores y desaparecen por completo con la falta de función de dicho gen. Este hecho parece indicar que *AbdB* reprime el destino

Orcokinina A, del mismo modo que lo hace también en las células ABLKs (Estacio-Gómez *et al.*, 2013). No obstante, el papel dual de *AbdB* en la regulación de la muerte celular está ampliamente descrito, actuando en algunos casos como activador de la misma y en otros como represor (Lohmann *et al.*, 2002; Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Gabilondo *et al.*, 2018). Por tanto, cabría la posibilidad de que este gen estuviera activando mecanismos de apoptosis en las células de los segmentos A6-A8. Sin embargo, los resultados obtenidos en embriones que presentaban inhibida la PCD revelan que *AbdB* no está activando la apoptosis de estas células y, por tanto, este no es un mecanismo necesario para el establecimiento del patrón de las células orcokininéricas.

Cabe señalar que la sobreexpresión de *Ubx* y *abdA* nunca consigue la aparición de células ectópicas de Orcokinina A en el territorio de predominancia de la isoforma *m* de *AbdB* (Sánchez-Herrero y Crosby, 1988). Este hecho hace patente el cumplimiento de la regla de prevalencia posterior, la cual dictamina que en caso de coexistir la expresión de dos genes homeóticos en la misma célula, la acción del gen posterior se impone sobre la del gen anterior (Hirth *et al.*, 1998). Sin embargo, esta regla parece no cumplirse en el territorio de la isoforma *r* de *AbdB* (Sánchez-Herrero y Crosby, 1988), donde la sobreexpresión de *abda* sí consigue generar la aparición de células ectópicas de Orcokinina A. Actualmente sólo se conocen tres excepciones a esta regla y, curiosamente, una de ellas, descrita por el grupo del Dr. Sánchez-Herrero, se basa en la interacción entre *abdA* y *AbdB m* en el disco genital (Capovilla y Botas, 1998; Foronda *et al.*, 2006; Gabilondo *et al.*, 2018).

Estos hechos refuerzan la idea de que la función de los genes Hox es altamente dependiente del contexto celular y que, además de ser necesarios en procesos generales del desarrollo, también son fundamentales para el establecimiento de características a nivel de células individuales.

### **1.3. La ruta de Notch juega un papel determinante en la especificación de las neuronas de Orcokinina A**

El equilibrio entre la proliferación celular y la muerte durante el desarrollo resulta fundamental para la correcta formación de los tejidos. Esta regulación tan precisa se lleva a cabo en diferentes etapas. Una de las más importantes es el control de la división de los NBs y las CMGs mediante la ruta de señalización de Notch.

La activación de mecanismos de PCD en células peptidérgicas es en ocasiones dependiente de la ruta de Notch, pudiendo tener lugar en las células hermanas *Notch On*, como en los sistemas de Crz (Karcavich y Doe, 2005) y Capa (Gabilondo *et al.*, 2018), o en hermanas *Notch Off*, como en el sistema de Lk (Benito-Sipos *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la neurona de Orcokinina A es la célula hermana con identidad *Notch Off* y la inactivación de esta ruta resulta imprescindible para su correcta especificación. Por tanto, su célula hermana debería adquirir una identidad *Notch On* que podría influir en su determinación como otro subtipo neuronal, como célula glial o determinar su muerte.

Según los resultados, la activación de la ruta de Notch en ambas hermanas impide la correcta especificación de las células de Orcokinina A. No obstante los estudios realizados en embriones que presentaban inhibida la PCD nunca dieron lugar a la aparición de dos células en los hemisegmentos A1-A5. Por tanto, no parece probable que el destino de la célula hermana pudiera ser la muerte y que la activación ectópica en las dos hermanas estuviera causando la desaparición de ambas por este motivo. Por otro lado, la inactivación de la ruta no consigue rescatar el fenotipo orcokininérgico en la célula con identidad salvaje *Notch On*. Este hecho podría deberse a que la mera inactivación de la ruta no fuera suficiente para iniciar la especificación orcokininérgica, a que ésta no se estuviera produciendo en el momento del desarrollo adecuado, o a que la supuesta célula hermana realmente nunca llegara a nacer.

A lo largo del desarrollo, los NBs cambian su modo de proliferación dejando de generar dos células hijas a partir de una CMG (división tipo I) para generar una única célula hija de forma directa (división tipo 0). Este cambio de tipo de división depende de la activación de Dacapo (Dap) y reguladores del ciclo celular a través de Cas y Grh, entre otros factores. Por tanto, las divisiones de tipo 0 son frecuentes para dar lugar

a las últimas células de cada linaje, como ocurre en el NB 5-3T, el NB 3-3A y el NB 7-3A (Baumgardt *et al.*, 2014; Bahrampour *et al.*, 2017). Este cambio es claramente dependientes de la información espacial y temporal (Baumgardt *et al.*, 2014; Monedero Cobeta *et al.*, 2017), así como de la señalización de Notch, pero aún se desconoce el mecanismo por el cual se produce su regulación (Ulvklo *et al.*, 2012; Bivik *et al.*, 2015; Bivik *et al.*, 2016). Por ello, y teniendo en cuenta los resultados anteriores, no se puede descartar que las células de Orcokina A puedan nacer a partir de una división de tipo 0.

En el futuro resultaría muy interesante estudiar con detalle cómo se producen las divisiones del NB 5-3. No obstante, es necesario encontrar previamente marcadores tempranos de dicho linaje para poder monitorizarlo.

#### **1.4. La señalización vía TGF- $\beta$ /BMP no es necesaria para la adquisición del destino neuropeptidérgico Orcokina A**

En el sistema FMRFamidérgico, el contacto con el tejido diana resulta fundamental para la correcta especificación de las neuronas. Acciones como la ablación del órgano neurohemal, la interrupción de la axonación o el bloqueo del transporte axonal produce la pérdida de expresión de FMRFa. La causa es la ausencia de señalización retrógrada a través de Gbb, ligando de la ruta de BMP que actúa como activador de la misma. Además, la activación ectópica de la ruta es capaz de generar células de FMRFa adicionales (Allan *et al.*, 2003). Esta ruta se encuentra también activa en otros sistemas neuropeptidérgicos como las células Va-Capa o las dMP2 (Allan *et al.*, 2003; Miguel-Aliaga y Thor, 2004).

No obstante, este mecanismo no se produce únicamente en *D. melanogaster*. En mamíferos, las neuronas sensoriales secretoras del Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) requieren que sus axones hayan establecido conexiones funcionales en la piel durante la embriogénesis tardía para comenzar a expresar dicho neuropéptido. Esta activación es dependiente de algunos factores de la familia TGF- $\beta$  como Activina, BMP-2, BMP-4 y BMP-6 (Ai *et al.*, 1999; Hall, A. K. *et al.*, 2001; Hall, Alison K. *et al.*, 2002).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, la señalización BMP no parece ser relevante en las células de Orcokina A para la expresión de dicho neuropéptido. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el destino terminal de una neurona no depende únicamente del neurotransmisor o neuropéptido que secrete, sino que entran en juego otros muchos factores como pueden ser la morfología, las conexiones o los receptores y canales iónicos que exprese en su membrana. Por tanto, los resultados sugieren que la señalización BMP tiene una funcionalidad diferente a la expresión del neuropéptido en las células de Orcokina A. Este hecho no resulta extraño, pues la comunicación bidireccional entre el soma celular y los terminales sinápticos es esencial para el correcto funcionamiento de procesos básicos neuronales, como son la formación y eliminación de sinapsis, la plasticidad o la supervivencia (Hirokawa *et al.*, 2010; Perlson *et al.*, 2010; Uesaka *et al.*, 2015). En este sentido, numerosas patologías neurales, incluyendo las enfermedades de Charcot-Marie-Tooth, Huntington, Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica, se relacionan con defectos en el transporte axonal (Saha *et al.*, 2004; BasuRay *et al.*, 2013; White, J. A. *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015). Incluso, existen evidencias de la implicación de la ruta de BMP en la respuesta glial y neuronal al daño en el SNC y la regeneración axonal (Zhong y Zou, 2014).

Por otra parte, un trabajo realizado por el grupo del Dr. Thor identificó diferentes grupos peptidérgicos en la CNV de *D. melanogaster* que presentan inmunomarcaje para pMad. Entre ellos se encuentra un grupo de cuatro neuronas abdominales denominadas Plc (del inglés *peptidergic lateral cluster*), que además se caracterizan por la ausencia de expresión de *ap* y *sqz* (Miguel-Aliaga *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo han revelado que las neuronas de Orcokina A forman parte de un grupo de cuatro células peptidérgicas y que, además, éstas no sufren alteraciones en mutantes de falta de función de *Sqz* ni presentan expresión del mismo (datos no mostrados). Por tanto, debido a su localización y características, los resultados sugieren que este conjunto de neuronas podría tratarse del grupo Plc.

## **2. La búsqueda dirigida de genes es una metodología eficiente para la descripción de nuevos factores implicados en la especificación neuronal**

La genética directa se ha utilizado clásicamente como el método más efectivo para la identificación de nuevos genes implicados en procesos biológicos. Sin embargo, las búsquedas genéticas o *screenings* suelen conllevar un proceso largo y tedioso. Actualmente, debido a la combinación de las poderosas herramientas genéticas con las que contamos y las bases de datos actualizadas de acceso libre, su eficiencia se multiplica ya que es posible realizar una búsqueda dirigida y cribar los candidatos, reduciendo así el número de genes estudiados sin obtener por ello peores resultados.

El método utilizado para seleccionar los genes de estudio en la búsqueda genética dirigida de este trabajo ha permitido prescindir de las etapas de mutagénesis y del posterior mapeo de mutaciones, reduciendo de esta forma el tiempo empleado para la obtención de candidatos. No obstante, es cierto que el propio cribado, es decir, la principal característica que hace a este sistema tan eficiente, podría hacer también que el resultado estuviera sesgado. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo avalan el método, ya que se han identificado 63 genes cuya mutación ocasiona una alteración significativa en el número de células de Orcokina A en la CNV de *D. melanogaster*. Para esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio pormenorizado del papel en la especificación neuronal de cuatro de ellos: *nab*, *tsh*, *vg* y *Mcm5*, pero este *targeted screening* sienta las bases para múltiples estudios posteriores.

### **2.1. Nab, Vg y Tsh: cómo construir una neurona leyendo los planos de un ala**

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el factor de transcripción Nab resulta necesario para la correcta especificación de las células de Orcokina A. Además, los experimentos de ganancia de función dan lugar a un incremento significativo en el número de células ectópicas de Orcokina A en la CNV. No obstante, existen muy pocos casos en los que un factor de transcripción actúe como único selector terminal de la identidad de un subgrupo neuronal. Un ejemplo de ello es el factor CHE-1 de *C. elegans*, cuya ausencia implica la pérdida total de identidad en

las neuronas gustativas ASE y cuya sobreexpresión consigue la determinación como tal de otros grupos neuronales (Etchberger *et al.*, 2007). Sin embargo, es mucho más habitual que los factores de transcripción actúen de forma combinatoria para definir destinos neuronales. Siguiendo con el modelo de *C. elegans*, las neuronas AIY requieren la actividad conjunta de los factores TTX-3 y CHE-10 para su correcta especificación. La falta de función de TTX-3 da lugar a la ausencia de neuronas AIY, mientras que su sobreexpresión sólo consigue la adquisición de este destino en otras neuronas positivas para CHE-10 (Altun-Gultekin *et al.*, 2001). Pensando en un contexto más complejo, como es la CNV de *D. melanogaster*, las neuronas que expresan Orcokina A de forma ectópica tras la sobreexpresión de *nab*, podrían ser aquéllas que compartieran parte de su mismo código terminal exceptuando este factor. En este sentido, sería interesante comprobar en un futuro si podría tratarse de las neuronas de Leucokina o CCAP puesto que forman parte del mismo grupo neuropeptidérgico.

Resulta interesante señalar que Nab es un cofactor que no presenta dominios de unión al ADN y, por tanto, requiere su unión a otros factores para modular su actividad (Svaren *et al.*, 1996). Hasta el momento, los únicos cofactores conocidos que median en su papel durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* son Sqz y Rotund (Rn) (Terriente Félix *et al.*, 2007). No obstante, mutantes para estos factores de transcripción no han revelado alteraciones en la especificación de las neuronas de Orcokina A (datos no mostrados), por lo que no parece que ninguno de los dos sea necesario para que Nab ejerza su papel en el establecimiento de este destino neuropeptidérgico.

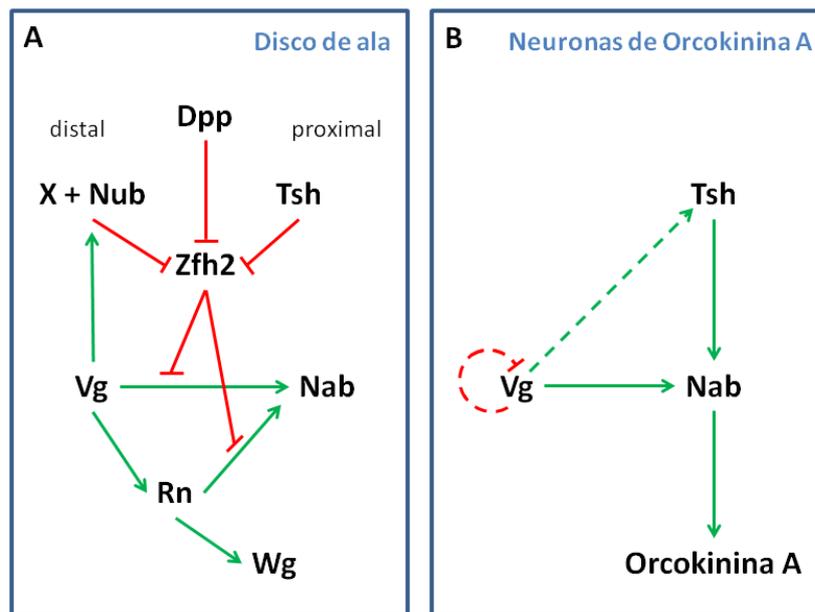
Por otro lado, Nab participa en el proceso de formación del ala a partir del disco imaginal. Se expresa fundamentalmente en la región distal y es dependiente de la regulación positiva por parte de Vg (Terriente Félix *et al.*, 2007). En este sentido, Vg es uno de los factores de transcripción más estudiados en el campo del desarrollo, precisamente por su papel en el disco de ala de *D. melanogaster* (Azpiazu y Morata, 2000). Fue identificado debido a que las mutaciones en este gen provocan graves alteraciones en la formación de la región distal del ala o, incluso, su desaparición completa. Además, constituye uno de los marcadores del NB 5-3, progenitor de las neuronas orcokininérgicas, y de su linaje (Doe, 1992). Los resultados de esta tesis doctoral sugieren que Vg, al igual que Nab, está implicado en la especificación de las

neuronas de Orcokina A. Los mutantes de falta de función para Vg sufren una pérdida significativa de la expresión de este neuropéptido, efecto que podría ser explicado a partir de la interacción descrita entre estos dos factores en el disco de ala. Es posible que la mutación del gen *vg* impida la correcta activación de Nab o que sus niveles de expresión sean menores, de forma que la correcta especificación de las neuronas de Orcokina A se viera comprometida. Esto explicaría también por qué la pérdida de neuronas no es completa, sino parcial. Sorprendentemente, la sobreexpresión de Vg ocasiona un fenotipo similar al del mutante, dando lugar también a una reducción en el número de células orcokininérgicas en la CNV. Esta situación podría ser explicada mediante la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa de la expresión de *vg* que, bien de forma directa o bien de forma indirecta, ocasionara que la sobreexpresión de este factor promoviera su propia inactivación.

Otro factor que parece ser necesario, aunque no suficiente, para la especificación de las neuronas de Orcokina A es Tsh. Según describe la bibliografía, la expresión de *tsh* es imprescindible para la correcta especificación de los segmentos del tórax y el abdomen del adulto (Fasano *et al.*, 1991; Gallet *et al.*, 1998), para la formación de las estructuras proximales de las patas (Wu, J. y Cohen, 2000b) y para la diferenciación de las células de la retina (Bessa y Casares, 2005). Sin embargo, quizá su papel más destacable para este trabajo es el de regulador de la formación del borde de ala durante el desarrollo. Como ya se ha mencionado anteriormente, Vg activa Nab en la región distal del ala, mientras que Rn cumple esta misma función en la región bisagra. Por su parte, Zfh2 impide la activación de Nab mediante su efecto doblemente represor sobre ambos factores. En este contexto, se ha descrito el papel de Tsh como represor de la expresión de *zfh2* en la zona proximal del ala. De esta forma, permite la activación de Nab y promueve la proliferación y diferenciación celular (Azpiazu y Morata, 2000; Terriente *et al.*, 2008).

Este trabajo pone de manifiesto la interacción entre los tres factores estudiados en esta tesis doctoral en un contexto de especificación celular, donde Tsh y Vg estarían jugando un papel activador de la expresión de Nab para permitir el correcto desarrollo del ala. El estudio realizado sobre la interacción de Nab, Vg y Tsh en la cascada de especificación terminal de las células de Orcokina A revela un resultado

similar. Según los datos obtenidos, Tsh y Vg parecen actuar en una etapa anterior a Nab, de forma que podrían estar participando en su activación de forma directa o indirecta. Por otro lado, también podrían sugerir la implicación de Vg a varios niveles dentro de la cascada, del mismo modo que ocurre en la formación del borde de ala (ver *Figura 45*).



**Figura 45. Modelos de regulación de los factores implicados en el desarrollo del disco de ala y las neuronas de Orcokina A.** (A) En el disco de ala, la expresión de *zfh2* es delimitada en la región proximal por la acción conjunta de Dpp y Tsh. Distalmente, *zfh2* es reprimido por Dpp, Nubbin (Nub) y un factor desconocido (X) activado por Vg. Por su parte, Zfh2 actúa reprimiendo la activación de *nab* por parte de Vg en la región distal y por parte de Rn en la bisagra. De esta forma, Zfh2 limita la expresión de *nab* a la región distal y permite la activación *wg*, promoviendo así la proliferación de las células de la zona bisagra (Terriente *et al.*, 2008). (B) La figura muestra un modelo hipotético construido a partir de los resultados obtenidos en este trabajo. En las neuronas de Orcokina A, Tsh y Vg activan la expresión de *nab*. Por su parte, Vg juega un doble papel activando a su vez a Tsh. Además, la expresión de *vg* se encuentra regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa. Finalmente, *nab* activa el destino Orcokina A en las neuronas. En ambos modelos las flechas verdes representan relaciones de activación mientras que las rojas muestran represión. Las líneas discontinuas se utilizan para describir relaciones que, aún siendo verosímiles con los resultados, no podrían ser confirmadas con los mismos.

Por todo ello, sería muy interesante estudiar el papel de otros factores implicados en el desarrollo de este apéndice, principalmente *zfh2*, en el contexto de la especificación de las neuronas de Orcokina A. En el trabajo del grupo del Dr. Díaz-Benjumea señalan también el papel de Wingless, Nubbin (Pdm) y Dpp en este circuito (Terriente *et al.*, 2008). Sin embargo, la falta de función de estos tres factores ha sido previamente estudiada en esta tesis sin ocasionar en ningún caso alteraciones en el número de células de Orcokina A.

Por tanto, si bien es cierto que aún se requiere un estudio en mayor profundidad para la identificación de otros factores que completen la cascada de especificación de las neuronas orcokininérgicas, ésta parece ser claramente similar a la que tiene lugar en el disco imaginal de ala para la formación del borde en la región bisagra. Este resultado pone de manifiesto la alta versatilidad de los factores de transcripción y de los mecanismos combinatorios para la generación de diversidad celular durante el desarrollo. Además, refuerza la idea de que su función es altamente dependiente del contexto celular, ya que los mismos factores, interactuando aparentemente del mismo modo, son capaces de originar estructuras tan diferentes como una neurona y un ala.

## **2.2. El papel de Mcm5 en la especificación de las neuronas Orcokina A**

Las proteínas de la familia *minichromosome maintenance* (MCM) participan en muchos procesos biológicos esenciales y, como consecuencia de ello, están altamente conservadas. Como su propio nombre indica, los primeros componentes de esta familia (Mcm2, Mcm3 y Mcm5) se identificaron por primera vez por su papel en el mantenimiento de plásmidos (minicromosomas circulares) en las células proliferativas de *Saccharomyces cerevisiae* (Maine *et al.*, 1984). Más tarde, Mcm4, Mcm6 y Mcm7 fueron incorporados al grupo y, para simplificar y estandarizar la nomenclatura, estos seis factores pasaron a denominarse en conjunto complejo Mcm2-7 (Chong *et al.*, 1996).

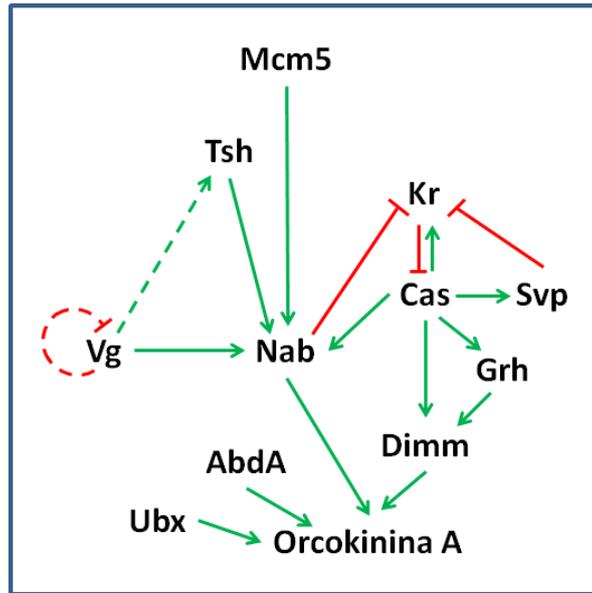
Este complejo se dispone como un anillo heterohexamérico y constituye el núcleo de la helicasa replicativa eucariótica, siendo un actor fundamental en los procesos de iniciación y elongación de la replicación del ADN (Ishimi, 1997; Labib *et al.*, 2000). No obstante, los miembros de esta familia son multifuncionales y también

desempeñan roles en la activación de la transcripción (Yankulov *et al.*, 1999; DaFonseca *et al.*, 2001), la cohesión (Ryu y Driever, 2006), la condensación cromosómica (Christensen y Tye, 2003) y la recombinación (Blanton *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2005; Lake *et al.*, 2007). Además, parece que no todas las proteínas del complejo son equivalentes, aunque el mecanismo subyacente a su comportamiento diferencial aún no se ha descrito con claridad. En este sentido, algunos estudios en levaduras y células humanas sugieren que Mcm7 podría tener funciones adicionales de forma individual como sensor del daño inducido por radiación UV (Tsao *et al.*, 2004; Cortez *et al.*, 2004).

Los resultados de esta tesis doctoral muestran que embriones mutantes para el gen *Mcm5* presentan alteraciones en la correcta especificación de las células de Orcokinina A y FMRFa. Este fenotipo es altamente específico puesto que afecta únicamente a estos dos sistemas neuropeptidérgicos. En un primer momento, la explicación más plausible parecía la existencia de un defecto en la división del NB o la CMG progenitora en estos mutantes debido al papel de helicasa que se le atribuye a este factor. Sin embargo, en este trabajo también se ha podido confirmar que la célula de FMRFa nace e incluso adquiere la expresión de algunos de sus selectores terminales, sin llegar a especificarse correctamente. Por tanto, estos resultados descartan que el fenotipo se deba a un error en la replicación del ADN y la división celular. A este respecto, otro de los factores identificados en el *screening* es *Dpa*, también llamado *Mcm4*, cuyo mutante sufre de nuevo la pérdida total de células de Orcokinina A. Según la bibliografía, este integrante del complejo parece ser imprescindible para la correcta replicación del ADN durante la mitosis (Feger *et al.*, 1995), por lo que en este caso parece más probable que el fenotipo pueda deberse a un defecto en la división de los progenitores. Por su parte, la falta de función de *Mcm3*, también componente del complejo y con el que *Mcm5* interacciona de manera directa, no produce ningún tipo de alteración en la especificación de los diferentes grupos neuropeptidérgicos analizados (datos no mostrados), lo que podría sugerir que *Mcm5* actuara de manera independiente y con una funcionalidad diferentes fuera del complejo helicasa. Por tanto, nos encontramos ante la primera evidencia de un posible papel de *Mcm5* en la especificación neuronal.

Atendiendo al análisis de expresión diferencial realizado a partir de los datos de secuenciación del ARN de embriones control y mutantes para el gen *Mcm5*, el enriquecimiento en lecturas del factor de transcripción Nab se encontraba disminuido en estos mutantes. Este resultado podría señalar que su mecanismo de acción podría estar relacionado con este factor, el cual juega un papel relevante en la especificación neuronal, tanto de las células de Orcokina A como del *cluster* de Ap (Baumgardt *et al.*, 2009; Benito-Sipos *et al.*, 2011). En este sentido, sería muy interesante realizar en el futuro un experimento de rescate introduciendo la expresión de Nab en mutantes para el gen *Mcm5* con el objetivo de intentar recuperar la expresión salvaje de Orcokina A.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en este trabajo acerca de la especificación de las neuronas de Orcokina A, así como los trabajos realizados previamente en disco de ala y en las células Tv4, se propone un modelo en el que Nab actuaría como principal activador de este destino neuropeptidérgico. Por su parte, la activación de *nab* sería dependiente de Tsh y Vg, los cuales podrían ejercer su acción de forma directa o indirecta. Concretamente, Vg podría estar actuando a diferentes niveles en la cascada de especificación y su expresión se regularía mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. Por otro lado, Nab sería necesario para la correcta especificación temporal de estas neuronas, ejerciendo su papel como factor subtemporal (quizá junto a *svp*) mediante la inhibición de *Kr*. De esta forma, se favorecería la progresión de la cascada en una ventana temporal *cas-grh*. Finalmente, la acción de los genes Hox *Ubx* y *abdA* resultaría esencial para la expresión de este neuropéptido, mientras que *Antp* y *AbdB* refinarían su patrón de expresión restringiéndolo a los segmentos abdominales A1-A5 (ver **Figura 46**).



