

Caracterización de la función del
gen *Gai* en *Drosophila*
melanogaster

Memoria presentada por

Jonathan Benito Sipos

Para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Enero 2007

Director de la tesis: Laura Torroja Fungairiño

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

La doctora Laura Torroja Fungairiño, profesora Contratada Doctor del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMA:

Que el licenciado D.Jonathan Benito Sipos ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta como memoria de Tesis Doctoral: “Caracterización de la función del gen *Gai* en *Drosophila melanogaster*”

Madrid, 12 de Enero de 2007

Fdo. Laura Torroja Fungairiño
Contratada Doctor del Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, España.

*“Que no hay batallas que no puedan ser ganadas,
ni reinos que no puedan ensancharse,
ni hay gloria perdurable”*

Doña Toda Aznar (reina de Navarra 960 D.C)

*“La independencia del pensamiento
es la más noble aristocracia”*

A. France

Agradecimientos

“Pocas veces quien recibe lo que no merece agradece lo que recibe, así que es mejor darle su merecido y lo agradecerá con creces...”

Julián Hernández

“Prometo estarte agradecido...”

Rosendo

En primer lugar quiero dejar claro que las manos de mis padres están llenas de cortes, de heridas mal curadas, debidas al trato bronco con el que te castiga una tienda de flores. Desde pequeño he visto las horas a las que salían de casa y las horas a las que volvían, también les he visto trabajar en fiestas y he visto como llegaban tarde a la cena de nochevieja, y creo que nunca podré imaginar lo mucho que protestan sus piernas por no poderse sentar en todo el día. Y gracias a todo esto yo he podido hacer siempre lo que he querido, sin su esfuerzo no podría haber estudiado biología, y tampoco hubiese podido realizar esta tesis. Y como sé que quien de verdad va a estar orgulloso de este título de Doctor son ellos, a ellos se lo dedico. Sois los padres que hubiese elegido si hubiese tenido la oportunidad de hacerlo.

También a mis abuelos, aunque solo mi abuela Antonia podrá disfrutarlo *in vivo*, sé que los demás hubiesen engordado hoy algún que otro kilo. No escribo más sobre vosotros porque ni lo puedo escribir ni lo podré leer. Esto también es gracias a, por y para vosotros.

Por supuesto he agradecer-dedicar esta tesis a mi mujer, Cris, para no tener problemas en casa...y para agradecerla de corazón lo bien que me ha sabido aguantar, por muy “pesao” que me haya puesto, que me he puesto... y por escuchar (aunque no entienda muy bien lo que la digo) cada una de mis preguntas de la vida, en definitiva por soportar mi insaciable (y a veces poco entendible, e incluso peligrosa) curiosidad. Gracias sobretodo por ser mi mejor amiga y por ser tan buena gente. Gracias por compartir tu vida conmigo, espero que nunca te arrepientas.

Y para cerrar dedicatorias (sin cerrar agradecimientos) no podía faltar...mi hermana Estíbaliz, que aunque sea muy suya y yo muy mío...sabes que estoy muy orgulloso de ti, y yo sé que tú también lo estás de mi. Ánimo, que acabas de empezar a vivir, y has nacido para hacer precisamente lo que haces, serás la mejor. Te quiero.

También quiero dar las gracias a toda mi familia en general tanto la natural como la política (todos sois igual de importantes pero no os puedo poner a todos a la vez), a mi tía la auténtica por ser como es y quererme tanto y por llevarme de muy pequeño a todo lo que oliese a cultura. A mis tios Manolo y Maite porque, entre otras muchas cosas, hicieron que el Zoo de Madrid fuese una prolongación de mi casa (puede que mi tío Manolo sea el mayor culpable de todo esto...). A mis tios Paco y Mari por soportarme tantas veces en su casa y por la posibilidad de recordar tantos y tantos domingos en las gradas del Bernabeu.

A todos mis primos: Arancha (mi otra hermana), a Tamara, Antonio y Manu, que me habéis apoyado e interesado mucho (pero mucho) por mi corta carrera docente e investigadora. A Edu y Jose (ambos cuñaos), por haber cuidado y cuidar a dos de las mujeres que más quiero.

Gracias a Clemente y a Cristina, por haberme dejado colarme en su familia y no haber puesto el grito en el cielo con la convivencia prematrimonial, gracias también a Cristina por haberme ganado el estómago y por lo cariñosa que es conmigo, y a “la Adri” por enseñarnos a todos lo listo que se puede ser con 9 años... Y a todos los nuevos “Yayos” que me han adoptado con tanto cariño como lo han hecho los míos.