**Figura 46. Modelo hipotético de especificación de las neuronas de Orcokinina A.** La figura representa un modelo de interacción entre los factores implicados en la especificación de las neuronas de Orcokinina A construido a partir de los resultados obtenidos en este trabajo. Esta figura describe el papel de los factores Mcm5, Tsh, Vg, Nab, Cas, Kr, Svp, Grh, Dimm, Ubx y AbdA en la cascada de especificación de estas células. Las flechas verdes representan relaciones de activación mientras que las rojas muestran represión. Las líneas discontinuas se utilizan para describir relaciones que, aún siendo verosímiles con los resultados, no podrían ser confirmadas con los mismos.

#### 2.4 Mcm5 y su relación con la ruta de TGF- $\beta$ /BMP en las células Tv4

El análisis de el transcriptoma es una poderosa herramienta para desentrañar la relación entre el genotipo y el fenotipo, facilitando una mayor comprensión de los mecanismos que controlan los diferentes procesos biológicos (Wang *et al.*, 2009). La aplicación de la secuenciación masiva al estudio de la transcriptómica ha revolucionado este campo, dado que reduce enormemente las desventajas de los métodos tradicionales (Marioni *et al.*, 2008). Además, permite realizar estudios de ontología génica sobre los resultados, facilitando el análisis de los datos y la identificación de procesos biológicos alterados. En este sentido, esta técnica adquiere una especial importancia para la asociación de determinados transcritos con su papel en procesos biológicos con los que nunca antes habían sido relacionados. Este ha sido el caso de Brr2, un componente de la subunidad U5 del espliceosoma, cuya función ha sido recientemente ligada al procesamiento del ARN para la adquisición del destino de las neuronas Tv4 (Monedero Cobeta *et al.*, 2018). Por ello, éste ha sido el método

aplicado en este trabajo para el estudio del papel de la helicasa Mcm5 en la especificación neuronal.

Tras la validación de los resultados, el análisis de expresión diferencial reveló 413 isoformas proteicas cuya expresión se encuentra alterada en embriones mutantes para el gen *Mcm5*. El análisis de la ontología génica de estos candidatos no reveló procesos biológicos relevantes significativamente representados. Esto podría deberse a que, al tener este factor una función tan genérica y estar implicado en funciones celulares muy básicas, su mutación provoca la alteración de numerosos procesos biológicos, de forma que ninguno aparece especialmente alterado en comparación con el resto.

A pesar de que los mutantes para el gen *Mcm5* presentaban alterada la expresión de *Dimm* en las células Tv4, el enriquecimiento de lecturas de los transcritos correspondientes no aparecía significativamente reducido. Esto podría deberse a que se trata de un efecto muy específico que afecta a muy pocas células del embrión, de hecho, la expresión de *Dimm* se mantiene en la célula Tv1. En cualquier caso, la ausencia de expresión de este factor no justificaría por sí misma la falta de FMRFa, como demuestran los experimentos realizados por el grupo del Dr. Allan, en los que se muestra cómo embriones mutantes para el gen *dimm* mantienen al 80% la expresión de FMRFa en las células Tv4 (Berndt, Anthony JE *et al.*, 2015).

Por otro lado, el único factor relacionado con la especificación de las neuronas Tv4 cuya expresión aparece significativamente reducida en mutantes *Mcm5* es Nab. Sin embargo, estudios previos realizados por el grupo del Dr. Thor demostraron que la pérdida de función de Nab no afecta a la expresión de FMRFa en las células Tv4 (Baumgardt *et al.*, 2009). Por tanto, este resultado tampoco es suficiente para justificar la ausencia del neuropéptido.

No obstante, el estudio del enriquecimiento de secuencias mostraba una tendencia a la reducción en la expresión de los factores implicados en axonación y en la ruta de TGF- $\beta$ /BMP, a pesar de no llegar a ser estadísticamente significativa en ningún caso. En este sentido, la activación de la ruta de TGF- $\beta$ /BMP se ha descrito como propiedad fundamental para el inicio y el mantenimiento de la expresión del neuropéptido FMRFa en las células Tv4. La sinapsis con el tejido diana y la

señalización retrógrada por parte del mismo mediante el ligando Gbb especifica el fenotipo peptidérgico de estas neuronas (Allan *et al.*, 2003; Marqués *et al.*, 2003b; Losada-Pérez *et al.*, 2013). Por tanto, una posible alteración de esta ruta sí podría explicar la pérdida de expresión de FMRFa en las neuronas Tv4 en mutantes *Mcm5*. Atendiendo a los resultados del análisis del enriquecimiento de lecturas, el principal candidato a sufrir alguna alteración en este contexto parece Tkv, dado que es el factor que presenta una expresión más reducida. No obstante, resultaría muy interesante poder corroborar esta hipótesis mediante experimentos de rescate en un futuro. La activación ectópica de los receptores Sax y Tkv en un fondo mutante para *Mcm5* permitiría confirmar esta hipótesis en caso de que se produjera el rescate del fenotipo salvaje. Por otro lado, el estudio del efecto de la introducción del ligando Gbb en dicho contexto mutante permitiría saber si la alteración del fenotipo es debida, en cambio, a un problema en la axonación o el establecimiento sináptico. Este último caso podría verse apoyado por la reducción de la expresión de factores como Fasciclina 2 (Fas2), Nerfina 1 (Nerf-1) y Dbx encontrada en este análisis del enriquecimiento de secuencias. Estos factores están directamente implicados en el proceso de axonación y guía de las proyecciones hacia el tejido diana. Además, el papel de Nerf-1 y Dbx ha sido recientemente descrito como fundamental para el establecimiento de conexiones en el grupo de Ap (Zarin *et al.*, 2014; Stratmann *et al.*, 2019).

Otro dato que podría apoyar que el papel de *Mcm5* en la especificación de las neuronas Tv4 está relacionado con la ruta de TGF- $\beta$ /BMP es que los mutantes de falta de función para dicho factor no presentan alteraciones en las células FMRFamidérgicas SE2. Estas neuronas no comparten el mismo código de especificación que las Tv4 y no requieren la señalización vía BMP para adquirir su destino terminal (Losada-Pérez *et al.*, 2010b). Además, consecuentemente, no expresan *Mcm5*.

Los miembros de la familia TGF- $\beta$ /BMP y sus receptores han estado también clásicamente involucrados en el control de varios aspectos diferentes del desarrollo y la función neuronal en vertebrados, incluyendo la morfogénesis, la diferenciación celular o la determinación de los linajes (Mehler *et al.*, 1997). Además, se han descrito para ellos papeles relacionados con procesos de especificación neuronal concretos. Es el caso de BMP9, implicado en la inducción y el mantenimiento del fenotipo

colinérgico en el SNC (Schnitzler *et al.*, 2010) o BMP2, BMP4 y BMP7, fundamentales para la adquisición del destino adrenérgico de las células de la cresta neural (Reissmann *et al.*, 1996; Varley y Maxwell, 1996). Los factores BMP también se han relacionado con la regulación de la expresión de neurotransmisores en otras regiones como la médula espinal, el cuerpo estriado o el mesencéfalo (Kalyani *et al.*, 1998; Reiriz *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 1999). En la mayoría de los casos, la activación de esta ruta no es imprescindible para la diferenciación de las neuronas. En cambio, resulta necesaria para la adquisición de sus características fenotípicas finales mediante la inducción de la expresión de genes específicos para cada función.

### **3. El papel de Mcm5 en el control de la expresión génica**

El control de la expresión génica a nivel transcripcional es dependiente de elementos reguladores que forman parte del ADN pero no del producto proteico final. Uno de ellos es la región promotora, que resulta esencial para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y el complejo Polimerasa II (Pol II), el cual inicia la transcripción en las circunstancias adecuadas. No obstante, estos factores están ampliamente expresados en todas las células, por lo que la región promotora tiene una implicación mayor en la regulación de los niveles de expresión que en la selectividad espacial y temporal de la expresión génica (Pfeiffer *et al.*, 2010). Los promotores necesitan información adicional para regular su actividad transcripcional y ésta es proporcionada por los denominados potenciadores o módulos reguladores en *cis* (CRMs) (Banerji *et al.*, 1981). La relevancia de estas regiones es tal que un estudio reciente realizado en embriones de *D. melanogaster* predice la existencia de entre 50.000 y 100.000 potenciadores activos durante el desarrollo (Kvon *et al.*, 2014). Pero, ¿cómo regulan los CRMs la activación de los promotores adecuados?

Los CRMs contienen múltiples elementos de ADN conocidos como sitios de unión para factores de transcripción (TFBSs) (Spitz y Furlong, 2012). Los denominados factores de transcripción pioneros (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) son capaces de unirse a estos TFBSs incluso cuando el ADN está condensado y, de esta forma, abrir la estructura de la cromatina para permitir la unión de los factores de transcripción

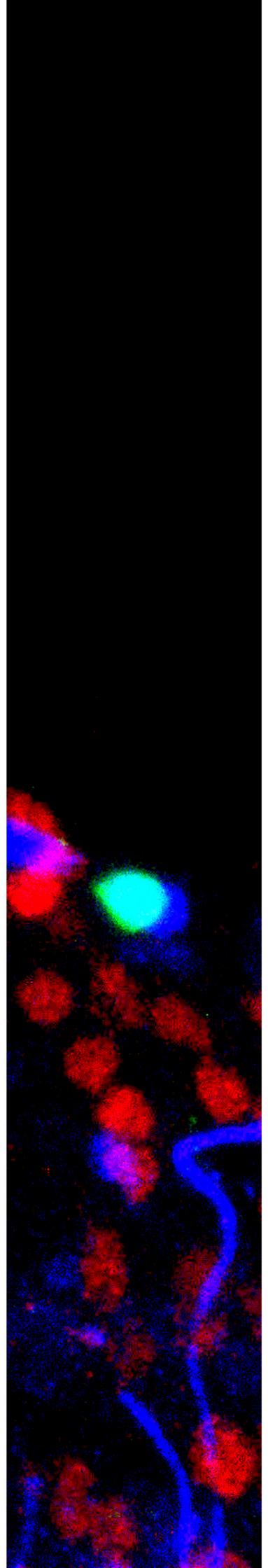
específicos de células o tejidos a sus motivos correspondientes (Zaret y Carroll, 2011; Soufi *et al.*, 2015). Posteriormente, se produce el reclutamiento del complejo Pol II y el complejo de pre- iniciación (CPI) para la expresión de los genes específicos necesarios (Calo y Wysocka, 2013; Berndt, Anthony J. E. *et al.*, 2015). La principal función del CPI es la iniciación de la replicación del ADN. Para ello, recluta factores de tipo CDC y al complejo Mcm2-7, cuya función helicasa permite la apertura de las hebras para su correcta replicación (Bloom y Cross, 2007).

En función de estos datos parece evidente que estas helicasas juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, no se ha encontrado en la bibliografía ningún caso en el que la actividad de alguna de las subunidades del complejo Mcm2-7 actúe de forma específica en el inicio de la replicación de genes concretos. Los seis componentes de complejo Mcm2-7 son homólogas únicamente en la región MCM consenso pero no en el resto de su estructura. Además, Mcm4, Mcm6 y Mcm7 pueden unirse y formar un complejo trimérico denominado *core*, al cual Mcm2 muestra una muy baja afinidad de ensamblaje. Por su parte, Mcm3 y Mcm5 también pueden formar dímeros y se les atribuyen capacidades reguladoras del *core* (Ishimi, 1997; Lee, J. K. y Hurwitz, 2001). Además, en la bibliografía se hace referencia a la denominada “paradoja de MCM” (Hyrien *et al.*, 2003) consistente en que el complejo Mcm2-7 se distribuye por toda la cromatina en lugar de permanecer concentrado en las regiones de replicación como otras helicasas (Romanowski *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 2002). Todo esto parece sugerir que cada una de ellas cumple una función específica y no necesariamente de tipo helicasa (Forsburg, 2004).

A pesar de los indicios mostrados en este trabajo, aún es necesario un estudio en mayor profundidad que permita establecer la relación del factor Mcm5 con la especificación neuronal. Sin embargo, esta tesis abre las puertas a la búsqueda de nuevas funciones para los factores de la familia MCM como reguladores específicos de la expresión génica, bien sea mediante su actividad helicasa o ejerciendo un papel totalmente diferente.



# CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS





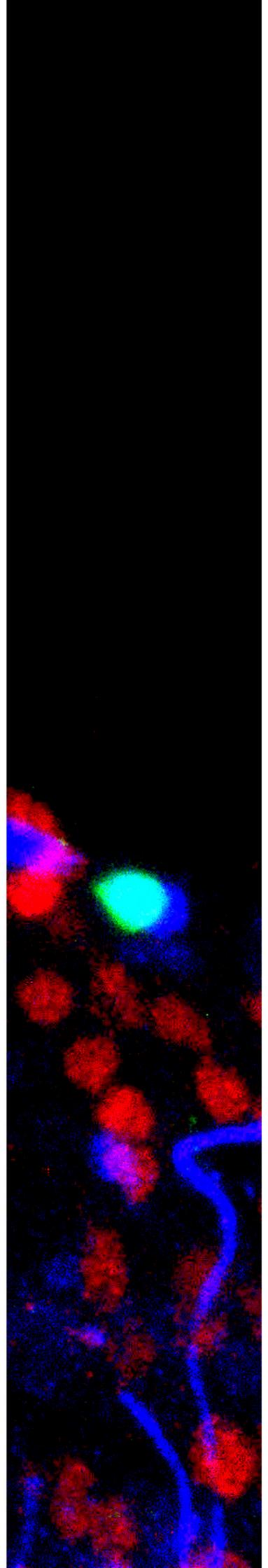
1. El neuropéptido Orcokinina A se expresa a partir del estadio embrionario 18 h AEL y hasta el estadio larva III en 10 células abdominales (A1-A5) de la CNV. El patrón de expresión se reduce durante la metamorfosis, pudiendo observar únicamente 4 células en el organismo adulto.
2. Las proyecciones eferentes de las células de Orcokinina A realizan sinapsis de tipo axosomático con células asociadas a los músculos 5 y 8 de la pared muscular de la larva de estadio III. En el adulto, estas neuronas inervan el tracto digestivo y la musculatura de la pared abdominal.
3. Las neuronas de Orcokinina A nacen a partir del NB 5-3.
4. Las neuronas de Orcokinina A nacen en una ventana temporal mixta *cas-grh*.
5. La ausencia del gen temporal Kr parece ser necesaria para la especificación del destino neuropeptidérgico Orcokinina A.
6. Los genes homeóticos *Ubx* y *abdA* son fundamentales para la adquisición del destino Orcokinina A en los segmentos abdominales A1-A5. La sobreexpresión de estos genes consigue activar la cascada de especificación de forma ectópica en otros segmentos de la CNV. El patrón de expresión se encuentra restringido por *Antp* en los segmentos torácicos T1-T3 y por *AbdB* en los segmentos abdominales posteriores A6-A8.
7. La inactivación de la ruta de Notch tiene un papel determinante en la especificación de las neuronas de Orcokinina A.
8. La muerte celular programada no es un mecanismo fundamental para el establecimiento del patrón de expresión del neuropéptido Orcokinina A.
9. A pesar de que las neuronas secretoras de Orcokinina A presentan la ruta de BMP activa, ésta no es requerida para la determinación de las mismas como células orcokininérgicas.

10. El factor de transcripción Nab resulta necesario pero no suficiente para la adquisición del destino terminal Orcokinina A.
11. El factor de transcripción Tsh resulta necesario pero no suficiente para la adquisición del destino terminal Orcokinina A.
12. El factor de transcripción Vg juega un papel secundario en la especificación de las neuronas orcokininérgicas, sin resultar crítico para la adquisición del dicho destino terminal.
13. Nab se localiza jerárquicamente por debajo de Tsh y Vg en la cascada de especificación terminal de las neuronas de Orcokinina A. Además, Tsh parece situarse por debajo de Vg.
14. La helicasa Mcm5 resulta necesaria pero no suficiente para la adquisición del destino terminal Orcokinina A.
15. La helicasa Mcm5 resulta necesaria pero no suficiente para la adquisición del destino terminal FMRFa en las células Tv4. Sin embargo, no es necesaria para la especificación de las células SE2.
16. La falta de función de Mcm5 disminuye la expresión del gen *nab*, pudiendo de este modo impedir la especificación de las neuronas de Orcokinina A y Tv4.
17. La falta de función de Mcm5 afecta a la señalización vía TGF- $\beta$ /BMP en las neuronas Tv4 a través de la disminución de la expresión de *tkv* causando su incorrecta especificación.

1. The neuropeptide Orcokinin A is expressed in 10 abdominal cells of the VNC (A1-A5 segments) from the stage 18 h AEL to third instar larva. The expression pattern is reduced during the metamorphosis, maintaining only 4 cells in the adult.
2. The projections of the Orcokinin A cells present axosomatic connections with the neurons associated to muscles 5 and 8 in the body wall of the third instar larva. In the adult, these neurons innervate the digestive tract and the abdominal body wall.
3. The Orcokinin A neurons arise from NB 5-3.
4. The Orcokinin A neurons emerge in a *cas-grh* mixed temporal window.
5. Absence of *Kr* expression seems to be necessary for the proper specification of the Orcokinin A cells.
6. The homeotic genes *Ubx* and *abdA* are essential for the specification of Orcokinin A cells in the abdominal segments A1-A5. Misexpression of these genes leads to ectopic Orcokinin A expression along the VNC. The expression pattern of this neuropeptide is restricted by *Antp* in the thoracic segments T1-T3 and by *AbdB* in the posterior abdominal segments A6-A8.
7. The proper specification of the Orcokinin A neurons requires the Notch pathway to be inactive.
8. Programmed cell death is not an essential mechanism for the establishment of the Orcokinin A expression pattern.
9. The TFG- $\beta$ /BMP pathway is not required for the specification of the Orcokinin A neurons even though it seems to be active in these cells.

10. The transcription factor Nab is necessary but not sufficient for the acquisition of the Orcokinin A cell fate.
11. The transcription factor Tsh is necessary but not sufficient for the acquisition of the Orcokinin A cell fate.
12. The transcription factor Vg plays a secondary role in the specification of the Orcokinin A neurons, being uncritical for the acquisition of this cell fate.
13. Nab functions downstream of Tsh and Vg in the terminal selector cascade of the Orcokinin A neurons. In addition, Tsh functions downstream of Vg.
14. The helicase Mcm5 is necessary but not sufficient for the acquisition of the Orcokinin A cell fate.
15. The helicase Mcm5 is necessary but not sufficient for the acquisition of the neuropeptidergic cell fate in the Tv4 neurons. However, it is not necessary for the specification of the SE2 cells.
16. The expression of *nab* is downregulated in a Mcm5 loss of function context, preventing the specification of the Orcokinin A and Tv4 neurons.
17. The TFG- $\beta$ /BMP pathway does not function properly in the Tv4 neurons when Mcm5 is absent due to the downregulation of *tkv* expression. This fact can be the reason of the incorrect specification of these cells.

# BIBLIOGRAFÍA





- Abbott, M.K. y Lengyel, J.A. (1991). Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective. *Genetics*, 129(3): 783-789.
- Aberle, H., Haghghi, A.P., Fetter, R.D., McCabe, B.D., Magalhães, T.R. y Goodman, C.S. (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, 33(4): 545-558.
- Ai, X., Cappuzzello, J. y Hall, A.K. (1999). Activin and bone morphogenetic proteins induce calcitonin gene-related peptide in embryonic sensory neurons in vitro. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14(6): 506-518. doi: 10.1006/mcne.1999.0798.
- Allan, D.W., St Pierre, S.E., Miguel-Aliaga, I. y Thor, S. (2003). Specification of neuropeptide cell identity by the integration of retrograde BMP signaling and a combinatorial transcription factor code. *Cell*, 113(1): 73-86.
- Allan, D.W., Park, D., St Pierre, S.E., Taghert, P.H. y Thor, S. (2005). Regulators acting in combinatorial codes also act independently in single differentiating neurons. *Neuron*, 45(5): 689-700. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.026.
- Allan, D.W. y Thor, S. (2015). Transcriptional selectors, masters, and combinatorial codes: regulatory principles of neural subtype specification. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 4(5): 505-528. doi: 10.1002/wdev.191.
- Alsö, J.M., Tarchini, B., Cayouette, M. y Livesey, F.J. (2013). Ikaros promotes early-born neuronal fates in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8): 716. doi: 10.1073/pnas.1215707110.
- Altun-Gultekin, Z., Andachi, Y., Tsalik, E.L., Pilgrim, D., Kohara, Y. y Hobert, O. (2001). A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23*, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C. elegans*. *Development*, 128(11): 1951-1969.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. y Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415): 770-776.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Azpiazu, N. y Morata, G. (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 127(12): 2685-2693.
- Bachmann, A., Kobler, O., Kittel, R.J., Wichmann, C., Sierralta, J., Sigrist, S.J., Gundelfinger, E.D., Knust, E. y Thomas, U. (2010). A perisynaptic ménage à trois between Dlg, DLin-7, and Metro controls proper organization of *Drosophila* synaptic junctions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(17): 5811-5824. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0778-10.2010.

Bahrampour, S., Gunnar, E., Jonsson, C., Ekman, H. y Thor, S. (2017). Neural Lineage Progression Controlled by a Temporal Proliferation Program. *Developmental Cell*, 43(3): 348.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2017.10.004.

Balasov, M., Huijbregts, R.P.H. y Chesnokov, I. (2007). Role of the Orc6 protein in origin recognition complex-dependent DNA binding and replication in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 27(8): 3143-3153. doi: 10.1128/MCB.02382-06.

Banerji, J., Rusconi, S. y Schaffner, W. (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27(2 Pt 1): 299-308.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P. y Liu, J. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Reports*, 4(1): 220-228. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.020.

BasuRay, S., Mukherjee, S., Romero, E.G., Seaman, M.N.J. y Wandinger-Ness, A. (2013). Rab7 mutants associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause delayed growth factor receptor transport and altered endosomal and nuclear signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(2): 1135-1149. doi: 10.1074/jbc.M112.417766.

Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 110(3): 791-804.

Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H. y Thor, S. (2007). Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. *PLoS Biology*, 5(2): e37. doi: 10.1371/journal.pbio.0050037.

Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Díaz-Benjumea, F.J. y Thor, S. (2009). Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops. *Cell*, 139(5): 969-982. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.032.

Baumgardt, M., Karlsson, D., Salmani, B.Y., Bivik, C., MacDonald, R.B., Gunnar, E. y Thor, S. (2014). Global programmed switch in neural daughter cell proliferation mode triggered by a temporal gene cascade. *Developmental Cell*, 30(2): 192-208. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.021.

Bello, B.C., Hirth, F. y Gould, A.P. (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron*, 37(2): 209-219.

Benito-Sipos, J., Estacio-Gómez, A., Moris-Sanz, M., Baumgardt, M., Thor, S. y Díaz-Benjumea, F.J. (2010). A genetic cascade involving klumpfuss, nab and castor specifies the abdominal leucokinergetic neurons in the *Drosophila* CNS. *Development (Cambridge, England)*, 137(19): 3327-3336. doi: 10.1242/dev.052233.

- Benito-Sipos, J., Ulvklo, C., Gabilondo, H., Baumgardt, M., Angel, A., Torroja, L. y Thor, S. (2011). Seven up acts as a temporal factor during two different stages of neuroblast 5-6 development. *Development (Cambridge, England)*, 138(24): 5311-5320. doi: 10.1242/dev.070946.
- Benito-Sipos, J. (2013). Development of the Drosophila Embryonic Ventral Nerve Cord: From Neuroectoderm to Unique Neurons and Glia. En: *Comprehensive developmental neuroscience*. Elsevier.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1): 289-300.
- Benveniste, R.J., Thor, S., Thomas, J.B. y Taghert, P.H. (1998). Cell type-specific regulation of the Drosophila FMRF-NH2 neuropeptide gene by Apterous, a LIM homeodomain transcription factor. *Development (Cambridge, England)*, 125(23): 4757-4765.
- Bernards, A. y Hariharan, I.K. (2001). Of flies and men--studying human disease in Drosophila. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(3): 274-278.
- Berndt, A.J.E., Tang, J.C.Y., Ridyard, M.S., Lian, T., Keatings, K. y Allan, D.W. (2015). Gene Regulatory Mechanisms Underlying the Spatial and Temporal Regulation of Target-Dependent Gene Expression in Drosophila Neurons. *PLoS Genetics*, 11(12): e1005754. doi: 10.1371/journal.pgen.1005754.
- Berndt, A.J., Tang, J.C., Ridyard, M.S., Lian, T., Keatings, K. y Allan, D.W. (2015). Gene regulatory mechanisms underlying the spatial and temporal regulation of target-dependent gene expression in Drosophila neurons. *PLoS Genetics*, 11(12): e1005754.
- Bessa, J. y Casares, F. (2005). Restricted teashirt expression confers eye-specific responsiveness to Dpp and Wg signals during eye specification in Drosophila. *Development (Cambridge, England)*, 132(22): 5011-5020. doi: 10.1242/dev.02082.
- Bier, E. (2005). Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Reviews. Genetics*, 6(1): 9-23. doi: 10.1038/nrg1503.
- Bivik, C., Bahrapour, S., Ulvklo, C., Nilsson, P., Angel, A., Fransson, F., Lundin, E., Renhorn, J. y Thor, S. (2015). Novel Genes Involved in Controlling Specification of Drosophila FMRFamide Neuropeptide Cells. *Genetics*, 200(4): 1229-1244. doi: 10.1534/genetics.115.178483.
- Bivik, C., MacDonald, R.B., Gunnar, E., Mazouni, K., Schweisguth, F. y Thor, S. (2016). Control of Neural Daughter Cell Proliferation by Multi-level Notch/Su(H)/E(spl)-HLH Signaling. *PLoS Genetics*, 12(4): e1005984. doi: 10.1371/journal.pgen.1005984.
- Blanton, H.L., Radford, S.J., McMahan, S., Kearney, H.M., Ibrahim, J.G. y Sekelsky, J. (2005). REC, Drosophila MCM8, drives formation of meiotic crossovers. *PLoS Genetics*, 1(3): e40. doi: 10.1371/journal.pgen.0010040.

Bloom, J. y Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2): 149-160. doi: 10.1038/nrm2105.

Blumröder, R., Glunz, A., Dunkelberger, B.S., Serway, C.N., Berger, C., Mentzel, B., Belle, J.S. y Raabe, T. (2016). Mcm3 replicative helicase mutation impairs neuroblast proliferation and memory in *Drosophila*. *Genes, Brain and Behavior*, 15(7): 647-659. doi: 10.1111/gbb.12304.

Börner, K., Jain, D., Vazquez-Pianzola, P., Vengadasalam, S., Steffen, N., Fyodorov, D.V., Tomancak, P., Konev, A., Suter, B. y Becker, P.B. (2016). A role for tuned levels of nucleosome remodeler subunit ACF1 during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology*, 411(2): 217-230. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.01.039.

Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q. y Technau, G.M. (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Developmental Biology*, 179(1): 41-64. doi: 10.1006/dbio.1996.0240.

Brand, A.H. y Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2): 401-415.

Brizuela, B.J. y Kennison, J.A. (1997). The *Drosophila* homeotic gene *moira* regulates expression of engrailed and HOM genes in imaginal tissues. *Mechanisms of Development*, 65(1-2): 209-220.

Brody, T. y Odenwald, W.F. (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Developmental Biology*, 226(1): 34-44. doi: 10.1006/dbio.2000.9829.

Bungart, D., Kegel, G., Burdzik, S. y Keller, R. (1995). Structure-activity relationships of the crustacean myotropic neuropeptide orcokinin. *Peptides*, 16(2): 199-204.

Calo, E. y Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why?. *Molecular Cell*, 49(5): 825-837. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.038.

Campos-Ortega, J.A. y Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2 ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Canudas, S., Pérez, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Singh, N., Hanes, S.D., Azorín, F. y Espinás, M.L. (2005). dSAP18 and dHDAC1 contribute to the functional regulation of the *Drosophila* Fab-7 element. *Nucleic Acids Research*, 33(15): 4857-4864. doi: 10.1093/nar/gki776.

Capovilla, M. y Botas, J. (1998). Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. *Development (Cambridge, England)*, 125(24): 4949-4957.

Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M. y Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biology*, 8(1): R3. doi: 10.1186/gb-2007-8-1-r3.

Castelli-Gair Hombria, J. y Bovolenta, P. (2016). *Organogenetic Gene Networks: Genetic Control of Organ Formation*. HOMBRÍA, J.C. and BOVOLENTA, P. (Eds.), Springer International Publishing, .

Cau, E. y Blader, P. (2009). Notch activity in the nervous system: to switch or not switch?. *Neural Development*, 4: 36. doi: 10.1186/1749-8104-4-36.

Celniker, S.E. y Rubin, G.M. (2003). The Drosophila melanogaster genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4: 89-117. doi: 10.1146/annurev.genom.4.070802.110323.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M. y Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, 27(3): 275-280. doi: 10.1038/nbt.1529.

Chen, C., Luhur, A. y Sokol, N. (2015). Lin-28 promotes symmetric stem cell division and drives adaptive growth in the adult Drosophila intestine. *Development (Cambridge, England)*, 142(20): 3478-3487. doi: 10.1242/dev.127951.

Chen, J., Choi, M.S., Mizoguchi, A., Veenstra, J.A., Kang, K., Kim, Y. y Kwon, J.Y. (2015). Isoform-specific expression of the neuropeptide orckinin in Drosophila melanogaster. *Peptides*, 68: 50-57. doi: 10.1016/j.peptides.2015.01.002.

Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. y Abrams, J.M. (1996). grim, a novel cell death gene in Drosophila. *Genes & Development*, 10(14): 1773-1782.

Chen, Y., Veenstra, J.A., Davis, N.T. y Hagedorn, H.H. (1994). A comparative study of leucokinin-immunoreactive neurons in insects. *Cell and Tissue Research*, 276(1): 69-83.

Chiang, C., Young, K.E. y Beachy, P.A. (1995). Control of Drosophila tracheal branching by the novel homeodomain gene unplugged, a regulatory target for genes of the bithorax complex. *Development (Cambridge, England)*, 121(11): 3901-3912.

Chong, J.P., Thömmes, P. y Blow, J.J. (1996). The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(3): 102-106.

Christensen, T.W. y Tye, B.K. (2003). Drosophila Mcm10 Interacts with Members of the Prereplication Complex and Is Required for Proper Chromosome Condensation. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6): 2206-2215. doi: 10.1091/mbc.E02-11-0706.

Chu-LaGraff, Q. y Doe, C.Q. (1993). Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the Drosophila CNS. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5128): 1594-1597.

Chuye, L.B., Dimitri, A., Desai, A., Handelmann, C., Bae, Y., Johari, P., Jornet, J.M., Klejbor, I., Stachowiak, M.K. y Stachowiak, E.K. (2018). Brain Organoids: Expanding Our Understanding of Human Development and Disease. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 66: 183-206. doi: 10.1007/978-3-319-93485-3\_8.

Cleary, M.D. y Doe, C.Q. (2006). Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window. *Genes & Development*, 20(4): 429-434. doi: 10.1101/gad.1382206.

Clements, M., Duncan, D. y Milbrandt, J. (2003). Drosophila NAB (dNAB) is an orphan transcriptional co-repressor required for correct CNS and eye development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 226(1): 67-81. doi: 10.1002/dvdy.10209.

Cortez, D., Glick, G. y Elledge, S.J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27): 10078-10083. doi: 10.1073/pnas.0403410101.

Costa-Silva, J., Domingues, D. y Lopes, F.M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PloS One*, 12(12): e0190152. doi: 10.1371/journal.pone.0190152.

DaFonseca, C.J., Shu, F. y Zhang, J.J. (2001). Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6): 3034-3039. doi: 10.1073/pnas.061487598.

Devineni, A.V. y Heberlein, U. (2013). The evolution of *Drosophila melanogaster* as a model for alcohol research. *Annual Review of Neuroscience*, 36: 121-138. doi: 10.1146/annurev-neuro-062012-170256.

Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development (Cambridge, England)*, 116(4): 855-863.

Doe, C.Q. y Bowerman, B. (2001). Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1): 68-75.

Doiguchi, M., Nakagawa, T., Imamura, Y., Yoneda, M., Higashi, M., Kubota, K., Yamashita, S., Asahara, H., Iida, M., Fujii, S., Ikura, T., Liu, Z., Nandu, T., Kraus, W.L., Ueda, H. y Ito, T. (2016). SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. *Scientific Reports*, 6: 20179. doi: 10.1038/srep20179.

Dorfman, R. y Shilo, B.Z. (2001). Biphasic activation of the BMP pathway patterns the *Drosophila* embryonic dorsal region. *Development (Cambridge, England)*, 128(6): 965-972.

- Driever, W. y Nüsslein-Volhard, C. (1988). A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell*, 54(1): 83-93.
- Dushay, M.S., Konopka, R.J., Orr, D., Greenacre, M.L., Kyriacou, C.P., Rosbash, M. y Hall, J.C. (1990). Phenotypic and genetic analysis of Clock, a new circadian rhythm mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 125(3): 557-578.
- Edlund, T. y Jessell, T.M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell*, 96(2): 211-224.
- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., Prokhorova, T.A. y Walter, J.C. (2002). MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(36): 33049-33057. doi: 10.1074/jbc.M204438200.
- Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V. y Cayouette, M. (2008). Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron*, 60(1): 26-39. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.008.
- Escudero, L.M., Caminero, E., Schulze, K.L., Bellen, H.J. y Modolell, J. (2005). Charlatan, a Zn-finger transcription factor, establishes a novel level of regulation of the proneural achaete/scute genes of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 132(6): 1211-1222. doi: 10.1242/dev.01691.
- Estacio-Gómez, A., Moris-Sanz, M., Schäfer, A., Perea, D., Herrero, P. y Díaz-Benjumea, F.J. (2013). Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergic neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Development (Cambridge, England)*, 140(10): 2139-2148. doi: 10.1242/dev.090423.
- Estacio-Gómez, A. y Díaz-Benjumea, F.J. (2014). Roles of Hox genes in the patterning of the central nervous system of *Drosophila*. *Fly*, 8(1): 26-32. doi: 10.4161/fly.27424.
- Etchberger, J.F., Lorch, A., Sleumer, M.C., Zapf, R., Jones, S.J., Marra, M.A., Holt, R.A., Moerman, D.G. y Hobert, O. (2007). The molecular signature and cis-regulatory architecture of a *C. elegans* gustatory neuron. *Genes & Development*, 21(13): 1653-1674. doi: 10.1101/gad.1560107.
- Fagan, J.K., Dollar, G., Lu, Q., Barnett, A., Pechuan Jorge, J., Schlosser, A., Pflieger, C., Adler, P. y Jenny, A. (2014). Combover/CG10732, a novel PCP effector for *Drosophila* wing hair formation. *PloS One*, 9(9): e107311. doi: 10.1371/journal.pone.0107311.
- Fasano, L., Röder, L., Coré, N., Alexandre, E., Vola, C., Jacq, B. y Kerridge, S. (1991). The gene teashirt is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell*, 64(1): 63-79.
- Feger, G., Vaessin, H., Su, T.T., Wolff, E., Jan, L.Y. y Jan, Y.N. (1995). dpa, a member of the MCM family, is required for mitotic DNA replication but not endoreplication in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 14(21): 5387-5398.

Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L. y Sánchez-Herrero, E. (2006). Requirement of Abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule. *Development (Cambridge, England)*, 133(1): 117-127. doi: 10.1242/dev.02173.

Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(1): 109-131. doi: 10.1128/mnbr.68.1.109-131.2004.

Gabilondo, H., Losada-Pérez, M., del Saz, D., Molina, I., León, Y., Canal, I., Torroja, L. y Benito-Sipos, J. (2011). A targeted genetic screen identifies crucial players in the specification of the *Drosophila* abdominal Capaergic neurons. *Mechanisms of Development*, 128(3-4): 208-221. doi: 10.1016/j.mod.2011.01.002.

Gabilondo, H., Stratmann, J., Rubio-Ferrera, I., Millán-Crespo, I., Contero-García, P., Bahrampour, S., Thor, S. y Benito-Sipos, J. (2016). Neuronal Cell Fate Specification by the Convergence of Different Spatiotemporal Cues on a Common Terminal Selector Cascade. *PLoS Biology*, 14(5): e1002450. doi: 10.1371/journal.pbio.1002450.

Gabilondo, H., Rubio-Ferrera, I., Losada-Pérez, M., Del Saz, D., León, Y., Molina, I., Torroja, L., W Allan, D. y Benito-Sipos, J. (2018). Segmentally homologous neurons acquire two different terminal neuropeptidergic fates in the *Drosophila* nervous system. *PloS One*, 13(4): e0194281. doi: 10.1371/journal.pone.0194281.

Gallet, A., Erkner, A., Charroux, B., Fasano, L. y Kerridge, S. (1998). Trunk-specific modulation of wingless signalling in *Drosophila* by teashirt binding to armadillo. *Current Biology: CB*, 8(16): 893-902.

Gaul, U. y Jäckle, H. (1987). Pole region-dependent repression of the *Drosophila* gap gene Krüppel by maternal gene products. *Cell*, 51(4): 549-555.

Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S. y Mandal, L. (2015). Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Developmental Cell*, 33(4): 478-488. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.014.

Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates, .

Graf, E.R., Daniels, R.W., Burgess, R.W., Schwarz, T.L. y DiAntonio, A. (2009). Rab3 dynamically controls protein composition at active zones. *Neuron*, 64(5): 663-677. doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.002.

Graham, S., Broderick, K.E., Davies, S.A., Veenstra, J.A., Dow, J.A.T., Costes, L., Cazenave, W., Kean, L. y Pollock, V.P. (2002). Two nitridergic peptides are encoded by the gene capability in *Drosophila melanogaster*. *The American Journal of Physiology*, 282(5): R1297.

Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes & Development*, 12(12): 1751-1762.

Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K. y Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes & Development*, 9(14): 1694-1708.

Griffiths, R.C., Benito-Sipos, J., Fenton, J.C., Torroja, L. y Hidalgo, A. (2007). Two distinct mechanisms segregate Prospero in the longitudinal glia underlying the timing of interactions with axons. *Neuron Glia Biology*, 3(1): 75-88. doi: 10.1017/S1740925X07000610.

Grimm, C., Matos, R., Ly-Hartig, N., Steuerwald, U., Lindner, D., Rybin, V., Müller, J. y Müller, C.W. (2009). Molecular recognition of histone lysine methylation by the Polycomb group repressor dSfmbt. *The EMBO Journal*, 28(13): 1965-1977. doi: 10.1038/emboj.2009.147.

Grosskortenhaus, R., Pearson, B.J., Marusich, A. y Doe, C.Q. (2005). Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Developmental Cell*, 8(2): 193-202. doi: 10.1016/j.devcel.2004.11.019.

Gunnar, E., Bivik, C., Starkenberg, A. y Thor, S. (2016). sequoia controls the type I>0 daughter proliferation switch in the developing *Drosophila* nervous system. *Development (Cambridge, England)*, 143(20): 3774-3784. doi: 10.1242/dev.139998.

Hall, A.K., Dinsio, K.J. y Cappuzzello, J. (2001). Skin cell induction of calcitonin gene-related peptide in embryonic sensory neurons in vitro involves activin. *Developmental Biology*, 229(2): 263-270. doi: 10.1006/dbio.2000.9966.

Hall, A.K., Burke, R.M., Anand, M. y Dinsio, K.J. (2002). Activin and bone morphogenetic proteins are present in perinatal sensory neuron target tissues that induce neuropeptides. *Journal of Neurobiology*, 52(1): 52-60. doi: 10.1002/neu.10068.

Hamanaka, Y., Park, D., Yin, P., Annangudi, S.P., Edwards, T.N., Sweedler, J., Meinertzhagen, I.A. y Taghert, P.H. (2010). Transcriptional orchestration of the regulated secretory pathway in neurons by the bHLH protein DIMM. *Current Biology: CB*, 20(1): 9-18. doi: 10.1016/j.cub.2009.11.065.

Hammonds, A.S., Bristow, C.A., Fisher, W.W., Weiszmann, R., Wu, S., Hartenstein, V., Kellis, M., Yu, B., Frise, E. y Celniker, S.E. (2013). Spatial expression of transcription factors in *Drosophila* embryonic organ development. *Genome Biology*, 14(12): R140. doi: 10.1186/gb-2013-14-12-r140.

Hattori, A., Katayama, M., Iwasaki, S., Ishii, K., Tsujimoto, M. y Kohno, M. (1999). Bone morphogenetic protein-2 promotes survival and differentiation of striatal GABAergic neurons in the absence of glial cell proliferation. *Journal of Neurochemistry*, 72(6): 2264-2271.

Hewes, R.S., Snowdeal, E.C., Saitoe, M. y Taghert, P.H. (1998). Functional redundancy of FMRamide-related peptides at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(18): 7138-7151.

Hewes, R.S., Park, D., Gauthier, S.A., Schaefer, A.M. y Taghert, P.H. (2003). The bHLH protein Dimmed controls neuroendocrine cell differentiation in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 130(9): 1771-1781.

Hinrichs, A.S., Raney, B.J., Speir, M.L., Rhead, B., Casper, J., Karolchik, D., Kuhn, R.M., Rosenbloom, K.R., Zweig, A.S., Haussler, D. y Kent, W.J. (2016). UCSC Data Integrator and Variant Annotation Integrator. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(9): 1430-1432. doi: 10.1093/bioinformatics/btv766.

Hirokawa, N., Niwa, S. y Tanaka, Y. (2010). Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron*, 68(4): 610-638. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.039.

Hirth, F., Hartmann, B. y Reichert, H. (1998). Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 125(9): 1579-1589.

Hoang, B. y Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Developmental Biology*, 229(1): 55-70. doi: 10.1006/dbio.2000.9983.

Hugosson, F., Sjögren, C., Birve, A., Hedlund, L., Eriksson, T. y Palmer, R.H. (2014). The *Drosophila* midkine/pleiotrophin homologues Miple1 and Miple2 affect adult lifespan but are dispensable for alk signaling during embryonic gut formation. *PLoS One*, 9(11): e112250. doi: 10.1371/journal.pone.0112250.

Hull-Thompson, J., Muffat, J., Sanchez, D., Walker, D.W., Benzer, S., Ganfornina, M.D. y Jasper, H. (2009). Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS Genetics*, 5(4): e1000460. doi: 10.1371/journal.pgen.1000460.

Hummel, T., Schimmelpfeng, K. y Klämbt, C. (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 126(4): 771-779.

Huybrechts, J., Nusbaum, M.P., Bosch, L.V., Baggerman, G., De Loof, A. y Schoofs, L. (2003). Neuropeptidomic analysis of the brain and thoracic ganglion from the Jonah crab, *Cancer borealis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(3): 535-544.

Hyrien, O., Marheineke, K. y Goldar, A. (2003). Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(2): 116-125. doi: 10.1002/bies.10208.

Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39): 24508-24513. doi: 10.1074/jbc.272.39.24508.

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. y Doe, C.Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell*, 106(4): 511-521.

- Izumi, Y., Motoishi, M., Furuse, K. y Furuse, M. (2016). A tetraspanin regulates septate junction formation in *Drosophila* midgut. *Journal of Cell Science*, 129(6): 1155-1164. doi: 10.1242/jcs.180448.
- Jarman, A. (2013). Neurogenesis in *Drosophila*. En: *eLS*. American Cancer Society.
- Jaźwińska, A., Rushlow, C. y Roth, S. (1999). The role of brinker in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos. *Development (Cambridge, England)*, 126(15): 3323-3334.
- Jiang, L. y Crews, S.T. (2006). Dysfusion transcriptional control of *Drosophila* tracheal migration, adhesion, and fusion. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17): 6547-6556. doi: 10.1128/MCB.00284-06.
- Kalyani, A.J., Piper, D., Mujtaba, T., Lucero, M.T. y Rao, M.S. (1998). Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(19): 7856-7868.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S.J. y Odenwald, W.F. (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes & Development*, 12(2): 246-260.
- Kamyshev, N.G., Iliadi, K.G., Bragina, J.V., Kamysheva, E.A., Tokmatcheva, E.V., Preat, T. y Savvateeva-Popova, E.V. (2002). Novel memory mutants in *Drosophila*: behavioral characteristics of the mutant nemyP153. *BMC Neuroscience*, 3: 9.
- Kanai, M.I., Okabe, M. y Hiromi, Y. (2005). seven-up Controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. *Developmental Cell*, 8(2): 203-213. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.014.
- Karcavich, R. y Doe, C.Q. (2005). *Drosophila* neuroblast 7-3 cell lineage: a model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity. *The Journal of Comparative Neurology*, 481(3): 240-251. doi: 10.1002/cne.20371.
- Karlsson, D., Baumgardt, M. y Thor, S. (2010). Segment-specific neuronal subtype specification by the integration of anteroposterior and temporal cues. *PLoS Biology*, 8(5): e1000368. doi: 10.1371/journal.pbio.1000368.
- Kim, M.D., Wen, Y. y Jan, Y. (2009). Patterning and organization of motor neuron dendrites in the *Drosophila* larva. *Developmental Biology*, 336(2): 213-221. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.041.
- Klein, T., Couso, J.P. y Martinez Arias, A. (1998). Wing development and specification of dorsal cell fates in the absence of apterous in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 8(7): 417-420.
- Kohwi, M. y Doe, C.Q. (2013). Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(12): 823-838.

- Kong, Y., Jiang, B. y Luo, X. (2018). Gut microbiota influences Alzheimer's disease pathogenesis by regulating acetate in *Drosophila* model. *Future Microbiology*, 13: 1117-1128. doi: 10.2217/fmb-2018-0185.
- Koo, S.J. y Pfaff, S.L. (2002). Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron*, 35(5): 823-826.
- Kotadia, S. (2010). Blastoderm Formation and Cellularisation in *Drosophila melanogaster*. En: *eLS*. American Cancer Society.
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78(2): 191-201.
- Kuzin, A., Brody, T., Moore, A.W. y Odenwald, W.F. (2005). Nerfin-1 is required for early axon guidance decisions in the developing *Drosophila* CNS. *Developmental Biology*, 277(2): 347-365. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.09.027.
- Kvon, E.Z., Kazmar, T., Stampfel, G., Yáñez-Cuna, J.O., Pagani, M., Schernhuber, K., Dickson, B.J. y Stark, A. (2014). Genome-scale functional characterization of *Drosophila* developmental enhancers in vivo. *Nature*, 512(7512): 91-95. doi: 10.1038/nature13395.
- Labib, K., Tercero, J.A. y Diffley, J.F. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science*, 288(5471): 1643-1647.
- Lacin, H. y Truman, J.W. (2016). Lineage mapping identifies molecular and architectural similarities between the larval and adult *Drosophila* central nervous system. *eLife*, 5: e13399. doi: 10.7554/eLife.13399.
- Lai, S. y Doe, C.Q. (2014). Transient nuclear Prospero induces neural progenitor quiescence. *eLife*, 3 doi: 10.7554/eLife.03363.
- Lake, C.M., Teeter, K., Page, S.L., Nielsen, R. y Hawley, R.S. (2007). A genetic analysis of the *Drosophila* *mcm5* gene defines a domain specifically required for meiotic recombination. *Genetics*, 176(4): 2151-2163. doi: 10.1534/genetics.107.073551.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G.M. y Bate, M. (1997). The Origin, Location, and Projections of the Embryonic Abdominal Motorneurons of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 17(24): 9642-9655.
- Landskron, L., Steinmann, V., Bonnay, F., Burkard, T.R., Steinmann, J., Reichardt, I., Harzer, H., Laurenson, A., Reichert, H. y Knoblich, J.A. (2018). The asymmetrically segregating lncRNA cherub is required for transforming stem cells into malignant cells. *eLife*, 7 doi: 10.7554/eLife.31347.
- Lawrence, P.A. (1992). *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Lee, H.B., Sebo, Z.L., Peng, Y. y Guo, Y. (2015). An optimized TALEN application for mutagenesis and screening in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Logistics*, 5(1): e1023423. doi: 10.1080/21592799.2015.1023423.
- Lee, J.K. y Hurwitz, J. (2001). Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1): 54-59. doi: 10.1073/pnas.98.1.54.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688): 565-570.
- Li, L., Pulver, S.R., Kelley, W.P., Thirumalai, V., Sweedler, J.V. y Marder, E. (2002). Orcokinin peptides in developing and adult crustacean stomatogastric nervous systems and pericardial organs. *The Journal of Comparative Neurology*, 444(3): 227-244. doi: 10.1002/cne.10139.
- Li, X., Chen, Z. y Desplan, C. (2013). Temporal patterning of neural progenitors in *Drosophila*. *Current Topics in Developmental Biology*, 105: 69-96. doi: 10.1016/B978-0-12-396968-2.00003-8.
- Lily Yeh Jan y Yuh Nung Jan (1982). Antibodies to Horseradish Peroxidase as Specific Neuronal Markers in *Drosophila* and in Grasshopper Embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(8): 2700-2704. doi: 10.1073/pnas.79.8.2700.
- Lindsley, D. y Zimm, G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. 1 ed. Academic Press, San Diego. doi: 10.1002/bies.950150612.
- Liu, F., Baggerman, G., D'Hertog, W., Verleyen, P., Schoofs, L. y Wets, G. (2006). In silico identification of new secretory peptide genes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5(3): 510-522. doi: 10.1074/mcp.M400114-MCP200.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. y McGinnis, W. (2002). The *Drosophila* Hox gene *deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell*, 110(4): 457-466.
- Losada-Pérez, M., Gabilondo, H., del Saz, D., Baumgardt, M., Molina, I., León, Y., Monedero, I., Díaz-Benjumea, F., Torroja, L. y Benito-Sipos, J. (2010a). Lineage-unrelated neurons generated in different temporal windows and expressing different combinatorial codes can converge in the activation of the same terminal differentiation gene. *Mechanisms of Development*, 127(9-12): 458-471. doi: 10.1016/j.mod.2010.08.003.