A la familia Sipos-Legaz, porque siempre estáis muy cerca, muy cerca y me siento muy querido por todos vosotros, espero que os sintáis igual de queridos por mi. He crecido junto a vosotros y sin duda alguna, para entender como es el que escribe hay que entender de dónde viene, y yo nací entre vosotros. Gracias a los que están, y a los que no están que sepan (donde estén) que les echo mucho de menos, mucho más de lo que os imagináis todos.

A César, Germi, Rubén, Josito, Anselmos (Moreno y Rubio), Armando, Mou, Jesús, María, Patricia, Jesús... porque sois los mejores amigos que se pueden tener, no os imagináis lo que sois para mi, no cambiéis nunca, nunca, no os volváis demasiado formales, y a pesar de la distancia que nos separa a casi todos, que nunca crezca la hierba en el camino de nuestra amistad.

Gracias al ciclismo, porque me enseñó disciplina férrea y me metió la competición en lo más profundo de mi alma (cosa que sin duda alguna me trajo aquí), me enseñó a apretar los dientes, a dormir con heridas, a sufrir hasta llorar, a pasar hambre, sed, frío hasta no poder hablar (¿verdad padre?), a doparme (ah, no, no, que me lío...), sensaciones difíciles de explicar y duras de vivir, me dio a dos de mis mejores amigos (César y Rubén), y me enseñó que en la vida no siempre se consigue lo que se quiere por mucha ilusión que pongas en ello.

Gracias a Mazarrón, Fresnedillas, La Pineda, gracias a todos esos rincones en los que he podido meditar y encontrarme conmigo mismo cada vez que me he buscado (y espero seguir haciéndolo muchos años), esos lugares los siento como míos y me gustaría pensar que ellos me sientan de alguna manera suyo.

A Félix, Nacho, Raquel, Jesús, Javi, Nieves, Mariangeles, Vega, Alberto, Mariaje, Juanmi, Eu, Fran... Por esa amistad tan sincera y tan duradera, gracias por todo, poco a poco todos lo vamos logrando, cada uno a nuestra manera.

A Raúl, Miriam, María y Manu, porque os tuve cuando más os necesité (y eso no se olvida a pesar de lo ¿mucho? que ha llovido), gracias.

Al campeón de España de los pesos pesados: Hovik, porque me has enseñado, no solo a boxear, sino a ser un auténtico caballero, un homenaje a la amistad y al saber estar, y porque a pesar de ser quien eres...nunca te has olvidado de mí, espero que nunca lo hagas.

A Bego y Alfonso, que tantos “noes” se han llevado por respuesta a la pregunta de “¿Te vienes a tomar un café?”, gracias por no haber dejado de llamarme nunca... Gracias por todos esos buenos ratos e interesantes conversaciones de las que mucho destilé... (Dios existe, lo he visto en los intrones...). Gracias por vuestra amistad.

Gracias a Pili, porque la he sentido como una madre en el laboratorio, aunque a veces eso haya sido horrible... Me he sentido muy querido y muy respaldado en todo momento, gracias de todo corazón, sin filtro alguno (como tú eres). Espero que tú también te sientas querida, y espero que en el futuro hagamos muchas cosas juntos.

También gracias a Belén, que la he sentido como una hermana mayor en muchos momentos, me he sentido muy querido y arropado siempre. Se te echa de menos...

Gracias a Elena Escudero, profesora de profesores (esto si que no lo puedes negar). A pesar de ser quien eres, siempre me has tratado como un igual.

Agradezco enormemente las oportunidades que me has brindado, gracias por saber tanto de tantas cosas, eres un homenaje a la cultura. Gracias por ser tan humilde. Dar clase en la misma tarima que lo has hecho tú ha sido todo un orgullo.

También quiero echarle la culpa de esto a Pedro del Castillo, sin el que no sé si hubiese hecho una tesis, pero seguro que no ésta. Gracias por todo cuanto me has enseñado, me enseñas y me enseñarás. Gracias por estar siempre tan cerca de mí. Nunca dejaré de ser tu alumno.

Gracias a Luis (de Navas) y al Vasco, porque os conozco desde hace muchos años y sois mi gente, sé que lo sabéis, sé que lo sentís, no os quiero perder de vista nunca, nunca. A Miguel, a Dani... os he conocido un pelín después, pero no por ellos sois menos para mi, vosotros también estáis cargados de “noes” en muchas ocasiones (y nada merecidos), pero habéis sabido entenderme siempre. Soy un “agonías”, pero sé que también soy vuestro amigo, yo así lo he sentido. Gracias por todos los ratos que hemos pasado juntos, y los que espero que pasemos, porque sois muy buena gente.