Losada-Pérez, M., Gabilondo, H., del Saz, D., Baumgardt, M., Molina, I., León, Y., Monedero, I., Díaz-Benjumea, F., Torroja, L. y Benito-Sipos, J. (2010b). Lineage-unrelated neurons generated in different temporal windows and expressing different combinatorial codes can converge in the activation of the same terminal differentiation gene. *Mechanisms of Development*, 127(9-12): 458-471. doi: 10.1016/j.mod.2010.08.003.

Losada-Pérez, M., Gabilondo, H., Molina, I., Turiegano, E., Torroja, L., Thor, S. y Benito-Sipos, J. (2013). Klumpfuss controls FMRamide expression by enabling BMP signaling within the NB5-6 lineage. *Development (Cambridge, England)*, 140(10): 2181-2189. doi: 10.1242/dev.089748.

Love, M.I., Huber, W. y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12): 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Lundell, M.J., Lee, H., Pérez, E. y Chadwell, L. (2003). The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 130(17): 4109-4121.

Maharjan, M., Maeda, R.K., Karch, F. y Hart, C.M. (2018). Using a phiC31 "Disintegrator" to make new attP sites in the *Drosophila* genome at locations showing chromosomal position effects. *PLoS One*, 13(10): e0205538. doi: 10.1371/journal.pone.0205538.

Maine, G.T., Sinha, P. y Tye, B.K. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics*, 106(3): 365-385.

Mallo, M. y Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development (Cambridge, England)*, 140(19): 3951-3963. doi: 10.1242/dev.068346.

Mann, R.S., Lelli, K.M. y Joshi, R. (2009). Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current Topics in Developmental Biology*, 88: 63.

Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M. y Gilad, Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, 18(9): 1509-1517. doi: 10.1101/gr.079558.108.

Marqués, G., Haerry, T.E., Crotty, M.L., Xue, M., Zhang, B. y O'Connor, M.B. (2003a). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 130(22): 5457-5470. doi: 10.1242/dev.00772.

Marqués, G., Haerry, T.E., Crotty, M.L., Xue, M., Zhang, B. y O'Connor, M.B. (2003b). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 130(22): 5457-5470. doi: 10.1242/dev.00772.

- Martin-Lannerée, S., Halliez, S., Hirsch, T.Z., Hernandez-Rapp, J., Passet, B., Tomkiewicz, C., Villa-Diaz, A., Torres, J., Launay, J., Béringue, V., Vilotte, J. y Mouillet-Richard, S. (2017). The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 35(3): 754-765. doi: 10.1002/stem.2501.
- Mattar, P., Ericson, J., Blackshaw, S. y Cayouette, M. (2015). A conserved regulatory logic controls temporal identity in mouse neural progenitors. *Neuron*, 85(3): 497-504. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.052.
- Maurange, C. y Gould, A.P. (2005). Brainy but not too brainy: starting and stopping neuroblast divisions in *Drosophila*. *Trends in Neurosciences*, 28(1): 30-36. doi: 10.1016/j.tins.2004.10.009.
- McDonald, J.A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C.Q. y Mellerick, D.M. (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the vnd homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes & Development*, 12(22): 3603-3612. doi: 10.1101/gad.12.22.3603.
- Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zhang, D. y Kessler, J.A. (1997). Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 20(7): 309-317.
- Mellerick, D.M., Kassis, J.A., Zhang, S.D. y Odenwald, W.F. (1992). castor encodes a novel zinc finger protein required for the development of a subset of CNS neurons in *Drosophila*. *Neuron*, 9(5): 789-803.
- Miguel-Aliaga, I., Allan, D.W. y Thor, S. (2004). Independent roles of the dachshund and eyes absent genes in BMP signaling, axon pathfinding and neuronal specification. *Development (Cambridge, England)*, 131(23): 5837-5848. doi: 10.1242/dev.01447.
- Miguel-Aliaga, I. y Thor, S. (2004). Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development (Cambridge, England)*, 131(24): 6093-6105. doi: 10.1242/dev.01521.
- Miguel-Aliaga, I., Thor, S. y Gould, A.P. (2008). Postmitotic specification of *Drosophila* insulinergic neurons from pioneer neurons. *PLoS Biology*, 6(3): e58. doi: 10.1371/journal.pbio.0060058.
- Miller, D.F., Rogers, B.T., Kalkbrenner, A., Hamilton, B., Holtzman, S.L. y Kaufman, T. (2001). Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mechanisms of Development*, 102(1-2): 3-16.
- Min, S., Chae, H., Jang, Y., Choi, S., Lee, S., Jeong, Y.T., Jones, W.D., Moon, S.J., Kim, Y. y Chung, J. (2016). Identification of a Peptidergic Pathway Critical to Satiety Responses in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 26(6): 814-820. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.029.

- Mizutani, C.M. y Bier, E. (2008). EvoD/Vo: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nature Reviews. Genetics*, 9(9): 663-677. doi: 10.1038/nrg2417.
- Monedero Cobeta, I., Salmani, B.Y. y Thor, S. (2017). Anterior-Posterior Gradient in Neural Stem and Daughter Cell Proliferation Governed by Spatial and Temporal Hox Control. *Current Biology: CB*, 27(8): 1161-1172. doi: 10.1016/j.cub.2017.03.023.
- Monedero Cobeta, I., Stadler, C.B., Li, J., Yu, P., Thor, S. y Benito-Sipos, J. (2018). Specification of Drosophila neuropeptidergic neurons by the splicing component *brr2*. *PLoS Genetics*, 14(8): e1007496. doi: 10.1371/journal.pgen.1007496.
- Morawe, T., Honemann-Capito, M., von Stein, W. y Wodarz, A. (2011). Loss of the extraproteasomal ubiquitin receptor Rings lost impairs ring canal growth in Drosophila oogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 193(1): 71-80. doi: 10.1083/jcb.201009142.
- Morgan, T.H. (1911). CHROMOSOMES AND ASSOCIATIVE INHERITANCE. *Science (New York, N.Y.)*, 34(880): 636-638. doi: 10.1126/science.34.880.636.
- Moyer, S.E., Lewis, P.W. y Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27): 10236-10241. doi: 10.1073/pnas.0602400103.
- Mumm, J.S. y Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Developmental Biology*, 228(2): 151-165. doi: 10.1006/dbio.2000.9960.
- Muotri, A.R. y Gage, F.H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*, 441(7097): 1087-1093. doi: 10.1038/nature04959.
- Naka, H., Nakamura, S., Shimazaki, T. y Okano, H. (2008). Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. *Nature Neuroscience*, 11(9): 1014-1023. doi: 10.1038/nn.2168.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M. y Pascual-Montano, A. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_2): W322. doi: 10.1093/nar/gkp416.
- Novotny, T., Eiselt, R. y Urban, J. (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the Drosophila central nervous system. *Development (Cambridge, England)*, 129(4): 1027-1036.
- Nüsslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature*, 287(5785): 795-801.

- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. y Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 193(5): 267-282. doi: 10.1007/BF00848156.
- Oh, S., Kingsley, T., Shin, H., Zheng, Z., Chen, H., Chen, X., Wang, H., Ruan, P., Moody, M. y Hou, S.X. (2003). A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics*, 163(1): 195-201.
- Ohshiro, T., Yagami, T., Zhang, C. y Matsuzaki, F. (2000). Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature*, 408(6812): 593-596. doi: 10.1038/35046087.
- Orsi, G.A., Algazeery, A., Meyer, R.E., Capri, M., Sapey-Triomphe, L.M., Horard, B., Gruffat, H., Couble, P., Aït-Ahmed, O. y Loppin, B. (2013). *Drosophila* Yemanuclein and HIRA cooperate for de novo assembly of H3.3-containing nucleosomes in the male pronucleus. *PLoS Genetics*, 9(2): e1003285. doi: 10.1371/journal.pgen.1003285.
- Ott, S.R. (2008). Confocal microscopy in large insect brains: zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2): 220-230. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.031.
- Page, S.L., Nielsen, R.J., Teeter, K., Lake, C.M., Ong, S., Wright, K.R., Dean, K.L., Agne, D., Gilliland, W.D. y Hawley, R.S. (2007a). A germline clone screen for meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 1(3): 172-181.
- Page, S.L., Nielsen, R.J., Teeter, K., Lake, C.M., Ong, S., Wright, K.R., Dean, K.L., Agne, D., Gilliland, W.D. y Hawley, R.S. (2007b). A germline clone screen for meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 1(3): 172-181.
- Park, D., Veenstra, J.A., Park, J.H. y Taghert, P.H. (2008). Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PloS One*, 3(3): e1896. doi: 10.1371/journal.pone.0001896.
- Park, S.Y. y Asano, M. (2008). The origin recognition complex is dispensable for endoreplication in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34): 12343-12348.
- Pascual, N., Castresana, J., Valero, M., Andreu, D. y Bellés, X. (2004). Orcokinin in insects and other invertebrates. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(11): 1141-1146. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.07.005.
- Pearson, B.J. y Doe, C.Q. (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature*, 425(6958): 624-628. doi: 10.1038/nature01910.
- Perlson, E., Maday, S., Fu, M., Moughamian, A.J. y Holzbaur, E.L.F. (2010). Retrograde axonal transport: pathways to cell death?. *Trends in Neurosciences*, 33(7): 335-344. doi: 10.1016/j.tins.2010.03.006.

Perrimon, N., Pitsouli, C. y Shilo, B. (2012). Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8): a005975. doi: 10.1101/cshperspect.a005975.

Pfeiffer, B.D., Ngo, T.B., Hibbard, K.L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J.W. y Rubin, G.M. (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics*, 186(2): 735-755. doi: 10.1534/genetics.110.119917.

Pinto-Teixeira, F., Konstantinides, N. y Desplan, C. (2016). Programmed cell death acts at different stages of *Drosophila* neurodevelopment to shape the central nervous system. *FEBS Letters*, 590(15): 2435-2453. doi: 10.1002/1873-3468.12298.

Pokrywka, N.J., Payne-Tobin, A., Raley-Susman, K.M. y Swartzman, S. (2009). Microtubules, the ER and Exu: new associations revealed by analysis of mini spindles mutations. *Mechanisms of Development*, 126(5-6): 289-300. doi: 10.1016/j.mod.2009.03.002.

Ravi, P., Trivedi, D. y Hasan, G. (2018). FMRFa receptor stimulated Ca<sup>2+</sup> signals alter the activity of flight modulating central dopaminergic neurons in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 14(8): e1007459. doi: 10.1371/journal.pgen.1007459.

Rebay, I., Fortini, M.E. y Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Analysis of phenotypic abnormalities and cell fate changes caused by dominant activated and dominant negative forms of the Notch receptor in *Drosophila* development. *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences De La Vie*, 316(9): 1097-1123.

Reiriz, J., Espejo, M., Ventura, F., Ambrosio, S. y Alberch, J. (1999). Bone morphogenetic protein-2 promotes dissociated effects on the number and differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *Journal of Neurobiology*, 38(2): 161-170.

Reissmann, E., Ernsberger, U., Francis-West, P.H., Rueger, D., Brickell, P.M. y Rohrer, H. (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development (Cambridge, England)*, 122(7): 2079-2088.

Rode, S., Ohm, H., Zipfel, J. y Rumpf, S. (2017). The spliceosome-associated protein Mfap1 binds to VCP in *Drosophila*. *PloS One*, 12(8): e0183733. doi: 10.1371/journal.pone.0183733.

Romanowski, P., Madine, M.A. y Laskey, R.A. (1996). XMCM7, a novel member of the *Xenopus* MCM family, interacts with XMCM3 and colocalizes with it throughout replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19): 10189-10194. doi: 10.1073/pnas.93.19.10189.

Roy, M., Sivan-Loukianova, E. y Eberl, D.F. (2013). Cell-type-specific roles of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase subunits in *Drosophila* auditory mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1): 181-186. doi: 10.1073/pnas.1208866110.

- Ryu, S. y Driever, W. (2006). Minichromosome maintenance proteins as markers for proliferation zones during embryogenesis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(11): 1140-1142. doi: 10.4161/cc.5.11.2779.
- Saha, A.R., Hill, J., Utton, M.A., Asuni, A.A., Ackerley, S., Grierson, A.J., Miller, C.C., Davies, A.M., Buchman, V.L., Anderton, B.H. y Hanger, D.P. (2004). Parkinson's disease alpha-synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 7): 1017-1024. doi: 10.1242/jcs.00967.
- Sánchez-Herrero, E. y Crosby, M.A. (1988). The Abdominal-B gene of *Drosophila melanogaster*: overlapping transcripts exhibit two different spatial distributions. *The EMBO Journal*, 7(7): 2163-2173.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J. y Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244): 262-265. doi: 10.1038/nature07935.
- Schmid, A., Chiba, A. y Doe, C.Q. (1999a). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development (Cambridge, England)*, 126(21): 4653-4689.
- Schmid, A., Chiba, A. y Doe, C.Q. (1999b). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development (Cambridge, England)*, 126(21): 4653-4689.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. y Technau, G.M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Developmental Biology*, 189(2): 186-204.
- Schnitzler, A.C., Mellott, T.J., Lopez-Coviella, I., Tallini, Y.N., Kotlikoff, M.I., Follettie, M.T. y Blusztajn, J.K. (2010). BMP9 (bone morphogenetic protein 9) induces NGF as an autocrine/paracrine cholinergic trophic factor in developing basal forebrain neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(24): 8221-8228. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5611-09.2010.
- Serano, T.L., Cheung, H.K., Frank, L.H. y Cohen, R.S. (1994). P element transformation vectors for studying *Drosophila melanogaster* oogenesis and early embryogenesis. *Gene*, 138(1-2): 181-186.
- Shukla, A., Navadgi, V.M., Mallikarjuna, K. y Rao, B.J. (2005). Interaction of hRad51 and hRad52 with MCM complex: a cross-talk between recombination and replication proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(4): 1240-1245. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.106.
- Skeath, J.B. y Carroll, S.B. (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)*, 114(4): 939-946.

Skeath, J.B. y Doe, C.Q. (1998). Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the Drosophila CNS. *Development (Cambridge, England)*, 125(10): 1857-1865.

Skeath, J.B. (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the Drosophila embryonic central nervous system. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 21(11): 922-931. doi: AID-BIES4>3.0.CO;2-T.

Skeath, J. y Thor, S. (2003). Genetic control of Drosophila nerve cord development. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(1): 8-15.

Skiebe, P., Dreger, M., Meseke, M., Evers, J.F. y Hucho, F. (2002). Identification of orcokinin in single neurons in the stomatogastric nervous system of the crayfish, *Cherax destructor*. *The Journal of Comparative Neurology*, 444(3): 245-259. doi: 10.1002/cne.10145.

Soufi, A., Garcia, M.F., Jaroszewicz, A., Osman, N., Pellegrini, M. y Zaret, K.S. (2015). Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell*, 161(3): 555-568. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.017.

Spana, E.P., Kopczynski, C., Goodman, C.S. y Doe, C.Q. (1995). Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the Drosophila CNS. *Development (Cambridge, England)*, 121(11): 3489-3494.

Spana, E.P. y Doe, C.Q. (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron*, 17(1): 21-26.

Spemann, H. y Mangold, H. (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *The International Journal of Developmental Biology*, 45(1): 13-38.

Spitz, F. y Furlong, E.E.M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews. Genetics*, 13(9): 613-626. doi: 10.1038/nrg3207.

Stangier, J., Hilbich, C., Burdzik, S. y Keller, R. (1992). Orcokinin: a novel myotropic peptide from the nervous system of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Peptides*, 13(5): 859-864.

Stern, M. y Ganetzky, B. (1992). Identification and characterization of inebriated, a gene affecting neuronal excitability in Drosophila. *Journal of Neurogenetics*, 8(3): 157-172.

Stratmann, J., Gabilondo, H., Benito-Sipos, J. y Thor, S. (2016). Neuronal cell fate diversification controlled by sub-temporal action of Kruppel. *eLife*, 5 doi: 10.7554/eLife.19311.

- Stratmann, J. y Thor, S. (2017). Neuronal cell fate specification by the molecular convergence of different spatio-temporal cues on a common initiator terminal selector gene. *PLoS Genetics*, 13(4): e1006729. doi: 10.1371/journal.pgen.1006729.
- Stratmann, J., Ekman, H. y Thor, S. (2019). A branching gene regulatory network dictating different aspects of a neuronal cell identity. *Development (Cambridge, England)*, 146(6) doi: 10.1242/dev.174300.
- Sugino, K., Clark, E., Schulmann, A., Shima, Y., Wang, L., Hunt, D.L., Hooks, B.M., Tränkner, D., Chandrashekar, J., Picard, S., Lemire, A.L., Spruston, N., Hantman, A.W. y Nelson, S.B. (2019). Mapping the transcriptional diversity of genetically and anatomically defined cell populations in the mouse brain. *eLife*, 8 doi: 10.7554/eLife.38619.
- Sundram, V., Ganju, A., Hughes, J.E., Khan, S., Chauhan, S.C. y Jaggi, M. (2014). Protein kinase D1 attenuates tumorigenesis in colon cancer by modulating  $\beta$ -catenin/T cell factor activity. *Oncotarget*, 5(16): 6867-6884. doi: 10.18632/oncotarget.2277.
- Suska, A., Miguel-Aliaga, I. y Thor, S. (2011). Segment-specific generation of *Drosophila* Capability neuropeptide neurons by multi-faceted Hox cues. *Developmental Biology*, 353(1): 72-80. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.02.015.
- Svaren, J., Sevetson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C. y Milbrandt, J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Molecular and Cellular Biology*, 16(7): 3545-3553. doi: 10.1128/mcb.16.7.3545.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R. y Pascual-Montano, A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue): W483. doi: 10.1093/nar/gks402.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. y Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Molecular Cell*, 5(1): 59-71.
- Technau, G.M., Berger, C. y Urbach, R. (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(4): 861-869. doi: 10.1002/dvdy.20566.
- Terman, J.R. y Kolodkin, A.L. (2004). Nervy links protein kinase a to plexin-mediated semaphorin repulsion. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5661): 1204-1207. doi: 10.1126/science.1092121.

- Terriente Félix, J., Magariños, M. y Díaz-Benjumea, F.J. (2007). Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development (Cambridge, England)*, 134(10): 1845-1852. doi: 10.1242/dev.003830.
- Terriente, J., Perea, D., Suzanne, M. y Díaz-Benjumea, F.J. (2008). The *Drosophila* gene *zfh2* is required to establish proximal-distal domains in the wing disc. *Developmental Biology*, 320(1): 102-112. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.04.028.
- Thor, S. y Thomas, J.B. (1997). The *Drosophila* *islet* gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron*, 18(3): 397-409.
- Tomer, R., Khairy, K., Amat, F. y Keller, P.J. (2012). Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 9(7): 755-763. doi: 10.1038/nmeth.2062.
- Touma, J.J., Weckerle, F.F. y Cleary, M.D. (2012). *Drosophila* Polycomb complexes restrict neuroblast competence to generate motoneurons. *Development (Cambridge, England)*, 139(4): 657-666. doi: 10.1242/dev.071589.
- Tran, K.D. y Doe, C.Q. (2008). Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development (Cambridge, England)*, 135(21): 3491-3499. doi: 10.1242/dev.024349.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. y Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5): 511-515. doi: 10.1038/nbt.1621.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L. y Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3): 562-578. doi: 10.1038/nprot.2012.016.
- Tsao, C., Geisen, C. y Abraham, R.T. (2004). Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *The EMBO Journal*, 23(23): 4660-4669. doi: 10.1038/sj.emboj.7600463.
- Tsuji, T., Hasegawa, E. y Isshiki, T. (2008). Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development (Cambridge, England)*, 135(23): 3859-3869. doi: 10.1242/dev.025189.
- Uesaka, N., Uchigashima, M., Mikuni, T., Hirai, H., Watanabe, M. y Kano, M. (2015). Retrograde signaling for climbing fiber synapse elimination. *Cerebellum*, 14(1): 4-7. doi: 10.1007/s12311-014-0615-y.

- Ulvklo, C., MacDonald, R., Bivik, C., Baumgardt, M., Karlsson, D. y Thor, S. (2012). Control of neuronal cell fate and number by integration of distinct daughter cell proliferation modes with temporal progression. *Development (Cambridge, England)*, 139(4): 678-689. doi: 10.1242/dev.074500.
- Urbach, R. y Technau, G.M. (2004). Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(7): 739-751. doi: 10.1002/bies.20062.
- Urbach, R., Volland, D., Seibert, J. y Technau, G.M. (2006). Segment-specific requirements for dorsoventral patterning genes during early brain development in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 133(21): 4315-4330. doi: 10.1242/dev.02605.
- Urbach, R. y Technau, G.M. (2008). Dorsoventral patterning of the brain: a comparative approach. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 628: 42-56. doi: 10.1007/978-0-387-78261-4\_3.
- van Meyel, D.J., O'Keefe, D.D., Jurata, L.W., Thor, S., Gill, G.N. y Thomas, J.B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Molecular Cell*, 4(2): 259-265.
- van Meyel, D.J., O'Keefe, D.D., Thor, S., Jurata, L.W., Gill, G.N. y Thomas, J.B. (2000). Chip is an essential cofactor for apterous in the regulation of axon guidance in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 127(9): 1823-1831.
- Varley, J.E. y Maxwell, G.D. (1996). BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, increase the number of adrenergic cells which develop in quail trunk neural crest cultures. *Experimental Neurology*, 140(1): 84-94. doi: 10.1006/exnr.1996.0118.
- Veenstra, J.A., Lau, G.W., Agricola, H.J. y Petzel, D.H. (1995). Immunohistological localization of regulatory peptides in the midgut of the female mosquito *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology*, 104(5): 337-347.
- von Hippel, P.H. y Delagoutte, E. (2001). A general model for nucleic acid helicases and their "coupling" within macromolecular machines. *Cell*, 104(2): 177-190.
- Vosshall, L.B., Price, J.L., Sehgal, A., Saez, L. y Young, M.W. (1994). Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153): 1606-1609.
- Waddington, C.H. (1947). *Organizers and Genes*. Cambridge biological studies, Cambridge. doi: 10.1093/aesa/34.2.517.
- Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1): 57-63. doi: 10.1038/nrg2484.

Wehn, A. y Campbell, G. (2006). Genetic interactions among scribbler, Atrophin and groucho in *Drosophila* uncover links in transcriptional repression. *Genetics*, 173(2): 849-861. doi: 10.1534/genetics.105.055012.

White, J.A., Anderson, E., Zimmerman, K., Zheng, K.H., Rouhani, R. y Gunawardena, S. (2015). Huntingtin differentially regulates the axonal transport of a sub-set of Rab-containing vesicles in vivo. *Human Molecular Genetics*, 24(25): 7182-7195. doi: 10.1093/hmg/ddv415.

White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K. y Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5159): 677-683.

Williams, J.A., Bell, J.B. y Carroll, S.B. (1991). Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes & Development*, 5(12B): 2481-2495.

Wimmer, E.A., Carleton, A., Harjes, P., Turner, T. y Desplan, C. (2000). Bicoid-independent formation of thoracic segments in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5462): 2476-2479.

Wodarz, A. y Huttner, W.B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mechanisms of Development*, 120(11): 1297-1309.

Wu, J. y Cohen, S.M. (2000a). Proximal distal axis formation in the *Drosophila* leg: distinct functions of teashirt and homothorax in the proximal leg. *Mechanisms of Development*, 94(1-2): 47-56.

Wu, J. y Cohen, S.M. (2000b). Proximal distal axis formation in the *Drosophila* leg: distinct functions of teashirt and homothorax in the proximal leg. *Mechanisms of Development*, 94(1-2): 47-56.

Wu, J. y Cohen, S.M. (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development (Cambridge, England)*, 129(10): 2411-2418.

Xie, Y., Zhou, B., Lin, M., Wang, S., Foust, K.D. y Sheng, Z. (2015). Endolysosomal Deficits Augment Mitochondria Pathology in Spinal Motor Neurons of Asymptomatic fALS Mice. *Neuron*, 87(2): 355-370. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.026.

Yamamoto, S., Jaiswal, M., Charng, W., Gambin, T., Karaca, E., Mirzaa, G., Wiszniewski, W., Sandoval, H., Haelterman, N.A., Xiong, B., Zhang, K., Bayat, V., David, G., Li, T., Chen, K., Gala, U., Harel, T., Pehlivan, D., Penney, S., Vissers, Lisenka E. L. M., de Ligt, J., Jhangiani, S.N., Xie, Y., Tsang, S.H., Parman, Y., Sivaci, M., Battaloglu, E., Muzny, D., Wan, Y., Liu, Z., Lin-Moore, A.T., Clark, R.D., Curry, C.J., Link, N., Schulze, K.L., Boerwinkle, E., Dobyns, W.B., Allikmets, R., Gibbs, R.A., Chen, R., Lupski, J.R., Wangler, M.F. y Bellen, H.J. (2014). A *drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*, 159(1): 200-214. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.002.

Yang, X., Bahri, S., Klein, T. y Chia, W. (1997). Klumpfuss, a putative *Drosophila* zinc finger transcription factor, acts to differentiate between the identities of two secondary precursor cells within one neuroblast lineage. *Genes & Development*, 11(11): 1396-1408.

Yankulov, K., Todorov, I., Romanowski, P., Licatalosi, D., Cilli, K., McCracken, S., Laskey, R. y Bentley, D.L. (1999). MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9): 6154-6163. doi: 10.1128/mcb.19.9.6154.

Zaret, K.S. y Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & Development*, 25(21): 2227-2241. doi: 10.1101/gad.176826.111.

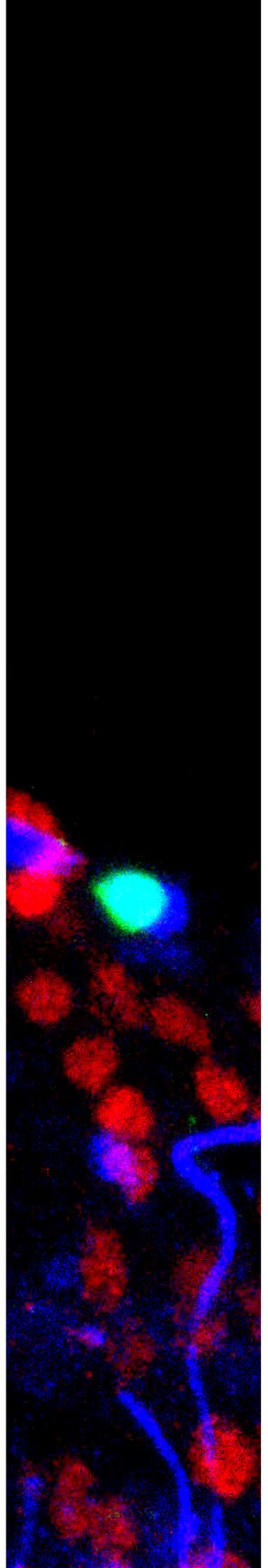
Zarin, A.A., Asadzadeh, J., Hokamp, K., McCartney, D., Yang, L., Bashaw, G.J. y Labrador, J. (2014). A transcription factor network coordinates attraction, repulsion, and adhesion combinatorially to control motor axon pathway selection. *Neuron*, 81(6): 1297-1311. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.038.

Zhong, J. y Zou, H. (2014). BMP signaling in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 27: 127-134. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.009.

Zhu, M., Li, X., Tian, X. y Wu, C. (2015). Mask loss-of-function rescues mitochondrial impairment and muscle degeneration of *Drosophila* pink1 and parkin mutants. *Human Molecular Genetics*, 24(11): 3272-3285. doi: 10.1093/hmg/ddv081.



# ANEXO I





**Tabla 9. Relación de líneas de *D. melanogaster* utilizadas en la búsqueda genética dirigida.** Los genotipos aparecen detallados, ordenados alfabéticamente y asignados a un código numérico. También se indica el origen de cada línea, así como la referencia (en caso de proceder de un proveedor oficial de libre acceso) o la publicación en la que se describe cada mutación (en caso de provenir de un laboratorio independiente). Asimismo, se incluye si la línea ha sufrido alguna modificación con respecto a la original (principalmente, cambios en los cromosomas balanceadores o generación de líneas nuevas a partir de construcciones establecidas anteriormente). [\*Abreviaturas. BDSC: *Bloomington Drosophila Stock Center*; DGRC: *Drosophila Genomics and Genetics Resources Kyoto Stock Center*].

Nº	Genotipo	Origen
1.	<i>Acn[1] pr[1]/CyO</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3388
2.	<i>Adh[fn23] pr[1] cn[1]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1152
3.	<i>al[1] b[1] c[1] retn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #7097
4.	<i>Aplip1[EK4]</i>	BDSC Ref.: #24632
5.	<i>arm[2] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}101/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8554
6.	<i>Atro[35]/TTG</i>	Gerard Campbell (Wehn y Campbell, 2006)
7.	<i>aurA[87Ac-3]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6188
8.	<i>b[1] pr[1] cn[1] SMC2[jsl2] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9455
9.	<i>brat[1] rdo[1] hook[1] pr[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3988
10.	<i>brk[M68]</i>	Christine Rushlow (Jaźwińska <i>et al.</i> , 1999)
11.	<i>bw[1]; Gen[Z5997] st[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8465
12.	<i>bw[1]; Rop[G27] st[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4381
13.	<i>Bx[1]</i>	BDSC Ref.: #15
14.	<i>C(1;YL)1, y[1] fs(1)h[rnc]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5278
15.	<i>CASK[X-307]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6783
16.	<i>chn[ECJ1]/CD</i>	Sonsoles Campuzano (Escudero <i>et al.</i> , 2005)
17.	<i>ci[1] gvl[1] ey[R] sv[n]</i>	BDSC Ref.: #641
18.	<i>cmb[KO]/TD</i>	Andreas Jenny (Fagan <i>et al.</i> , 2014)
19.	<i>cn[1] bw[1] pita[3] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #63816
20.	<i>cn[1] DAT[Z2-1744] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #30867
21.	<i>cn[1] en[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #265
22.	<i>cn[1] Ote[DB] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5092
23.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}apt[03041]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11258
24.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}dap[04454]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11377
25.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}Dek[04154]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11366
26.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}dpp[10638]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12379
27.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}ena[02029] CG15118[02029]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11114
28.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}PCNA[02448]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11192
29.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}Sema2a[03021]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11257
30.	<i>cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}sm[05338]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11403

Nº	Genotipo	Origen
31.	<i>cn[1] sli[2] bw[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3266
32.	<i>cn[1]; P{ry[+t7.2]=PZ}vn[10567] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11749
33.	<i>CtBP[87De-10]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1663
34.	<i>Cul3[gft2] P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #23866
35.	<i>Df(1)10-70d, VhaAC39-1[cho-1] sn[3]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #7153
36.	<i>Df(1)ase-1, sc[ase-1] pn[1]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #104
37.	<i>Df(1)m13, Gs2[m13]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6001
38.	<i>Df(2L)FCK-20, dpy[ov1] salr[FCK-20] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5869
39.	<i>Df(3L)D25, exex[KK30] HGTX[D25]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #56828
40.	<i>Df(3L)nerfin-1[54]/TD</i>	Alexander Kuzin (Kuzin <i>et al.</i> , 2005)
41.	<i>Df(3R)ca[nd1], e[s] ncd[1] ca[nd1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1290
42.	<i>Df(3R)DI-KX23, e[*]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2411
43.	<i>Dfd[16] red[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2325
44.	<i>dimm[Pi]</i>	Douglas W. Allan (Hewes, Randall S. <i>et al.</i> , 2003)
45.	<i>dimm[rev4]</i>	Douglas W. Allan (Hewes, Randall S. <i>et al.</i> , 2003)
46.	<i>disco[1]</i>	BDSC Ref.: #5682
47.	<i>Dp(?;2)bw[D], dpa[1] bw[D]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4126
48.	<i>Dp(?;2)bw[D], l(2)43Bd[1] bw[D]/CyO</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4122
49.	<i>Dp(1;Y)B[S], B[+]; cn[1] bw[1] vir[2f]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #77886
50.	<i>dpy[ov1] cn[1] bw[1] kcc[Ad-4]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5207
51.	<i>dpy[ov1] SoxN[NC14] pr[1] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9938
52.	<i>dSAP18[R7-18]</i>	María Lluïsa Espinás (Canudas <i>et al.</i> , 2005)
53.	<i>dsh[75] P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #68165
54.	<i>dys[2]/TD</i>	Carlos Estella (Jiang y Crews, 2006)
55.	<i>egl[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #32006
56.	<i>elav[5] w[*] sn[*]/FM6c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #77877
57.	<i>flfl[N42]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #66534
58.	<i>FM7a, nod[4]/C(1)DX, y[1] fl[1]/Dp(1;Y)y[+]; sv[spa-pol]</i>	BDSC Ref.: #3430
59.	<i>Gdi[N7-3] pr[1] cn[1] PPO1[Bc]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4103
60.	<i>H[2]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #517
61.	<i>hkb[2] p[p]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5457
62.	<i>homer[R102]</i>	BDSC Ref.: #9564
63.	<i>In(1)w[m4]; Su(var)3-9[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6209
64.	<i>In(2L)tsh3, l(2)34Db[tsh3] tsh[3]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8883
65.	<i>In(2R)Pcl[11], Pcl[11]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2401

Nº	Genotipo	Origen
66.	<i>In(3L)iro-DFM2, ara[DFM2] caup[DFM2]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36530
67.	<i>inaE[N125]; bw[1]; st[1]</i>	BDSC Ref.: #42243
68.	<i>ine[2]</i>	Michael Stern (Stern y Ganetzky, 1992)
69.	<i>InR[E19]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9646
70.	<i>Ki[1] ftz[11] p[p]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2224
71.	<i>Klp61F[urc-1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #35508
72.	<i>klu[212IR51C]/TD</i>	William Chia (Yang <i>et al.</i> , 1997)
73.	<i>kuz[e29-4]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5804
74.	<i>lab[14] p[p]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2092
75.	<i>lark[1]/TTG</i>	Mary A. Roberts (Sundram <i>et al.</i> , 2014)
76.	<i>Lim1[E9] P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36499
77.	<i>Lim3[2]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5386
78.	<i>lin-28[Δ1]</i>	Nicholas Sokol (Chen, C. <i>et al.</i> , 2015)
79.	<i>mask[10.22]/TD</i>	Chunlai Wu (Zhu <i>et al.</i> , 2015)
80.	<i>Mcm3[smu]/FM7c Kr-GFP</i>	Thomas Raabe (Blumröder <i>et al.</i> , 2016)
81.	<i>mcm5[exc222]/TTG</i>	Cathleen M. Lake (Page <i>et al.</i> , 2007b)
82.	<i>Men[nNC3] Aldox89A[nNC4]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4025
83.	<i>metro[47]</i>	Ulrich Thomas (Bachmann <i>et al.</i> , 2010)
84.	<i>mfap1[Ds-red]/TD</i>	Sebastian Rumpf (Rode <i>et al.</i> , 2017)
85.	<i>mip[1]/TTG</i>	Young-Joon Kim (Min <i>et al.</i> , 2016)
86.	<i>miple[Δ194]/TTG</i>	Ruth Palmer (Hugosson <i>et al.</i> , 2014)
87.	<i>mlf[ΔC1]/CD</i>	Lucas Waltzer (Martin-Lannerée <i>et al.</i> , 2017)
88.	<i>mor[5]/TTG</i>	James A. Kennison (Brizuela y Kennison, 1997)
89.	<i>msps[P]/TTG</i>	Nancy Pokrywka (Pokrywka <i>et al.</i> , 2009)
90.	<i>mwh[1] bin[I1] red[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1438
91.	<i>mwh[1] hd[Ff] red[1] e[4]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4866
92.	<i>mwh[1] Invadolysin[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9004
93.	<i>mwh[1] Med[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9033
94.	<i>mwh[1] P{hsneo}(3)neo38[1] red[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10275
95.	<i>mys[1]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59

Nº	Genotipo	Origen
96.	<i>nab</i> [SH143]	Fernando Díaz-Benjumea (Oh <i>et al.</i> , 2003)
97.	<i>nemy</i> [p153]	Natalia Iliadi (Kamyshev <i>et al.</i> , 2002)
98.	<i>neur</i> [11]/TTG	Derivado de BDSC Ref.: #2747
99.	<i>Nlaz</i> [mw5]/CD	Diego Sánchez (Hull-Thompson <i>et al.</i> , 2009)
100.	<i>nrv3</i> [15]/CD	Daniel F. Eberl (Roy <i>et al.</i> , 2013)
101.	<i>nvy</i> [PDFKG1]/CD	Jonathan R. Terman (Terman y Kolodkin, 2004)
102.	<i>nwk</i> [1]	BDSC Ref.: #51626
103.	<i>Orc2</i> [1]/TD	Derivado de DGRC Ref.: #109610
104.	<i>Orc5</i> [1]/CD	Derivado de BDSC Ref.: #25746
105.	<i>Orc6</i> [35]/CD	Maxim Balasov (Balasov <i>et al.</i> , 2007)
106.	<i>osa</i> [2]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #3616
107.	<i>P{GawB.DeltaS}rn[GAL4-DeltaS]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8142
108.	<i>P{ry[+t7.2]=BS3.0}H1-1, cn[*]; Df(3L)Galphai[P8], Galphai[P8]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44599
109.	<i>P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2, w[*] Myc[P0]P{y[+t*]=alphaTub84B (FRT.Myc)GAL4.Bb}1/FM7a; rept[35]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #64755
110.	<i>P{ry[+t7.2]=hsFLP}1, y[1] w[*]; Rab5[2] P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #42702
111.	<i>P{ry[+t7.2]=hsFLP}12, y[1] w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B cdm[177]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #58454
112.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Adf1[01349] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11040
113.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Baldspot[02281] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11563
114.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}bru3[05871] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11675
115.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}CtBP[03463] ry[506]/TTG</i>	BDSC Ref.: #11590
116.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}dock[04723] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11385
117.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Dscam1[05518] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11412
118.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Gug[03928] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11615
119.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Hr38[02306] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11181
120.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Hrb27C[02647] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11204
121.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Hsc70Cb[00082] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11485
122.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}jumu[06439] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11683
123.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}mts[02496] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11193
124.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}mub[04093] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11624
125.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}qsm[05510] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12192
126.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}Ref1[02267] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11562
127.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}stc[05441] CG15269[05441] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11408
128.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}trh[10512] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11747

Nº	Genotipo	Origen
129.	<i>P{ry[+t7.2]=PZ}tsh[04319] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11370
130.	<i>P{ry[+t7.2]=ry11}stau[ry9] cn[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10742
131.	<i>P{w[+mC]=UASp-klar.6Xmyc}NA1, w[*]; klar[marb-CD4]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #25668
132.	<i>pb[27]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2178
133.	<i>pr[1] cn[1] Su(H)[2]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #30477
134.	<i>rab3<sup>rup</sup></i>	Ethan R. Graf (Graf <i>et al.</i> , 2009)
135.	<i>Rab8[1] red[1] e[4]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #26173
136.	<i>Raf[7]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #7338
137.	<i>Rbf[14] w[1118]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #7435
138.	<i>Rca1[IX] cn[1] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9162
139.	<i>Rcc1[FF32] h[1] Diap1[1] st[1] cu[1] sr[1] e[s]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #37720
140.	<i>red[1] e[1] ash2[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4584
141.	<i>rn[5] red[1] e[1]/TTG</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4764
142.	<i>rngo[GE3956]</i>	Andreas Wodarz (Morawe <i>et al.</i> , 2011)
143.	<i>ru[1] h[1] Diap1[1] st[1] cu[1] ems[1] sr[1] e[s] ca[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3349
144.	<i>ru[1] h[1] Diap1[1] st[1] cu[1] pnr[1] sr[1] e[s] ca[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3106
145.	<i>ru[1] h[1] Diap1[1] st[1] hth[5E04] cu[1] sr[1] e[s] ca[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4221
146.	<i>ru[1] h[1] Diap1[1] st[1] Karybeta3[C142] cu[1] sr[1] e[s] ca[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4832
147.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}Akt1[04226]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11627
148.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}BRWD3[05842]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12155
149.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}E2f1[07172]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11717
150.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}Fer2LCH[00035]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11483
151.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}gish[04895]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11790
152.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}Hel89B[08724], l(3)08724[08724]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11732
153.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}heph[2]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #635
154.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}Sec13[01031]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10327
155.	<i>ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}slmb[00295]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11493
156.	<i>ry[506] rump[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #57696
157.	<i>salm[1] cn[1] bw[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3274
158.	<i>scra[8] cn[1] bw[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4286
159.	<i>se[1] ry[1] AOX1[lpo] Aldox89A[n1] Sb[sbd-2]</i>	BDSC Ref.: #37751
160.	<i>Siz[U112]/TTG</i>	Christian Klämbt (Hummel <i>et al.</i> , 1999)
161.	<i>slp1[2]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5349
162.	<i>sna[Sco]/CD</i>	BDSC Ref.: #503
163.	<i>sna[Sco]/CyO; eyg[1]</i>	BDSC Ref.: #503

Nº	Genotipo	Origen
164.	<i>so[1]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #401
165.	<i>Sod1[n1] red[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #24492
166.	<i>spen[1401]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5808
167.	<i>spi[1] cn[1] bw[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1859
168.	<i>st[1] e[1] tll[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2729
169.	<i>st[1] ems[4] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #34503
170.	<i>st[1] in[1] kni[ri-1] Scm[D1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2406
171.	<i>Su(H)[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #417
172.	<i>Syx1A[Delta229] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4379
173.	<i>T(3;4)86D, kar[1] ry[41] Ace[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1283
174.	<i>tap[01658] P{ry[+t7.2]=PZ}blot[01658] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11542
175.	<i>tin[EC40]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #78560
176.	<i>tsh[8]/CD, P{ry[+t7.2]=en1}wg[en11]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #50763
177.	<i>Tsp2A<sup>3-3</sup>/FM7c Kr-GFP</i>	Yasushi Izumi (Izumi <i>et al.</i> , 2016)
178.	<i>tup[1] cn[1] bw[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2205
179.	<i>vg[nw] Hia[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #437
180.	<i>w[*] ct[C145] P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36496
181.	<i>w[*] Mnt[1]</i>	BDSC Ref.: #64768
182.	<i>w[*] norpA[36]</i>	BDSC Ref.: #9048
183.	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}CG1463[G17787]</i>	BDSC Ref.: #33591
184.	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}CG3847[G831]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #26608
185.	<i>w[*] P{w[+mC]=EP}Rpt6[G1225] CG1801[G1225]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #33469
186.	<i>w[*] P{w[+mW.hs]=GawB}MzVum; Syn[97]</i>	BDSC Ref.: #29031
187.	<i>w[*] TI{TI}NetB[tm]</i>	BDSC Ref.: #66880
188.	<i>w[*]; ash[22] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #24161
189.	<i>w[*]; Atg1[3] P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #60732
190.	<i>w[*]; b[1] pr[1] cn[1] Rho1[1B] px[1] sp[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9477
191.	<i>w[*]; beat-1a[3] Fas3[E25]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4748
192.	<i>w[*]; bw[1] egg[1473]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #30565
193.	<i>w[*]; Caf1-55[p55-1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #68168
194.	<i>w[*]; capt[E636] P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5944
195.	<i>w[*]; Cdk1[B47] cn[1] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6643
196.	<i>w[*]; CycB[2]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6630
197.	<i>w[*]; CycB3[2]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6635
198.	<i>w[*]; CycE[AR95] cn[1] pr[1] bw[1] wx[wxt]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6637
199.	<i>w[*]; Dap160[Delta1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #24877

Nº	Genotipo	Origen
200.	<i>w[*]; Df(2R)Liprin-gamma[H1], P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D Liprin-gamma[H1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #63813
201.	<i>w[*]; Df(3R)XNP[1], XNP[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #26642
202.	<i>w[*]; E2f2[76Q1] cn[1] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #7436
203.	<i>w[*]; emc[1] P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5532
204.	<i>w[*]; exex[KK30] e[s]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9930
205.	<i>w[*]; Galphaq[221c]/CyO, P{w[+mC]=ActGFP}MR1</i>	Derivado de BDSC Ref.: #30744
206.	<i>w[*]; HDAC1[def24] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #32239
207.	<i>w[*]; Hsp83[e6D]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #5696
208.	<i>w[*]; Kap-alpha3[D93]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #25397
209.	<i>w[*]; Klc[8ex94]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #31997
210.	<i>w[*]; Mi{Hto-WP}Drgx[GLO] Sfp24Bd[GLO]</i>	BDSC Ref.: #56546
211.	<i>w[*]; Nct[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #63240
212.	<i>w[*]; NPC2b[19]</i>	BDSC Ref.: #41761
213.	<i>w[*]; Nplp1[DeltaCRM]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #67651
214.	<i>w[*]; P{EP}pUf68[EP3058] / TD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #109011
215.	<i>w[*]; P{GawB}NP2762 / TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #104316
216.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D Dll[17]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #78356
217.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D mago[3] shn[3]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #51289
218.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D Optix[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #67402
219.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D Pcl[5]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #24157
220.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D shg[R69]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #58742
221.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B Abd-B[Mcp-1] Sce[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #24618
222.	<i>w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B pygo[S123]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #7209
223.	<i>w[*]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4502[EY07938]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17415
224.	<i>w[*]; P{w[+mC]=EP}Ge-1[GE10187]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #26886
225.	<i>w[*]; P{w[+mC]=EP}pUf68[EP3058]/TD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #109011
226.	<i>w[*]; P{w[+mC]=lacW}CG32486[SH095] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #29467
227.	<i>w[*]; P{w[+mC]=PTT-GC}CG13920[CC01646]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #51565
228.	<i>w[*]; P{w[+mC]=PTT-un}Spc105R[P01511LE]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #50845
229.	<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS-sqz.A}7-3/CD; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B sqz[ie]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36497
230.	<i>w[*]; P{w[+mC]=XP-U}LpR1[Df]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44236
231.	<i>w[*]; P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 fra[3]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8813

Nº	Genotipo	Origen
232.	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GawB</i> } <i>ppa</i> [NP0508]/CD	Derivado de DGRC Ref.: #103624
233.	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GawB</i> } <i>smid</i> [C161]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #27893
234.	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GawB</i> } <i>tey</i> [5053A]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #2702
235.	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>y</i> [+ <i>t7.7</i> ] <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>UAS-mCherry.mir-7.sponge.V2</i> } <i>attP40</i> ; <i>P</i> { <i>y</i> [+ <i>t7.7</i> ] <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>UAS-mCherry.mir-7.sponge.V2</i> } <i>attP2</i>	BDSC Ref.: #61373
236.	<i>w</i> [*]; <i>P</i> <i>Bac</i> { <i>GAL4D,EYFP</i> } <i>Gabat</i> [PL00338] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>FRT(w[hs])</i> }2 <i>A</i> <i>P</i> { <i>ry</i> [+ <i>t7.2</i> ]= <i>neoFRT</i> }82 <i>B</i>	BDSC Ref.: #19461
237.	<i>w</i> [*]; <i>Ptpmeg</i> [1]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #9756
238.	<i>w</i> [*]; <i>Rab6</i> [D23D]/CD	Derivado de BDSC Ref.: #5821
239.	<i>w</i> [*]; <i>Rpn6</i> [2F]/CD	Derivado de BDSC Ref.: #8717
240.	<i>w</i> [*]; <i>Skp2</i> [ex9]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #59000
241.	<i>w</i> [*]; <i>sna</i> [ <i>Sco</i> ]/ <i>CyO</i> ; <i>Sox21a</i> [6] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>FRT(w[hs])</i> }2 <i>A</i>	BDSC Ref.: #68389
242.	<i>w</i> [*]; <i>st</i> [1] <i>e</i> [1] <i>Fur1</i> [P127]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #63075
243.	<i>w</i> [*]; <i>st</i> [1] <i>faj</i> [BX4]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #25107
244.	<i>w</i> [*]; <i>TI</i> {3 <i>xP3-RFP=TI</i> } <i>jarid2</i> [KO]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #76238
245.	<i>w</i> [*]; <i>TI</i> {3 <i>xP3-RFP=TI</i> } <i>Kdm4B</i> [KO]	BDSC Ref.: #76243
246.	<i>w</i> [*]; <i>TI</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>TI</i> } <i>loqs</i> [KO] <i>P</i> { <i>ry</i> [+ <i>t7.2</i> ]= <i>neoFRT</i> }40 <i>A</i> /CD	Derivado de BDSC Ref.: #65411
247.	<i>w</i> [*]; <i>TI</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>TI</i> } <i>mir-184</i> [KO]/CD	Derivado de BDSC Ref.: #58896
248.	<i>w</i> [*]; <i>TI</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>TI</i> } <i>mir-276a</i> [KO]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #58906
249.	<i>w</i> [*]; <i>TI</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>TI</i> } <i>mir-278</i> [KO]	Derivado de BDSC Ref.: #58909
250.	<i>w</i> [*]; <i>tkv</i> [4] <i>P</i> { <i>ry</i> [+ <i>t7.2</i> ]= <i>neoFRT</i> }40 <i>A</i> /CD	Derivado de BDSC Ref.: #58786
251.	<i>w</i> [*]; <i>Tsp42Ej</i> [1]	BDSC Ref.: #27335
252.	<i>w</i> [*]; <i>wts</i> [ <i>x1</i> ] <i>P</i> { <i>ry</i> [+ <i>t7.2</i> ]= <i>neoFRT</i> }82 <i>B</i> /TD	Derivado de BDSC Ref.: #44251
253.	<i>w</i> [*]; <i>Zn72D</i> [1A14]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #32668
254.	<i>w</i> [*]; <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GawB</i> } <i>p130CAS</i> [NP4466]/TD	Derivado de DGRC Ref.: #104686
255.	<i>w</i> [1118] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>EP</i> } <i>EP1405</i>	BDSC Ref.: #17004
256.	<i>w</i> [1118] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>XP</i> } <i>CG12708</i> [d04821]; <i>l</i> (3)*[*/TD	Derivado de BDSC Ref.: #19208
257.	<i>w</i> [1118] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mGT</i> ]= <i>GT1</i> } <i>NetA</i> [BG02298]	BDSC Ref.: #12856
258.	<i>w</i> [1118] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mW.hs</i> ]= <i>GawB</i> } <i>cib</i> [P]	BDSC Ref.: #9464
259.	<i>w</i> [1118] <i>Ppt1</i> [S77F]	BDSC Ref.: #30879
260.	<i>w</i> [1118]; <i>Alh</i> [RV95]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #8635
261.	<i>w</i> [1118]; <i>Bgb</i> [9]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #33838
262.	<i>w</i> [1118]; <i>Df</i> (2 <i>L</i> ) <i>da</i> [10], <i>da</i> [10] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>t*</i> ] <i>ry</i> [+ <i>t*</i> ]= <i>white-un1</i> }30 <i>C</i> <i>P</i> { <i>neoFRT</i> }40 <i>A</i> /CD	Derivado de BDSC Ref.: #5531
263.	<i>w</i> [1118]; <i>hh</i> [ <i>ts2</i> ] <i>e</i> [ <i>s</i> ]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #1684
264.	<i>w</i> [1118]; <i>Lk6</i> [2]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #8707
265.	<i>w</i> [1118]; <i>Mi</i> { <i>ET1</i> } <i>Doc1</i> [MB02443]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #23568
266.	<i>w</i> [1118]; <i>Mi</i> { <i>ET1</i> } <i>Fer2</i> [MB09480]/TD	Derivado de BDSC Ref.: #26483
267.	<i>w</i> [1118]; <i>Mi</i> { <i>ET1</i> } <i>Lmx1a</i> [MB07364]	BDSC Ref.: #26346

Nº	Genotipo	Origen
268.	<i>w[1118]; Mi{ET1}NK7.1[MB02679]</i>	BDSC Ref.: #24025
269.	<i>w[1118]; Mi{ET1}Nup54[MB03363]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #23536
270.	<i>w[1118]; Mi{ET1}Samtor[MB11625] CG4707[MB11625]</i>	BDSC Ref.: #29232
271.	<i>w[1118]; Nos[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #56822
272.	<i>w[1118]; Nsf2[A6]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8281
273.	<i>w[1118]; P{RS3}CG6327[CB-0319-3]</i>	Derivado de DGRC Ref.: #123124
274.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=3'etau-lacZ}drl[R343]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #64346
275.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}alpha-Man- IIa[G4901]</i>	BDSC Ref.: #30106
276.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Arf51F[EP2612]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17076
277.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Cap-G[EP2346]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17045
278.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}CG42724[G19164]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #31842
279.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}CG6178[EP3251]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17104
280.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Etl1[EP701]</i>	BDSC Ref.: #17289
281.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}G8492 P{w[+mC]=EP}Orct[G8492]</i>	BDSC Ref.: #33277
282.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Naprt[EP2611]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17075
283.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=EP}Nmdar1[EP331]</i>	BDSC Ref.: #17112
284.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=FMRFa-EGFP.Tv}3, P{w[+mC]=UAS-myr-mRFP}2, Cap- D2[09C106]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59393
285.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=FMRFa-EGFP.Tv}3, P{w[+mC]=UAS-myr-mRFP}2, Ctr9[12P023]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59389
286.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=FMRFa-EGFP.Tv}3, P{w[+mC]=UAS-myr-mRFP}2, lbe[12C005]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59385
287.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=lacW}Atu[s1938]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10217
288.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=lacW}RpS12[s2783]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12085
289.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=lacW}slim[s1866]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12191
290.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=XP}CG6126[d09805]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #19322
291.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=XP}CG6218[d06481]</i>	BDSC Ref.: #19241
292.	<i>w[1118]; P{w[+mC]=XP}qtc[d00941]</i>	BDSC Ref.: #19155
293.	<i>w[1118]; P{w[+mGT]=GT1}dve[BG02382]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12859
294.	<i>w[1118]; P{w[+mGT]=GT1}Hipk[BG00855]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12779
295.	<i>w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #30027
296.	<i>w[1118]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor- P}CG31650[KG09054]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #14975

Nº	Genotipo	Origen
297.	<i>w[1118]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}chk[KG03625]/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12}FK1</i>	Derivado de BDSC Ref.: #13251
298.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=5HPw[+]}msk[B185]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #16162
299.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=IT.GAL4}CG9932[4006-G4]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #77636
300.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=IT.GAL4}dlp[1008-G4]</i>	BDSC Ref.: #63957
301.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=IT.GAL4}hng1[0133-G4]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #62657
302.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=IT.GAL4}lncRNA:let7C[0636-G4]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6372
303.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}Aos1[c06048]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17744
304.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}Brf[c07161]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17804
305.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}Bro[c05542]</i>	BDSC Ref.: #17714
306.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}kat-60L1[c01236]</i>	BDSC Ref.: #10430
307.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}NPFR[c01896]</i>	BDSC Ref.: #10747
308.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}Poc1[c06059]</i>	BDSC Ref.: #17745
309.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}Proc[c04750]</i>	BDSC Ref.: #11587
310.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=PB}Trh[c01440]</i>	BDSC Ref.: #10531
311.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=RB}Arl8[e00336]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17846
312.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=RB}CG31368[e00215]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17825
313.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=RB}Mkk4[e01485]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17956
314.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=RB}TfIIbeta[e00364]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17849
315.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}ADPS[f02060]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #18510
316.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}Ank2[f02001]CG32373[f02001]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #18502
317.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}Cen[f04787]</i>	BDSC Ref.: #18805
318.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}CG32176[f05870]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #18913
319.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}CG8861[f06147]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #18941
320.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}Cpsf100[f00376]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #18322
321.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}Odj[f00521]</i>	BDSC Ref.: #18341
322.	<i>w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}rau[f04153]</i>	BDSC Ref.: #18736

Nº	Genotipo	Origen
323.	<i>w[1118]; rho[ve-1] PBac{w[+mC]=RB3.WH3}LpR2[Df]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44233
324.	<i>w[1118]; Scr[4] red[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2188
325.	<i>w[1118]; TI{TI}Rab19[EYFP]</i>	BDSC Ref.: #62552
326.	<i>w[1118]; TI{w[+mW.hs]=TI}ktub[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #68206
327.	<i>w[1118]; TI{w[+mW.hs]=TI}REPTOR[KO]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76342
328.	<i>w[1118]; TI{w[+mW.hs]=TI}REPTOR- BP[KO]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76335
329.	<i>w[1118]; tou[2]/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12}FK1</i>	BDSC Ref.: #6402
330.	<i>w[1118]; wg[Sp-1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #38393
331.	<i>w[67c23] P{w[+mC]=lacW}l(1)G0007[G0028] P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de DGRC Ref.: #111765
332.	<i>w[67c23] P{w[+mC]=lacW}l(1)G0156[G0156]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11896
333.	<i>w[67c23] P{w[+mC]=lacW}Moe[G0323]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10897
334.	<i>wds[7]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3901
335.	<i>wg[1-12] cn[1] bw[1]/CD</i>	Stephen T. Crews (Nüsslein-Volhard <i>et al.</i> , 1984)
336.	<i>wg[1-8] cn[1] bw[1]/CD</i>	Stephen T. Crews (Nüsslein-Volhard <i>et al.</i> , 1984)
337.	<i>Wnt4[EMS23] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6650
338.	<i>y[*] w[*]; P{GawB}NP6377/CD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #105221
339.	<i>y[*] w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}igl[NP4240]/CD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #104644
340.	<i>y[*] w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}tral[NP5381]/TD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #104983
341.	<i>y[1] acj6[6]/ FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #60686
342.	<i>y[1] cv[1] rux[8]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9242
343.	<i>y[1] ec[1] cv[1] ct[1] v[1] exd[1]/FM7c Kr- GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #3293
344.	<i>y[1] w[*] Flacc[A] P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #57081
345.	<i>y[1] w[*] kdn[A] P{ry[+t7.2]=neoFRT}19A/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #52364
346.	<i>y[1] w[*]/Dp(1;Y)y[+]; Df(2R)pingpong, achi[pingpong]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8511
347.	<i>y[1] w[*]; Acf1[7]</i>	Alessandro Scacchetti (Börner <i>et al.</i> , 2016)
348.	<i>y[1] w[*]; Acf1[C]</i>	Alessandro Scacchetti (Börner <i>et al.</i> , 2016)
349.	<i>y[1] w[*]; al[ice]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59027
350.	<i>y[1] w[*]; amon[Q178st] e[*]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #29012

Nº	Genotipo	Origen
351.	<i>y[1] w[*]; Cam[n339]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6805
352.	<i>y[1] w[*]; Chi[e5.5]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4541
353.	<i>y[1] w[*]; D[87] P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B e[s]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36504
354.	<i>y[1] w[*]; ey[5.71]/In(4)ci[D], ci[D] pan[ciD] sv[spa-pol]</i>	BDSC Ref.: #26798
355.	<i>y[1] w[*]; fng[13] P{ry[+t7.2]=neoFRT}80B/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8552
356.	<i>y[1] w[*]; ftz-f1[ex7] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A P{w[+mC]=UAS-EcR.B1}3b/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #64303
357.	<i>y[1] w[*]; Mi{FlipFlop}Trim9[MI12525- FF.GT-mCh]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #77463
358.	<i>y[1] w[*]; Mi{PT-GFSTF.2}Cep135[MI02509- GFSTF.2]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #60183
359.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan- GAL4.0}CG13893[MI08480-TG4.0]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #67484
360.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan- GAL4.0}CG31663[MI09349-TG4.0]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76708
361.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan- GAL4.0}CG9098[MI14545-TG4.0]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76763
362.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan-GAL4.0}CIC- a[MI05423-TG4.0]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #66801
363.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan-GAL4.0}Tet[MI04973- TG4.0]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76666
364.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan- GAL4.1}CG15270[MI03816-TG4.1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76649
365.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan- GAL4.1}CG4328[MI11597-TG4.1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #66844
366.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan- GAL4.1}CG6225[MI15524-TG4.1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76769
367.	<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan-GAL4.2}twz[MI14153- TG4.2]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #76758
368.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}CG10737[MI14981]/C D</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59585
369.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}CG31365[MI06715]/T D</i>	Derivado de BDSC Ref.: #42169
370.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}CG3257[MI03957]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36948
371.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}CG3544[MI08969]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44842
372.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}DIP- gamma[MI03222]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #35928
373.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}dpr10[MI03557]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36996

Nº	Genotipo	Origen
374.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}MI08401a Mi{MIC}MI08401b CG14762[MI08401]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44774
375.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}Not1[MI07631]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44201
376.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}Ptx1[MI11305]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #56677
377.	<i>y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}side- VII[MI07150]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44177
378.	<i>y[1] w[*]; mnd[1] e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9000
379.	<i>y[1] w[*]; Mob4[EYDeltaL3]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #36331
380.	<i>y[1] w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D P{w[+mC]=lacW}Rpn8[k08003]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #23860
381.	<i>y[1] w[*]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B glo[162x]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #57693
382.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}Bem46[G5989]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #28472
383.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}COX5B[G5812]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #27189
384.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}Cpsf5[G19200]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #28422
385.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}Doc2[G4386]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #28466
386.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}mlt[G18151] KCNQ[G18151]</i>	BDSC Ref.: #27434
387.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=EP}Nmda1[G2954]</i>	BDSC Ref.: #27463
388.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}14-3- 3epsilon[j2B10]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12142
389.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}dco[j3B9]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12164
390.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}RhoGAP71E[j6B9]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12092
391.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}Uch- L5[j2B8]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12078
392.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=lacW}Vha55[j2E9]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12128
393.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS-Scop-dsx.M}2; dsx[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #55775
394.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS- YFP.Rab6}CG10082[01]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #23251
395.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS-Vha100-1.H}7.3; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B Vha100-1[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #39669
396.	<i>y[1] w[*]; P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 sha[1] Dg[086]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #63049
397.	<i>y[1] w[*]; P{y[+t7.7]=Mae- UAS.6.11}Ziff[LA00955]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #22199
398.	<i>y[1] w[*]; robo1[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #8755
399.	<i>y[1] w[*]; RpL38[45-72]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6974
400.	<i>y[1] w[*]; skl[e3]/TTG</i>	Derivado de BDSC Ref.: #44226
401.	<i>y[1] w[*]; skt[Delta20]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #39674
402.	<i>y[1] w[*]; smo[3] Mad[12] P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #51286
403.	<i>y[1] w[*]; Thor[2]</i>	BDSC Ref.: #9559

Nº	Genotipo	Origen
404.	<i>y[1] w[*]; trio[1] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A/TTG</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9129
405.	<i>y[1] w[1] ct[C145]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #6946
406.	<i>y[1] w[1] ff[1] run[3]/FM7c Kr-GFP</i>	Derivado de BDSC Ref.: #56499
407.	<i>y[1] w[1]; EcR[V559fs]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4901
408.	<i>y[1] w[1]; P{neoFRT}42D Asx[xen-72-3] P{w[+t*] ry[+t*]=white-un1}47A/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2290
409.	<i>y[1] w[1]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 cn[1] PBac{SAstopDsRed}Bap55[LL05955] bw[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #34495
410.	<i>y[1] w[1]; P{w[+mC]=lacW}64A vvl[M638] Diap1[1] st[1] cu[1] sr[1] e[s] ca[1]/TTG</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4387
411.	<i>y[1] w[1]; P{w[+t*] ry[+t*]=white-un1}70C rhea[1] P{neoFRT}80B/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #2296
412.	<i>y[1] w[1118]; Gcn5[Q186st] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A e[1]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #9334
413.	<i>y[1] w[1118]; P{w[+mC]=lacW}MRG15[j6A3]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10290
414.	<i>y[1] w[1118]; P{w[+mC]=lacW}Stt3B[j2D9]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10340
415.	<i>y[1] w[1118]; p53[5A-1-4]</i>	BDSC Ref.: #6815
416.	<i>y[1] w[1118]; PBac{w[+mC]=5HPw[+]}TTLL5[B093]</i>	BDSC Ref.: #16140
417.	<i>y[1] w[67c23] P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}DIP1[EY02625]</i>	BDSC Ref.: #15577
418.	<i>y[1] w[67c23] P{y[+t7.7]=Mae- UAS.6.11}CG6023[GG01584]</i>	BDSC Ref.: #13475
419.	<i>y[1] w[67c23]; barr[L305]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4402
420.	<i>y[1] w[67c23]; Lac[k11012b], P{w[+mC]=lacW} k11012a/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11010
421.	<i>y[1] w[67c23]; Lac[k11012b], P{w[+mC]=lacW}k11012a/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11010
422.	<i>y[1] w[67c23]; Mi{PT-GFSTF.1}beat- IIIc[MI03726-GFSTF.1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59810
423.	<i>y[1] w[67c23]; Mi{PT-GFSTF.1}Sam- S[MI08698-GFSTF.1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #63193
424.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG12163[EY04405]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #19914
425.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG3408[EY05084]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #16367
426.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4022[EY21401]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #22477
427.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4080[EY01375]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #15068
428.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG8298[EY23140]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #22607

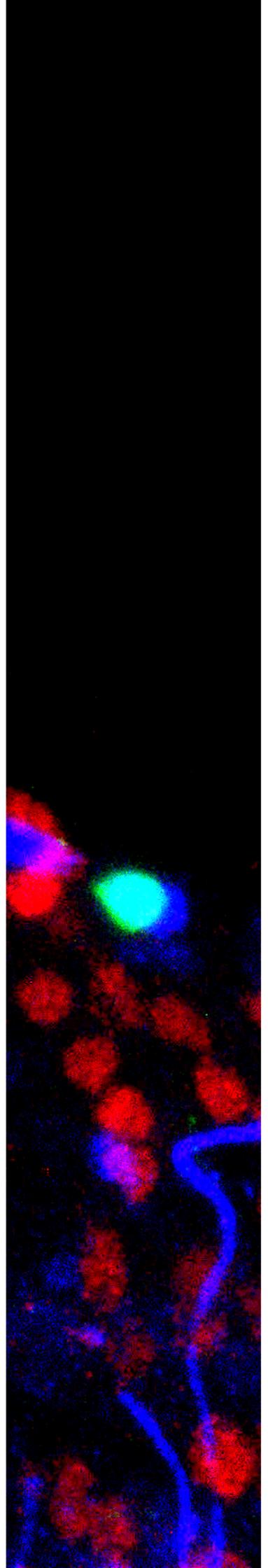
Nº	Genotipo	Origen
429.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG9175[EY11750]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #20329
430.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}gfzf[EY08448] CG2656[EY08448]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #17463
431.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}kay[EY01644]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #15077
432.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}mad2[EY21687]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #22495
433.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Mf[EY03476]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #20068
434.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Sep2[EY05856]</i>	BDSC Ref.: #16680
435.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Syx6[EY14508]</i>	BDSC Ref.: #20941
436.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Vha68-1[EY02923]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #16543
437.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Vps24[EY04708]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #15763
438.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}Btk29A[k00206]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10469
439.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}crol[k05205]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10386
440.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}Cyt-c-p[k13905]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11115
441.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}DCTN2-p50[k16109]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11159
442.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}Fpps[k06103]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10604
443.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}jing[k03404]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10378
444.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}lid[k06801]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10403
445.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}Lis-1[k13209]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11072
446.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}nrv2[k04223]/CD</i>	Derivado de DGRC Ref.: #102305
447.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}porin[k05123]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10563
448.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}prod[k08810]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10814
449.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}Reph[k16918]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11212
450.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}rgr[k02605]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10517
451.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}RnrL[k06709]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10644

Nº	Genotipo	Origen
452.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}RyR[k04913]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10559
453.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}TER94[k15502]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10454
454.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}trn[S064117]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #4550
455.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}Ubc2[k13206]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11071
456.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}vimar[k16722]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #11199
457.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}x16[k00230]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10472
458.	<i>y[1] w[67c23]; P{w[+mC]=lacW}zf30C[k02506]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #10513
459.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}babos[KG05061]</i>	BDSC Ref.: #13626
460.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}bin3[KG00599]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #13393
461.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG3967[KG05974] ry[506]</i>	BDSC Ref.: #14135
462.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG4452[KG02739] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #13228
463.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Fkbp12[KG00828]</i>	BDSC Ref.: #12959
464.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Mes2[KG02901] ry[506]</i>	BDSC Ref.: #13765
465.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}RPA2[KG00759]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #12907
466.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}SC35[KG02986]</i>	BDSC Ref.: #12904
467.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+t7.7] w[+mC]=wHy}TfIIB[DG14311]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #20415
468.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+t7.7] w[+mC]=wHy}Wdr33[DG23504]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #20470
469.	<i>y[1] w[67c23]; P{y[+t7.7]=Mae-UAS.6.11}Mst87F[DP01376]</i>	BDSC Ref.: #21844
470.	<i>y[1] w[67c23]; ry[506] P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}gb[KG07905]</i>	BDSC Ref.: #14670
471.	<i>y[1]/Dp(1;Y)y[+]; cn[1] mei-S332[1]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #671
472.	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG15141[KG06005]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #14465
473.	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG43066[KG03347]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #13949

Nº	Genotipo	Origen
474.	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}CG9705[KG07795] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #14656
475.	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Dreff[KG09294]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #15178
476.	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Klp68D[KG03849] ry[506]</i>	BDSC Ref.: #13511
477.	<i>y[1]; P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}Nf-YA[KG06786] ry[506]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #14501
478.	<i>y[1]; ry[506] P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P}ChAT[KG09028]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #15153
479.	<i>y[2] w[1] ct[6]; mod(mdg4)[T6] e[1]</i>	BDSC Ref.: #59961
480.	<i>y[2] w[1] ct[6]; su(Hw)[V]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #59959
481.	<i>y[d2] w[1118] P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2; P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D HPS4[W515X]/CD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #32063
482.	<i>y[d2] w[1118] P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2; P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B Dcr-1[Q1147X]/TD</i>	Derivado de BDSC Ref.: #32066
483.	<i>Yem[2]/TD</i>	Benjamin Loppin (Orsi <i>et al.</i> , 2013)
484.	<i>yw; Sfmbt[1] FRT40/CyO UbiqGFP</i>	Jürg Müller (Grimm <i>et al.</i> , 2009)
485.	<i>z[v77h] w[67c23]</i>	Derivado de BDSC Ref.: #1385



# ANEXO II





**Tabla 10. Relación de transcritos que presentan su expresión reducida significativamente en los embriones mutantes *Mcm5<sup>exc222</sup>* con respecto a los controles tras el análisis de los datos de la secuenciación de ARN.** Para todos ellos se indican los transcritos e isoformas (T), los genes correspondientes (I), los valores de RPKM de cada muestra (C: control; M: mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*), el enriquecimiento de lecturas (E) y el p-valor ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg (p-aj). Los transcritos aparecen ordenados de menor a mayor p-valor ajustado. Análisis realizado con DESeq2.

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG1056 0-RA	<i>5-HT2A</i>	2.74	0.60	2.72	0.00	15.80	0.23	-1.92	0.000
CG1120 5-RA	<i>CG4390 1</i>	5.59	11.08	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.57	0.000
CG1120 5-RB	<i>phr</i>	4.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.57	0.000
CG1131 5-RA	<i>Npc2g</i>	6.90	8.91	4.55	77.75	0.00	5.98	-1.65	0.000
CG1131 5-RB	<i>Npc2h</i>	0.00	0.00	77.63	74.62	0.00	0.00	-1.66	0.000
CG1177 7-RA	<i>CG1177 7</i>	0.00	38.60	0.00	20.03	5.48	5.00	-1.20	0.000
CG1227 -RA	<i>CG1227 9</i>	7.11	0.00	5.58	0.10	22.16	4.32	-3.18	0.000
CG1331 -RA	<i>CG1331 9</i>	5.74	4.86	11.07	0.91	0.35	0.66	-1.84	0.000
CG1351 2-RA	<i>CG4256 6</i>	4.95	10.00	12.85	100.8	377.8	516.5	-1.40	0.000
CG1367 5-RC	<i>CG1367 4</i>	25.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.11	0.000
CG1369 4-RA	<i>CG1369 4</i>	5.54	5.22	26.87	1.95	17.62	2.32	-1.55	0.000
CG1370 7-RA	<i>CG1370 7</i>	14.04	0.78	6.48	9.00	3.55	5.36	-1.59	0.000
CG1410 0-RA	<i>waw</i>	7.03	17.45	14.17	19.69	13.66	10.64	-1.88	0.000
CG1410 -RA	<i>CG1410 9</i>	1.26	7.04	5.94	7.47	0.34	0.74	-1.26	0.000
CG1414 2-RB	<i>CG1414 1</i>	1.36	0.00	0.00	2.74	0.00	0.00	-2.15	0.000
CG1414 2-RC	<i>CG1414 2</i>	0.00	17.07	5.27	3.76	3.12	0.00	-2.12	0.000
CG1414 2-RD	<i>CG1414 2</i>	0.29	0.00	10.35	10.87	5.13	0.10	-2.12	0.000
CG1414 7-RA	<i>Blos2</i>	224.0	2.78	229.9	9.74	0.00	117.4	-1.16	0.000
CG1414 -RC	<i>Blos4</i>	15.17	0.00	0.00	0.00	4.41	4.32	-1.29	0.000
CG1569 9-RA	<i>RpS30</i>	5.98	9.63	5.17	4.99	22.92	0.00	-2.07	0.000
CG1692 8-RA	<i>CG1692 6</i>	9.93	0.00	0.00	4.39	0.00	3.28	-2.59	0.000

Anexo II

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG1725 -RC	<i>dlg1</i>	0.00	13.97	6.67	0.00	119.3 8	5.96	-1.09	0.000
CG1827 8-RA	<i>slx1</i>	3.89	3.82	0.00	0.00	0.59	0.00	-2.05	0.000
CG1829 4-RA	<i>CDK2AP 1</i>	81.57	0.00	0.00	19.71	12.45	50.85	-3.04	0.000
CG1881 4-RA	<i>CG1881 4</i>	4.93	100.5 5	185.4 8	127.5 0	7.69	10.59	-2.53	0.000
CG2044 -RA	<i>Lcp4</i>	24.96	1.00	3.49	7.97	4.67	4.55	-2.21	0.000
CG3132 -RA	<i>CG3132 7</i>	27.43	1.48	3.66	0.00	2.31	5.37	-1.81	0.000
CG3144 9-RA	<i>Hsp70B a</i>	70.27	88.05	68.84	294.7	135.4	56.67	-2.41	0.000
CG3166 6-RA	<i>wry</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.97	0.000
CG3166 6-RB	<i>wry</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.98	0.000
CG3166 6-RC	<i>chinmo</i>	0.00	0.00	0.00	12.97	4.13	0.00	-0.97	0.000
CG3166 6-RD	<i>chinmo</i>	97.14	100.1	89.90	35.15	27.34	33.15	-1.14	0.000
CG3167 6-RA	<i>CG3167 4</i>	37.53	48.24	40.61	10.80	0.07	14.78	-1.74	0.000
CG3220 1-RB	<i>CG3220 1</i>	0.52	0.07	106.1 6	99.83	111.8 5	100.6 1	-1.82	0.000
CG3247 5-RA	<i>mthl8</i>	8.18	9.30	4.14	0.01	0.02	0.00	-4.75	0.000
CG3256 8-RA	<i>CG3256 8</i>	1.78	17.19	5.19	3.67	0.20	3.05	-1.62	0.000
CG3474 -RA	<i>GD2200 5</i>	11.44	12.72	17.34	12.38	94.68	81.57	-2.81	0.000
CG3973 -RA	<i>pigs</i>	12.21	15.36	46.30	27.61	39.58	2.72	-1.40	0.000
CG4030 5-RB	<i>37834</i>	11.94	9.93	12.69	2.56	2.41	2.65	-1.90	0.000
CG4129 7-RA	<i>CG4129 7</i>	118.4	105.5	87.09	0.00	6.69	10.08	-4.21	0.000
CG4232 9-RA	<i>CG4232 9</i>	4.00	3.85	3.79	0.35	0.10	2.30	-3.22	0.000
CG5039 -RA	<i>CG5039</i>	14.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.28	0.000
CG5075 -RA	<i>Vha68- 3</i>	0.17	0.06	0.15	0.12	0.08	0.10	-2.67	0.000
CG5126 -RA	<i>CG5126</i>	6.04	143.0	74.93	213.8	43.68	59.73	-1.11	0.000
CG5621 -RA	<i>Grik</i>	0.42	0.40	0.26	0.07	0.00	0.00	-1.87	0.000
CG5621 -RB	<i>Grik</i>	0.00	0.56	0.15	0.00	0.02	0.08	-1.89	0.000

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG5828 -RA	<i>CG5828</i>	22.47	16.58	316.9	13.08	9.10	263.0	-1.28	0.000
CG7642 -RA	<i>ry</i>	4.48	4.84	0.72	2.21	0.89	1.13	-1.80	0.000
CG7811 -RA	<i>b</i>	2.02	2.11	54.04	8.98	2.97	0.00	-1.72	0.000
CG8533 -RA	<i>Ir76a</i>	0.55	1.58	0.53	2.60	0.00	0.12	-2.33	0.000
CG8533 -RB	<i>Ir76a</i>	0.00	0.00	0.00	19.51	0.06	0.00	-2.33	0.000
CG8533 -RC	<i>Ir76a</i>	0.83	16.90	0.98	28.07	28.55	1.22	-2.30	0.000
CG8533 -RD	<i>Ir76a</i>	0.00	0.00	0.00	304.6	10.39	0.00	-2.33	0.000
CG9656 -RA	<i>grn</i>	15.37	8.52	5.44	6.14	0.00	5.79	-1.36	0.000
CG9656 -RB	<i>grn</i>	5.30	6.53	8.82	0.00	3.06	0.00	-1.37	0.000
CG9822 -RA	<i>CG9822</i>	1.74	0.00	0.80	0.00	0.00	0.00	-2.10	0.000
CG9906 -RA	<i>Cnx14D</i>	0.69	23.34	9.89	0.00	11.27	1.65	-1.99	0.000
CG1306 5-RA	<i>CG1306 5</i>	1.31	1.10	0.75	0.14	0.00	0.15	-1.66	0.001
CG1458 1-RA	<i>Cisd2</i>	5.02	2.96	0.00	80.23	0.00	120.3	-1.56	0.001
CG1493 4-RA	<i>Mal-B1</i>	1.86	1.20	2.53	0.15	0.34	0.45	-1.54	0.001
CG1725 -RI	<i>GABPI</i>	0.00	13.18	7.05	0.00	0.00	2.64	-0.94	0.001
CG1725 -RJ	<i>GABPI</i>	0.00	0.00	3.53	0.00	0.00	3.79	-0.93	0.001
CG3001 8-RC	<i>CG3001 7</i>	0.92	5.22	9.41	7.02	0.00	5.01	-1.64	0.001
CG4373 -RA	<i>Cyp6d2</i>	11.62	20.55	34.72	17.85	1.34	2.42	-1.33	0.001
CG5397 -RA	<i>CG5397</i>	9.43	14.75	6.73	2.34	0.00	0.04	-1.40	0.001
CG6289 -RA	<i>GD1487 5</i>	1.06	0.00	7.70	6.88	0.82	146.4	-1.55	0.001
CG7496 -RA	<i>PGRP- SD</i>	26.36	25.61	0.00	1.69	0.89	0.83	-1.18	0.001
CG9050 -RA	<i>psd</i>	1.82	10.19	0.70	0.38	0.00	0.00	-1.57	0.001
CG1146 -RA	<i>CG1146 2</i>	6.66	9.27	5.27	14.75	1.94	1.56	-1.24	0.002
CG1146 -RB	<i>GA2676 0</i>	2.88	5.93	2.09	16.17	0.98	0.82	-1.22	0.002
CG1146 -RC	<i>GA2676 0</i>	2.56	8.38	6.66	12.76	0.65	3.41	-1.22	0.002

Anexo II

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG1157 0-RA	<i>Osi15</i>	1.69	1.93	11.14	1.46	13.85	8.31	-1.49	0.002
CG1473 6-RA	<i>CG1473 6</i>	0.03	0.00	0.00	590.3 9	3.94	3.65	-1.52	0.002
CG1473 6-RB	<i>CG1473 6</i>	0.00	0.27	1.76	2.92	0.00	0.00	-1.52	0.002
CG1473 6-RC	<i>CG1473 6</i>	0.17	0.00	0.03	8.90	5.34	5.03	-1.52	0.002
CG1592 7-RA	<i>CG1592 7</i>	8.89	5.53	6.75	2.51	2.79	2.56	-1.29	0.002
CG1092 -RA	<i>CG1092 7</i>	14.05	18.50	14.81	85.61	0.00	4.06	-1.09	0.003
CG1292 0-RA	<i>CG1292 0</i>	16.79	1.02	21.43	32.99	13.14	3.75	-0.99	0.003
CG1546 4-RB	<i>jb</i>	10.95	11.81	4.87	2.75	3.75	3.05	-1.03	0.003
CG7497 -RB	<i>CG7497</i>	1.51	1.90	2.23	0.66	0.57	0.63	-1.19	0.003
CG1092 -RB	<i>CG1092 8</i>	19.56	15.97	25.10	0.53	58.71	12.70	-1.07	0.004
CG1360 6-RA	<i>CG1360 5</i>	41.57	2.03	2.37	27.49	1.20	1.35	-0.80	0.004
CG1373 7-RB	<i>CG1373 7</i>	0.00	5.36	0.00	0.00	1.66	0.72	-0.91	0.004
CG1429 8-RA	<i>Gj14185</i>	18.63	14.40	0.00	3.53	0.35	0.00	-1.31	0.004
CG6045 -RA	<i>AOX3</i>	3.80	0.00	0.17	0.14	48.66	34.05	-1.05	0.004
CG1373 7-RA	<i>CG1373 3</i>	77.20	0.00	79.82	69.01	0.21	3.96	-0.89	0.005
CG1451 5-RA	<i>GD2142 8</i>	27.08	34.26	20.01	2.02	2.10	16.75	-0.93	0.005
CG1464 0-RA	<i>ey</i>	144.3	0.14	138.6	131.9	35.64	0.00	-0.76	0.005
CG1943 -RA	<i>CG1943</i>	45.63	73.28	80.00	63.12	22.41	0.00	-0.89	0.005
CG1943 -RB	<i>CG1943</i>	0.00	72.90	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.90	0.005
CG1943 -RC	<i>CG1943</i>	42.92	0.00	36.86	20.13	19.77	0.00	-0.90	0.005
CG3145 1-RA	<i>lncRNA: CR3145</i>	121.4	137.5	111.4	33.08	29.15	25.88	-0.93	0.005
CG7169 -RA	<i>S1P</i>	6.97	1.27	60.68	3.16	0.84	0.00	-1.01	0.005
CG1644 -RA	<i>Cyp6t1</i>	2.16	49.28	1.55	53.39	0.23	29.49	-1.35	0.006
CG6131 -RA	<i>Cpr97E a</i>	15.18	16.48	0.53	0.39	4.44	0.30	-0.81	0.006
CG6503 -RA	<i>CG6503</i>	17.83	22.34	16.50	12.09	12.53	8.47	-1.24	0.006

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG3135 8-RA	<i>CG3135</i> 7	0.19	8.42	0.04	1.25	281.6	7.06	-1.35	0.007
CG9186 -RA	<i>CG9186</i>	33.69	32.19	35.40	24.96	12.99	18.63	-0.82	0.007
CG9186 -RB	<i>CG9186</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.82	0.007
CG6967 -RC	<i>CG6967</i>	0.00	0.00	13.83	3.76	8.21	0.00	-1.13	0.008
CG6967 -RD	<i>CG6967</i>	0.00	0.00	6.32	9.21	0.00	0.00	-1.13	0.008
CG1561 7-RA	<i>CG1561</i> 5	0.54	0.44	0.16	0.47	0.00	0.00	-1.38	0.009
CG1425 4-RA	<i>TwdlC</i>	116.1	18.78	138.5	101.7	0.16	1.10	-1.04	0.012
CG3224 3-RA	<i>NT1</i>	10.65	10.42	0.07	11.13	3.13	0.00	-0.92	0.012
CG4125 7-RA	<i>CG4125</i> 5	2.63	42.23	0.00	14.56	0.00	0.00	-1.35	0.012
CG1456 7-RA	<i>CG1456</i> 7	11.63	16.97	19.78	153.0	443.1	7.72	-0.97	0.013
CG1546 5-RA	<i>CG1546</i> 1	8.32	11.66	0.03	0.02	0.00	0.02	-0.93	0.013
CG1039 1-RA	<i>Cyp310</i> <i>a1</i>	5.31	4.94	8.51	5.38	7.49	5.11	-1.04	0.014
CG1588 4-RA	<i>Cpr97E</i> <i>b</i>	11.01	15.91	18.81	1.82	0.70	0.30	-1.04	0.014
CG3203 7-RA	<i>Argk</i>	13.89	16.78	14.33	14.79	1.63	2.51	-0.89	0.014
CG3242 3-RD	<i>shep</i>	11.46	9.60	10.05	4.52	4.50	4.30	-0.76	0.014
CG7352 -RA	<i>CG7352</i>	1.07	16.95	5.46	6.39	2.02	28.41	-1.32	0.014
CG3133 7-RA	<i>CG3133</i> 7	31.86	0.00	0.00	0.00	17.01	15.62	-1.04	0.015
CG3327 6-RB	<i>Pura</i>	1.16	0.94	2.11	0.30	0.82	2.15	-1.33	0.015
CG4793 -RC	<i>CG4793</i>	0.19	0.26	0.40	0.03	0.05	0.01	-1.33	0.015
CG6300 -RA	<i>CG6300</i>	13.76	6.03	1.84	9.57	3.23	3.68	-0.79	0.015
CG1333 7-RA	<i>CG4280</i> 8	1.87	8.57	1.57	0.36	0.09	0.36	-1.23	0.017
CG2321 -RA	<i>CG2321</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.00	0.017
CG8642 -RA	<i>CG8642</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.19	0.017
CG9792 -RA	<i>yellow-e</i>	5.67	5.01	6.08	0.43	2.04	0.32	-0.88	0.017
CG6912 -RA	<i>CG6912</i>	40.82	39.07	50.28	8.66	286.7	20.69	-0.88	0.018

Anexo II

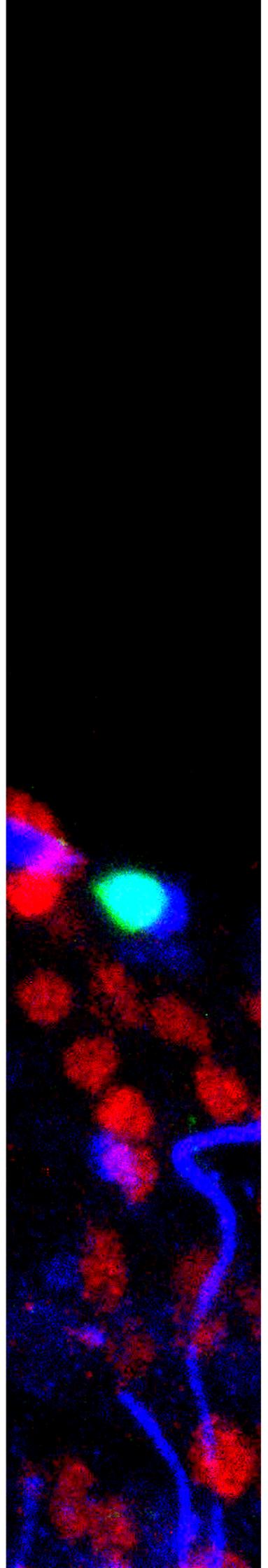
T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG8708 -RA	<i>CG8708</i>	3.52	97.07	17.73	6.64	55.25	0.00	-0.99	0.018
CG8708 -RB	<i>CG8708</i>	21.31	19.79	31.42	1.37	11.83	53.31	-0.99	0.018
CG1521 2-RA	<i>CG1521 2</i>	754.4	12.05	880.7	5.43	299.5	4.12	-0.90	0.019
CG4049 8-RD	<i>CG4049 8</i>	41.12	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	-0.96	0.019
CG1137 -RA	<i>CG1137 9</i>	0.88	0.99	0.82	8.76	38.19	0.00	-1.24	0.021
CG1464 3-RA	<i>TwdIV</i>	135.4	471.8	602.6	4.43	0.00	95.03	-0.74	0.021
CG1176 0-RA	<i>Obp84a</i>	23.22	2.50	0.11	0.00	0.11	1.28	-0.77	0.022
CG1453 4-RA	<i>Klp10A</i>	78.63	66.42	72.59	15.00	15.14	9.14	-0.97	0.023
CG1176 0-RB	<i>Obp84a</i>	3.26	0.82	0.81	0.11	4.62	13.58	-0.78	0.025
CG1289 1-RB	<i>whd</i>	34.21	25.36	31.37	71.31	21.68	20.52	-0.81	0.025
CG1445 7-RB	<i>CG1445 7</i>	1.92	0.00	21.34	13.58	209.4	205.5	-0.93	0.025
CG3242 3-RA	<i>sob</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.75	0.025
CG9757 -RA	<i>CG9757</i>	151.1	314.6	339.9	93.23	326.1	173.4	-0.93	0.025
CG1124 9-RA	<i>CG1124 8</i>	0.00	10.62	4.85	5.67	2.43	5.11	-1.10	0.026
CG1150 -RA	<i>Pbp49</i>	3.07	50.92	4.65	0.00	0.00	0.00	-1.09	0.026
CG1289 1-RA	<i>whd</i>	18.00	53.07	19.53	573.3	2.07	3.14	-0.81	0.026
CG1323 2-RA	<i>BBS4</i>	0.63	1.24	1.22	1.61	2.80	0.32	-1.19	0.026
CG1327 -RA	<i>Cyt-b5-r</i>	179.5	257.2	178.3	174.2	48.13	78.46	-1.03	0.026
CG1445 7-RA	<i>CG1445 7</i>	9.51	7.63	0.00	0.00	22.41	0.64	-0.91	0.026
CG3005 9-RA	<i>CG3005 9</i>	3.34	3.24	0.00	40.80	24.48	0.93	-1.11	0.026
CG3242 3-RB	<i>shep</i>	0.00	0.00	0.00	5.74	0.00	0.00	-0.74	0.026
CG3301 3-RC	<i>CG3301 2</i>	0.61	0.38	0.73	0.00	2.68	0.79	-1.24	0.028
CG2781 -RA	<i>ELOVL</i>	124.2	25.11	5.88	24.68	18.10	15.85	-0.87	0.029
CG6836 -RA	<i>CG6836</i>	14.58	3.61	13.69	13.52	2.68	0.00	-0.88	0.029
CG2360 -RA	<i>Ccp84A a</i>	111.7	98.97	159.7	0.14	0.00	80.50	-0.95	0.030

Anexo II

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG7303 -RA	<i>Gr68a</i>	0.41	0.51	6.37	0.07	7.19	0.03	-1.23	0.030
CG1570 7-RA	<i>krimp</i>	0.45	0.00	2.02	0.15	0.20	0.00	-1.24	0.031
CG1423 9-RB	<i>ppk15</i>	0.17	0.03	0.18	0.21	0.00	0.00	-1.17	0.032
CG6871 -RA	<i>Cat</i>	51.36	0.00	75.44	3.36	2.02	31.39	-0.73	0.032
CG3242 3-RC	<i>shep</i>	37.67	32.47	50.50	30.29	16.56	18.42	-0.72	0.033
CG3405 7-RA	<i>CG3405</i> 7	0.40	15.31	0.47	0.99	3.76	0.00	-1.20	0.033
CG3405 7-RB	<i>CG3405</i> 7	2.41	1.91	1.95	16.14	0.00	0.19	-1.20	0.033
CG1477 0-RA	<i>CG1477</i> 0	32.65	31.39	35.68	6.30	4.71	23.48	-0.84	0.035
CG5792 -RA	<i>Pih1D1</i>	13.11	9.70	0.11	13.13	10.22	8.45	-0.75	0.035
CG6654 -RA	<i>CG6654</i>	6.48	8.31	6.68	5.23	0.00	3.19	-0.80	0.035
CG3975 -RA	<i>Pol32</i>	3.70	0.00	0.00	0.00	1.61	0.00	-0.69	0.039
CG7149 -RA	<i>CG7149</i>	25.14	4.51	21.40	24.96	0.00	25.64	-0.74	0.040
CG1810 8-RA	<i>CG1810</i> 7	70.56	13.01	57.76	107.8	6.43	5.68	-1.16	0.042
CG5036 -RA	<i>Dhit</i>	23.30	27.13	29.41	2.62	1.21	2.98	-0.64	0.042
CG7076 -RA	<i>Cpr66C</i> b	70.92	52.16	52.99	45.55	0.00	9.29	-0.92	0.042
CG3171 0-RA	<i>Tre1</i>	33.10	0.00	29.96	11.09	0.16	603.9	-0.88	0.043
CG1410 2-RA	<i>ms(3)76</i> Ca	0.00	0.00	0.00	4.82	26.98	0.00	-1.13	0.044
CG8804 -RA	<i>wun</i>	33.60	39.14	42.92	45.30	159.9	42.12	-0.66	0.044
CG1053 7-RC	<i>Rdl</i>	7.78	0.00	11.41	0.00	31.75	0.00	-0.72	0.045
CG2150 -RA	<i>CG2150</i>	170.0	0.00	197.4	0.00	6.88	110.7	-0.99	0.046
CG1327 1-RA	<i>Ugt37C</i> 2	0.44	0.60	17.77	14.12	11.81	10.54	-1.18	0.047
CG4128 -RF	<i>CG4128</i> 7	8.15	5.97	8.35	0.00	0.00	0.00	-0.63	0.047
CG1836 8-RA	<i>CG1836</i> 8	0.78	0.01	0.64	0.00	0.00	0.20	-1.07	0.048
CG1210 8-RA	<i>Pdk1</i>	0.00	0.00	19.78	4.97	19.67	18.19	-0.95	0.049
CG1424 3-RA	<i>TwdlS</i>	841.7	0.00	6.56	4.93	1.94	1.79	-0.84	0.049



# ANEXO III





**Tabla 11. Relación de transcritos que presentan su expresión aumentada significativamente en los embriones mutantes *Mcm5<sup>exc222</sup>* con respecto a los controles tras el análisis de los datos de la secuenciación de ARN.** Para todos ellos se indican los transcritos e isoformas (T), los genes correspondientes (I), los valores de RPKM de cada muestra (C: control; M: mutante *Mcm5<sup>exc222</sup>*), el enriquecimiento de lecturas (E) y el p-valor ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg (p-aj). Los transcritos aparecen ordenados de menor a mayor p-valor ajustado. Análisis realizado con DESeq2.

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG101 81-RA	<i>Mdr65</i>	8.61	7.02	10.97	14.72	28.54	6.82	0.99	0.028
CG101 86-RA	<i>Hasp</i>	2.51	0.00	0.00	0.00	0.29	15.27	0.83	0.029
CG101 86-RC	<i>Hasp</i>	0.44	0.00	2.90	0.00	6.66	8.36	0.83	0.029
CG101 86-RE	<i>Hasp</i>	0.00	156.8	0.00	254.2	2.65	0.68	0.83	0.029
CG101 86-RF	<i>Hasp</i>	0.00	0.00	23.50	0.00	6.42	0.59	0.83	0.029
CG101 89-RA	<i>CG10189</i>	4.83	3.16	1.78	43.13	1.76	1.44	1.16	0.001
CG103 53-RC	<i>CG10353</i>	18.55	13.70	8.94	230.6	3.94	4.48	1.13	0.000
CG103 53-RD	<i>CG10353</i>	5.24	6.66	8.69	0.00	24.59	1.83	1.15	0.000
CG103 63-RA	<i>Tep4</i>	5.40	0.58	0.31	0.00	3.35	2.63	1.30	0.005
CG105 29-RA	<i>Lcp65Ae</i>	4.42	49.19	3.60	5.85	15.41	388.3	1.29	0.013
CG106 21-RA	<i>CG10621</i>	64.57	63.11	105.9	159.9	4.04	177.0	0.95	0.011
CG106 30-RA	<i>Itp-r83A</i>	1.45	8.18	14.20	2.46	54.82	7.00	1.61	0.000
CG106 59-RA	<i>Hf</i>	1.18	250.8	2.21	299.5	4.25	0.56	1.87	0.000
CG108 12-RA	<i>eIF4G1</i>	51.31	32.36	1.15	1.24	0.00	1.05	2.38	0.000
CG108 27-RA	<i>Ice2</i>	9.12	4.24	20.87	16.41	59.88	0.00	1.16	0.048
CG108 6-RA	<i>orb</i>	0.80	1.70	1.64	2.45	2.10	0.00	0.78	0.045
CG110 34-RA	<i>CG11030</i>	6.19	0.08	191.7	16.95	202.7	0.00	1.20	0.000
CG112 82-RA	<i>trn</i>	0.00	0.00	4.27	12.49	8.72	5.81	0.78	0.015
CG112 82-RB	<i>snky</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.78	0.015
CG114 04-RA	<i>Trxr-2</i>	0.00	0.00	19.82	168.2	16.91	16.20	2.24	0.000
CG116 50-RA	<i>LysS</i>	5.59	0.67	9.68	17.54	867.7	7.75	1.59	0.001

Anexo III

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG116 56-RA	<i>CG11655</i>	0.37	0.28	0.42	1.38	10.69	2.36	2.02	0.000
CG116 68-RA	<i>CG11668</i>	0.66	0.45	0.20	0.00	0.06	0.21	1.19	0.014
CG118 91-RE	<i>CG11891</i>	0.00	0.59	0.00	3.00	0.00	1.28	1.29	0.009
CG118 93-RA	<i>CG11893</i>	1.59	1.40	1.86	23.96	41.60	43.32	3.04	0.000
CG125 02-RB	<i>Sec23</i>	0.75	2.15	2.90	2.39	2.59	0.32	1.06	0.019
CG125 05-RA	<i>Or56a</i>	46.37	11.51	10.03	1.50	0.00	0.17	0.93	0.043
CG128 39-RA	<i>Tsp42En</i>	20.46	75.88	28.24	28.42	80.69	31.19	1.07	0.021
CG128 68-RA	<i>CG12868</i>	58.29	21.51	2.52	1.08	18.82	266.4	1.35	0.001
CG129 05-RA	<i>Obp46a</i>	0.12	1.86	3.81	1.92	2.93	15.84	1.22	0.032
CG132 27-RA	<i>Or47a</i>	64.04	0.00	75.98	0.36	305.3	162.3	1.06	0.026
CG132 28-RA	<i>CG13226</i>	5.78	16.41	16.63	0.00	8.03	11.32	1.19	0.032
CG137 93-RA	<i>CG13793</i>	0.14	0.92	0.06	7.88	2.93	0.02	1.38	0.009
CG137 94-RA	<i>CG13794</i>	1.30	1.71	0.16	12.15	9.68	2.49	1.00	0.049
CG138 97-RA	<i>CG13895</i>	0.52	1.01	2.80	4.70	2.82	5.19	1.05	0.049
CG140 24-RA	<i>Ncoa6</i>	2.62	0.96	2.99	8.85	0.74	0.00	1.69	0.000
CG142 4-RA	<i>CG14247</i>	1.85	1.38	45.80	0.82	0.00	0.22	1.28	0.000
CG142 92-RA	<i>Mef2</i>	34.17	23.13	91.15	120.5	8.97	7.30	1.13	0.041
CG145 65-RA	<i>CG14565</i>	102.3	113.9	150.4	163.2	1.86	4.00	1.10	0.043
CG145 72-RA	<i>CG14572</i>	31.69	164.4	60.52	64.34	227.7	164.3	1.31	0.010
CG146 70-RA	<i>Syx16</i>	4.20	0.97	0.00	31.58	0.00	0.00	0.78	0.033
CG146 95-RA	<i>CG14693</i>	0.65	17.13	32.46	50.12	10.27	46.20	1.23	0.024
CG153 25-RA	<i>Ir7c</i>	0.06	0.00	0.01	70.38	22.95	0.00	3.07	0.000
CG153 33-RA	<i>CG15333</i>	0.00	0.12	5.06	167.1	0.00	8.01	1.20	0.035
CG154 27-RA	<i>CG15425</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	1.97	0.00	1.08	0.009
CG154 27-RC	<i>tutl</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	3.72	1.45	1.08	0.004

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG154 27-RE	<i>tutl</i>	0.00	11.54	6.56	0.00	0.00	0.00	1.01	0.012
CG154 3-RB	<i>CG15439</i>	0.77	1.26	17.21	97.42	5.43	4.94	0.95	0.026
CG154 4-RA	<i>CG15445</i>	4.92	1.56	5.19	15.51	13.78	9.54	0.73	0.035
CG154 4-RB	<i>CG15446</i>	5.09	9.54	9.44	4.38	3.28	8.77	0.72	0.044
CG154 4-RC	<i>CG15449</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72	0.044
CG155 70-RA	<i>CG15570</i>	0.03	0.00	0.05	0.05	0.00	0.20	1.61	0.001
CG156 24-RA	<i>hoe2</i>	2.13	2.48	0.00	0.17	0.00	0.00	1.14	0.003
CG156 24-RC	<i>hoe2</i>	0.00	0.00	0.00	33.69	0.00	19.32	1.10	0.007
CG167 75-RB	<i>CG16772</i>	0.46	0.23	2.15	1.27	0.00	0.00	1.18	0.042
CG169 65-RA	<i>CG16964</i>	0.31	0.16	0.77	4.16	0.67	0.00	1.31	0.016
CG169 71-RC	<i>rho-4</i>	0.00	37.88	0.00	111.4	119.6	79.64	0.86	0.050
CG169 78-RA	<i>Sfmbt</i>	0.13	0.00	10.59	5.55	0.00	11.18	1.44	0.005
CG169 97-RA	<i>Phae2</i>	1.98	1.21	5.17	3.78	5.48	24.39	1.33	0.013
CG170 05-RB	<i>CG17005</i>	0.04	0.00	67.16	0.00	0.00	0.00	1.32	0.013
CG173 29-RA	<i>CG17327</i>	0.32	0.25	0.52	4.35	1.74	0.17	1.71	0.000
CG173 86-RA	<i>CG17385</i>	1.72	2.38	60.27	4.48	3.23	0.14	0.94	0.032
CG175 31-RA	<i>Cbs</i>	37.30	147.4	13.36	21.57	162.2	22.82	1.24	0.000
CG176 69-RA	<i>CG17669</i>	0.73	28.79	22.73	19.91	5.95	16.71	1.13	0.006
CG178 20-RA	<i>Uba1</i>	0.27	0.00	0.20	0.00	2.24	0.00	1.79	0.000
CG180 96-RA	<i>CG18095</i>	0.03	0.02	0.07	0.49	0.00	0.24	1.46	0.005
CG181 11-RA	<i>Obp99a</i>	122.2	97.39	257.6	421.1	0.00	0.00	1.20	0.010
CG181 56-RA	<i>CG1815</i>	1.31	1.04	18.12	88.61	43.31	11.94	1.79	0.000
CG183 49-RA	<i>Cpr67Fa2</i>	82.00	42.99	23.51	0.00	0.00	20.44	1.31	0.012
CG184 10-RA	<i>Tango10</i>	47.81	0.00	3.75	0.00	0.00	0.00	1.03	0.018
CG184 90-RB	<i>run</i>	0.80	0.47	0.71	13.23	0.00	0.00	0.76	0.019

Anexo III

<b>T</b>	<b>Gen</b>	<b>RPKM C_1</b>	<b>RPKM C_2</b>	<b>RPKM C_3</b>	<b>RPKM M_1</b>	<b>RPKM M_2</b>	<b>RPKM M_3</b>	<b>E</b>	<b>p-aj</b>
CG184 90-RC	<i>CG42671</i>	2.90	0.00	0.00	0.00	2.03	5.08	0.76	0.019
CG185 84-RA	<i>koi</i>	12.06	11.63	12.54	24.73	20.44	14.66	0.72	0.050
CG196 6-RA	<i>Acf</i>	1.57	1.20	3.62	15.05	0.00	8.15	1.11	0.018
CG197 9-RA	<i>CG1979</i>	0.28	0.29	0.48	17.40	0.00	1.00	1.38	0.000
CG223 3-RA	<i>CG2233</i>	44.27	37.29	10.70	0.00	11.96	11.96	1.08	0.004
CG249 3-RA	<i>CG2493</i>	7.68	0.00	13.27	27.96	0.00	20.50	1.11	0.001
CG277 2-RA	<i>CG2772</i>	1.16	0.63	3.54	3.03	2.35	9.32	1.27	0.025
CG289 9-RA	<i>ksr</i>	6.23	9.50	0.00	12.40	0.00	0.00	2.19	0.000
CG297 6-RA	<i>Fnta</i>	9.42	8.64	36.40	0.00	17.36	23.59	1.27	0.007
CG300 91-RA	<i>CG3009</i>	0.61	0.22	0.89	2.08	7.39	9.36	1.31	0.008
CG301 97-RA	<i>CG44253</i>	51.42	1.26	60.74	3.99	8.75	2.23	1.15	0.029
CG302 72-RA	<i>CG30271</i>	4.10	1.50	0.21	0.23	0.08	0.74	1.22	0.024
CG302 85-RA	<i>CG30284</i>	1.73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.41	0.001
CG311 57-RB	<i>CG31157</i>	0.34	9.79	0.20	13.14	13.75	2.83	1.83	0.000
CG313 32-RA	<i>Unc-115b</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	5.21	6.42	1.33	0.000
CG313 32-RB	<i>Unc-115b</i>	0.00	55.63	6.36	0.34	6.16	4.16	1.33	0.000
CG313 32-RC	<i>Unc-115b</i>	11.24	0.00	14.42	12.99	0.35	0.64	1.33	0.000
CG313 32-RD	<i>Unc-115b</i>	33.95	0.00	0.00	29.68	0.66	84.99	1.33	0.000
CG313 59-RA	<i>CG31358</i>	88.22	111.7	89.89	1.99	1.66	2.44	1.19	0.028
CG316 28-RB	<i>Gart</i>	0.00	0.00	12.47	0.00	9.94	16.44	0.84	0.012
CG316 91-RA	<i>CG31690</i>	0.98	0.59	6.21	7.25	2.73	2.80	1.79	0.000
CG317 05-RA	<i>CG31705</i>	4.27	3.38	0.00	22.56	0.00	0.00	1.42	0.000
CG317 05-RB	<i>CG31705</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.42	0.000
CG317 05-RC	<i>CG31705</i>	13.60	12.69	0.00	67.49	0.00	0.00	1.42	0.000
CG317 83-RA	<i>CR43671</i>	1.07	0.92	1.39	0.00	0.25	5.30	2.09	0.000

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG320 0-RA	<i>CG32006</i>	7.51	9.67	6.66	26.23	30.46	4.15	1.04	0.022
CG321 58-RC	<i>CG42514</i>	0.00	0.00	0.00	8.01	0.00	0.00	1.11	0.011
CG321 58-RD	<i>CG42514</i>	1.63	0.00	11.07	0.00	15.56	16.22	1.04	0.021
CG321 58-RE	<i>CG42514</i>	8.63	5.66	5.36	0.00	12.73	11.21	1.11	0.011
CG321 95-RA	<i>CG32193</i>	6.60	1.11	0.00	0.00	0.99	0.00	1.10	0.020
CG323 52-RA	<i>CG43078</i>	2.99	0.00	5.29	1.83	2.85	0.00	0.93	0.005
CG323 52-RB	<i>CG43078</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.60	0.95	0.004
CG323 52-RC	<i>CG43078</i>	1.74	0.00	0.00	0.00	0.00	6.20	0.94	0.005
CG323 52-RD	<i>CG43078</i>	0.67	0.00	1.04	60.73	32.51	1.07	0.95	0.005
CG323 53-RA	<i>CG43078</i>	0.18	0.13	0.17	0.00	1.94	0.55	1.28	0.013
CG324 62-RA	<i>CG32461</i>	0.00	0.09	2.67	0.00	11.41	0.00	2.08	0.000
CG324 64-RD	<i>mtd</i>	0.00	0.00	11.58	10.25	8.08	1.09	0.92	0.025
CG326 50-RA	<i>Eb1</i>	0.09	0.03	0.09	61.20	52.03	40.94	1.57	0.002
CG329 4-RA	<i>CG32944</i>	1.97	1.69	2.08	2.05	0.00	2.34	0.88	0.005
CG329 4-RB	<i>CG32945</i>	0.53	0.80	0.63	5.19	0.00	0.00	0.86	0.007
CG331 05-RA	<i>p24-2</i>	24.59	28.07	51.99	93.44	113.2	107.3	1.50	0.000
CG331 17-RA	<i>Victoria</i>	0.35	0.27	3.25	1.41	0.00	1.66	1.34	0.014
CG331 26-RA	<i>cutlet</i>	5.14	8.39	0.00	0.07	0.00	0.04	1.25	0.000
CG331 73-RA	<i>CG43672</i>	0.10	0.12	38.02	27.55	28.93	33.13	2.66	0.000
CG331 92-RA	<i>CG33191</i>	7.77	0.00	11.25	0.00	0.00	0.00	1.23	0.031
CG331 97-RA	<i>dpy</i>	0.00	0.00	14.32	0.00	73.54	16.81	1.04	0.000
CG331 97-RB	<i>mbl</i>	0.00	0.00	14.46	0.00	10.02	0.00	1.05	0.000
CG331 97-RC	<i>mbl</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.000
CG331 97-RD	<i>mbl</i>	3.85	0.00	179.6	12.78	5.58	0.00	0.84	0.003
CG331 97-RE	<i>mbl</i>	10.46	14.67	0.00	18.76	99.57	10.92	0.80	0.004

Anexo III

<b>T</b>	<b>Gen</b>	<b>RPKM C_1</b>	<b>RPKM C_2</b>	<b>RPKM C_3</b>	<b>RPKM M_1</b>	<b>RPKM M_2</b>	<b>RPKM M_3</b>	<b>E</b>	<b>p-aj</b>
CG331 97-RF	<i>mbl</i>	13.62	14.84	79.92	20.28	1.52	14.09	0.85	0.003
CG332 25-RB	<i>Nost</i>	0.07	0.19	0.13	0.00	1.84	0.00	2.10	0.000
CG332 68-RA	<i>CG33267</i>	0.00	0.00	11.41	0.56	3.59	3.62	2.09	0.000
CG335 00-RA	<i>bigmax</i>	65.61	22.75	154.6	357.9	13.64	12.31	1.19	0.041
CG335 28-RC	<i>SIFa</i>	0.00	5.58	0.00	6.58	0.00	0.31	0.96	0.005
CG335 28-RD	<i>Vmat</i>	0.00	2.09	4.64	0.00	1.52	2.36	0.92	0.011
CG335 45-RA	<i>Vkor</i>	1.32	10.63	1.10	13.77	2.84	2.43	1.25	0.000
CG335 46-RB	<i>nab</i>	3.78	5.48	6.14	53.69	0.00	37.41	0.78	0.042
CG335 46-RD	<i>gfzf</i>	12.88	17.83	23.88	9.18	1.04	9.54	0.93	0.005
CG339 11-RA	<i>CG33911</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	0.001
CG340 92-RA	<i>mt:Cyt-b</i>	239.8	149.3	165.8	287.2	613.0	603.4	1.09	0.034
CG341 66-RA	<i>CG34165</i>	92.50	3.05	0.00	0.00	0.00	0.08	1.20	0.016
CG342 2-RA	<i>CG34229</i>	18.47	15.08	86.69	0.00	46.87	44.34	1.01	0.015
CG342 67-RA	<i>CG34267</i>	238.7	135.6	267.3	42.72	2.15	27.95	1.12	0.044
CG342 68-RA	<i>CG34268</i>	132.7	1.33	0.00	9.42	7.83	5.31	1.15	0.031
CG342 81-RA	<i>CG34280</i>	15.06	5.17	64.30	59.97	20.08	65.97	1.14	0.048
CG344 23-RA	<i>CG34423</i>	0.10	6.83	0.00	9.01	13.69	11.64	1.21	0.037
CG346 6-RA	<i>Cyp4d2</i>	2.39	107.8	176.4	3.00	5.89	485.6	0.87	0.016
CG352 3-RA	<i>FASN1</i>	7.34	4.82	13.86	0.00	849.2	644.5	1.13	0.015
CG352 3-RB	<i>FASN1</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.13	0.015
CG352 4-RA	<i>FASN2</i>	0.29	1.70	0.32	0.00	0.00	0.00	0.97	0.011
CG376 7-RA	<i>Jhl-26</i>	34.57	47.27	21.87	0.00	0.00	0.00	2.00	0.000
CG393 1-RA	<i>Rrp4</i>	11.51	0.54	15.95	0.14	0.08	0.02	0.84	0.041
CG400 01-RB	<i>CG40001</i>	0.13	0.05	0.12	0.00	379.4	0.38	1.31	0.017
CG404 85-RA	<i>CG40485</i>	0.00	13.65	8.98	8.50	18.29	1.35	1.18	0.031

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG404 86-RA	<i>CG40486</i>	0.00	0.83	0.82	0.57	2.15	0.00	1.53	0.000
CG404 86-RB	<i>CG40486</i>	2.57	0.21	0.00	1.56	0.61	16.71	1.51	0.000
CG410 4-RA	<i>CG41049</i>	21.27	23.66	2.02	0.00	1.97	0.00	0.87	0.018
CG415 4-RA	<i>CG41542</i>	0.00	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.043
CG415 4-RC	<i>CG41545</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	0.043
CG416 24-RB	<i>UQCR-11</i>	2.38	0.92	2.18	3.60	8.05	5.50	1.21	0.021
CG422 53-RC	<i>Ndae1</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	2.90	0.00	0.81	0.025
CG422 55-RA	<i>asRNA:CR 42254</i>	0.64	5.29	6.81	5.20	0.82	0.79	0.78	0.039
CG422 92-RA	<i>Ir60d</i>	0.02	0.00	75.98	0.01	1.71	0.28	1.85	0.000
CG423 30-RD	<i>Got2</i>	0.81	5.20	0.50	1.97	3.28	3.30	0.77	0.042
CG423 30-RH	<i>Got2</i>	0.00	3.90	4.64	1.59	0.48	6.08	0.77	0.042
CG423 52-RC	<i>Ir40a</i>	0.01	0.00	0.01	0.24	0.11	0.19	1.23	0.025
CG423 62-RA	<i>CG42361</i>	3.81	7.49	25.92	0.00	24.03	0.34	1.92	0.000
CG423 72-RB	<i>Nepl6</i>	0.00	0.00	7.22	20.35	23.64	31.01	1.39	0.001
CG435 7-RA	<i>Ncc69</i>	10.79	0.00	0.00	0.00	16.73	3.25	0.60	0.049
CG435 7-RB	<i>Ncc69</i>	0.00	0.00	0.00	8.56	0.55	0.00	0.60	0.049
CG448 6-RA	<i>Cyp9b2</i>	16.56	13.69	29.64	37.22	0.00	0.00	1.25	0.006
CG457 0-RA	<i>CG4570</i>	1.89	75.21	3.66	1.27	8.80	9.18	0.95	0.021
CG465 0-RA	<i>CG4650</i>	1.54	53.94	0.72	0.00	0.00	0.00	1.43	0.004
CG465 3-RA	<i>CG4653</i>	15.18	6.09	30.31	23.31	139.1	94.53	1.24	0.029
CG486 3-RC	<i>RpL3</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	8.80	8.21	0.75	0.035
CG486 3-RD	<i>RpL3</i>	0.00	35.17	80.67	64.97	1.52	2.53	0.76	0.033
CG500 2-RA	<i>CG5002</i>	4.07	19.26	7.54	7.70	0.00	11.50	1.12	0.026
CG516 4-RA	<i>GstE1</i>	20.03	7.59	27.42	0.05	29.23	0.08	1.32	0.003
CG525 4-RA	<i>CG5254</i>	14.75	15.39	29.01	34.85	46.64	47.08	0.97	0.041

Anexo III

<b>T</b>	<b>Gen</b>	<b>RPKM C_1</b>	<b>RPKM C_2</b>	<b>RPKM C_3</b>	<b>RPKM M_1</b>	<b>RPKM M_2</b>	<b>RPKM M_3</b>	<b>E</b>	<b>p-aj</b>
CG556 8-RA	<i>CG5568</i>	0.04	0.03	34.19	0.44	2.59	0.00	1.32	0.016
CG566 0-RA	<i>ValRS-m</i>	1.68	0.80	0.60	0.00	1.33	0.44	0.93	0.022
CG581 0-RA	<i>CG5810</i>	6.70	6.03	0.03	0.13	24.48	0.00	1.05	0.018
CG596 1-RA	<i>CG5961</i>	4.37	3.13	9.95	2.52	19.08	3.12	1.16	0.020
CG603 4-RA	<i>CG6034</i>	0.26	0.00	12.47	0.00	0.00	0.00	1.22	0.015
CG612 5-RA	<i>CG6125</i>	1.95	0.00	0.00	0.00	0.16	0.67	1.03	0.027
CG612 5-RB	<i>CG6125</i>	0.58	0.00	0.00	3.98	0.00	1.00	1.03	0.027
CG614 0-RA	<i>Fum3</i>	0.04	0.21	0.00	0.00	1.26	0.00	1.52	0.003
CG621 4-RA	<i>MRP</i>	0.00	4.01	0.00	3.13	0.00	16.31	0.91	0.006
CG621 4-RB	<i>MRP</i>	4.49	1.03	8.20	1.15	1.23	50.46	0.91	0.005
CG621 4-RC	<i>MRP</i>	0.00	0.00	0.00	1.72	1.54	0.00	0.91	0.005
CG621 4-RD	<i>MRP</i>	0.00	6.05	7.47	0.00	0.00	0.85	0.91	0.005
CG621 4-RE	<i>MRP</i>	0.00	0.00	0.00	41.77	16.13	1.16	0.91	0.006
CG621 4-RF	<i>MRP</i>	0.00	0.00	0.00	5.34	3.40	6.77	0.92	0.005
CG621 4-RG	<i>MRP</i>	0.00	3.59	0.00	9.64	6.27	7.03	0.92	0.005
CG621 4-RH	<i>MRP</i>	0.00	48.15	0.00	1.04	0.63	0.66	0.92	0.005
CG621 4-RI	<i>MRP</i>	0.00	4.24	5.58	78.00	5.37	202.6	0.91	0.006
CG621 4-RJ	<i>MRP</i>	9.53	13.00	0.00	44.26	8.18	20.00	0.91	0.005
CG621 4-RK	<i>MRP</i>	0.00	0.67	0.00	2.84	18.48	1.28	0.91	0.005
CG621 4-RL	<i>MRP</i>	4.62	0.00	0.00	231.8	0.00	0.00	0.92	0.005
CG621 4-RM	<i>MRP</i>	6.34	0.10	0.00	0.00	4.60	5.45	0.92	0.005
CG621 4-RN	<i>MRP</i>	0.00	0.00	10.76	14.57	0.96	9.31	0.91	0.006
CG621 4-RO	<i>MRP</i>	6.55	3.72	8.45	0.00	7.76	3.39	0.92	0.005
CG621 4-RP	<i>MRP</i>	0.00	11.62	0.00	3.06	1.34	1.17	0.92	0.005
CG621 4-RQ	<i>MRP</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	8.01	7.48	0.92	0.005

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG644 9-RA	<i>NijA</i>	1.25	0.00	0.00	3.90	34.34	4.24	1.46	0.001
CG644 9-RB	<i>NijA</i>	0.00	68.35	44.89	35.52	0.42	0.00	1.44	0.002
CG644 9-RC	<i>NijA</i>	0.00	0.00	14.02	0.00	0.00	2.04	1.44	0.002
CG648 6-RA	<i>Pex7</i>	7.60	6.17	8.49	0.00	0.00	0.00	1.41	0.000
CG648 6-RB	<i>Pex7</i>	2.33	0.73	1.21	34.15	6.31	8.14	1.41	0.000
CG653 6-RA	<i>mthl4</i>	1.13	0.13	0.57	19.14	0.00	8.02	2.79	0.000
CG653 6-RB	<i>mthl4</i>	0.00	0.27	0.18	9.60	7.89	4.31	2.82	0.000
CG655 3-RA	<i>CG6553</i>	0.40	0.43	0.31	24.32	0.88	41.81	1.12	0.047
CG657 4-RA	<i>CG6574</i>	6.48	24.73	0.00	7.07	0.00	0.00	0.82	0.030
CG659 8-RA	<i>Fdh</i>	21.80	20.58	5.36	6.80	19.31	0.00	1.27	0.009
CG669 4-RA	<i>ZC3H3</i>	7.13	6.33	8.10	5.72	11.55	11.75	0.79	0.013
CG682 1-RA	<i>Lsp1gam ma</i>	0.31	0.54	0.53	0.24	0.43	0.33	2.75	0.000
CG683 0-RA	<i>CG6830</i>	5.01	1.19	11.09	1.94	16.03	0.00	1.28	0.002
CG740 2-RA	<i>CG7402</i>	0.15	70.19	0.55	1.51	0.95	1.07	1.32	0.007
CG744 5-RA	<i>fln</i>	0.89	0.68	0.00	91.07	2.84	0.00	1.08	0.044
CG746 4-RA	<i>Chs2</i>	0.00	0.00	0.00	7.21	4.98	0.00	1.05	0.000
CG746 4-RB	<i>Chs2</i>	1.30	1.51	1.70	0.00	0.00	8.49	1.05	0.000
CG752 9-RA	<i>Est-Q</i>	1.53	11.34	8.79	6.97	5.16	6.67	2.22	0.000
CG756 3-RA	<i>CalpA</i>	3.37	0.00	3.76	0.00	0.00	3.62	0.82	0.044
CG760 7-RA	<i>CG7607</i>	1.23	0.67	2.57	0.00	5.71	4.31	0.97	0.030
CG775 6-RA	<i>Hsc70-2</i>	0.61	0.61	6.06	4.06	0.00	1.89	2.04	0.000
CG776 6-RF	<i>CG7766</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.02	0.86	0.014
CG779 8-RA	<i>CG7798</i>	6.29	2.06	5.24	11.18	43.80	28.88	1.34	0.011
CG787 4-RA	<i>Mur18B</i>	12.63	7.69	0.00	2.45	0.00	10.09	1.30	0.008
CG791 2-RA	<i>CG7912</i>	1.46	0.93	3.09	1.23	343.3	3.76	1.22	0.010

Anexo III

T	Gen	RPKM C_1	RPKM C_2	RPKM C_3	RPKM M_1	RPKM M_2	RPKM M_3	E	p-aj
CG796 6-RA	<i>CG7966</i>	6.25	3.85	9.81	2.78	4.13	5.61	1.03	0.029
CG836 9-RA	<i>CG8369</i>	18.32	18.80	22.14	55.18	59.09	59.27	0.83	0.046
CG842 5-RA	<i>CG30095</i>	0.62	0.41	0.92	0.00	1.72	1.19	1.05	0.034
CG850 5-RA	<i>Cpr49Ae</i>	7.18	5.22	14.24	0.33	240.9	181.9	1.01	0.037
CG862 0-RA	<i>CG8620</i>	0.00	0.00	1.25	2.05	2.25	1.22	1.08	0.012
CG862 0-RB	<i>CG8620</i>	9.62	198.1	0.00	4.41	2.09	0.00	1.08	0.011
CG866 5-RA	<i>CG8665</i>	5.09	3.74	7.90	13.11	7.59	9.15	0.83	0.048
CG867 6-RC	<i>Hr39</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.30	0.80	0.032
CG868 7-RA	<i>Cyp6a14</i>	0.28	0.12	0.40	1.46	5.39	3.30	1.35	0.012
CG868 7-RB	<i>Cyp6a14</i>	0.36	0.08	1.70	1.19	0.00	1.89	1.33	0.015
CG870 9-RB	<i>Lpin</i>	6.07	6.99	7.92	20.75	0.00	17.65	0.75	0.049
CG876 4-RA	<i>GA21302</i>	105.9	84.59	176.5	394.5	604.1	465.1	0.97	0.046
CG876 8-RA	<i>CG8768</i>	2.72	2.71	4.86	0.00	0.00	0.00	1.15	0.020
CG878 2-RA	<i>Oat</i>	39.97	35.12	7.29	7.06	2.82	7.54	1.23	0.002
CG883 7-RA	<i>CG8837</i>	2.16	0.00	0.38	8.67	3.83	11.68	1.35	0.004
CG894 2-RA	<i>NimC1</i>	4.46	44.75	3.37	73.40	0.00	84.79	0.94	0.048
CG912 0-RA	<i>LysX</i>	0.84	15.93	6.51	3.22	6.27	9.22	2.09	0.000
CG923 1-RA	<i>CG9231</i>	7.39	8.15	0.00	10.88	5.04	4.44	1.21	0.018
CG928 7-RA	<i>CG9287</i>	0.00	0.02	0.00	0.47	0.13	0.14	1.35	0.009
CG930 7-RA	<i>Cht5</i>	26.59	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	1.20	0.009
CG948 6-RA	<i>AANATL2</i>	11.50	0.99	19.85	8.71	65.96	57.59	1.27	0.006
CG950 0-RA	<i>CG9500</i>	0.09	0.04	0.29	1.28	1.48	1.53	1.71	0.000
CG966 5-RB	<i>Cpr73D</i>	2.20	0.90	2.47	0.04	7.47	5.41	1.17	0.030



Portada y contraportada:

Inmunotinción contra Seven up (rojo), Dimmed (azul) y GFP (verde) en la cuerda nerviosa ventral de un embrión de *Drosophila melanogaster* de estadio 18 h AEL de genotipo *orcokininina-Gal4>UAS-GFP*.



Diseño:

Adrián Izquierdo y Marina Alosete