A mi unidad:

Gracias al Turi, que a pesar de que no siempre hemos estado de acuerdo en todo, siempre nos hemos entendido bastante bien, nos lo hemos pasado muy bien juntos, ojalá nos jubilemos juntos nen, ; Gracias a Macu, por coger esa “perita en dulce” a la que le faltaba el chupete (pero no ilusión), siempre has sido muy cariñosa conmigo, y nunca me has puesto una mala cara; a la abuela (Marta) porque me has ayudado mucho con tus conversaciones, y has aguantado (no sé como...) bromas de todo tipo durante todos estos años, gracias por dejarme tu ordenador para parte de la tesis, me ha venido dabuti; a Isa porque también me has ayudado un montón en todos los aspectos (muchas conversaciones), y porque muchas veces hablando de fútbol hemos limado un poquito la aspereza de los lunes...; a Yolanda porque a pesar de machacarme con los alfileres...(es broma) no has tenido un mal gesto hacia mí, siempre has estado dispuesta a sustituirme, a ayudarme y colaborar; a María José, porque a pesar de aquella vez (lo siento)... eres muy sincera, y me has dado muy buenos consejos, y me pareces una persona muy eficiente; a Alicia Batuecas, porque hemos tardado mucho en hablar (por casualidad pura y dura, tiempo y espacio) me pareces una persona apasionante, y una apasionada de la fisiología y la docencia; a toda la chiquillería, gente

transitoria y clásicos (me dejaré alguno...): Pedrito, Alicia, María, Nacho, Ismael, María II, Eva, Robe... A todos los con los que he compartido laboratorio, risas y conversaciones.

Gracias a Pepe Bella, Carmen López, Carlos García de la Vega, Jaime Gosalvez, Pepe Martín, Carlos Sentís, Máximo Sandín, Consuelo Prado, Angel Baltanás, Isabel Castro, Ángeles Juarranz, Pepa Hazen, Paquita y Antonio Quesada porque soy un mosaico generado por ellos (no sé si olvido alguno...), ellos me han enseñado casi todo lo que sé. Gracias también a los que fueron profesores míos antes que ellos: desde aquella Mari Carmen de 2º de EGB (sí, fui al cole antes, pero solo recuerdo el nombre de las chicas que me gustaban...) hasta el Satur de COU, pasando por Simón, Harry, Bacterio, Blanca... Al dar clase me acuerdo de todos vosotros, y hoy os agradezco a todos el esfuerzo (porque yo era tan trasto como gordo) que hicisteis varios para que no abandonase los estudios.

A Anabel y Juan Carlos, que me salvaron de muchos llantos en mi estancia en Birmingham (aunque no todos, maldita ciudad, maldita soledad), de verdad, gracias. Gracias supremas a Anabel respecto al nórdico que me salvó de la congelación cuando los perros comenzaban a ir con bufanda en Birmingham. A Alicia Hidalgo, porque me dio (y me da) muy buenos consejos, y por que aprendí mucho a su lado, gracias por toda la confianza que pusiste en mi, y gracias por todas las inyecciones de motivación que me pusiste en la maleta...

Quiero también dar las gracias a todos mis alumnos, de los que he aprendido mucho, mucho, no me han dejado de ilusionar en ningún momento, y honestamente creo que me han enseñado tanto o más de lo que les he enseñado yo a ellos.

Y como no, gracias a mi directora: Laura, por toda la paciencia que has tenido conmigo, por todas las veces que te has mordido la lengua para no regañarme, y aunque sé que a veces te he sacado de quicio (aunque apenas lo has demostrado), nunca has tenido un mal gesto conmigo. Sé que no he sido el mejor doctorando, pero con el tiempo espero ser el mejor compañero.

Gracias a todos, porque sois la hostia (o como se diga...).

Jony

Índice

Resumen.....	15
Introducción	18
Las proteínas G heterotriméricas	19
Señalización mediada por proteínas G heterotriméricas	19
Moduladores de la señalización de las proteínas G heterotriméricas.....	21
La subunidad Gai	23
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	26
La subunidad Gai en <i>Drosophila melanogaster</i>	27
Proteínas G heterotriméricas en <i>Drosophila melanogaster</i>	27
Papel de Gai en la división asimétrica de neuroblastos	29
Papel de Gai en el desarrollo de la glia de <i>Drosophila melanogaster</i>	33
Antecedentes	39
Aislamiento de mutantes en el gen que codifica la proteína Gai en <i>Drosophila melanogaster</i>	39
Objetivos	42
Materiales y métodos	44
Estirpes de <i>Drosophila</i>	45
Sistema Gal4-UAS.....	45
Transposición dirigida	47
PCR y secuenciación	50
Recolección y fijación de embriones	53
Disección y fijación de ganglios nerviosos.....	53
Visualización de los músculos de la pared larvaria y sus uniones neuromusculares	54
Protocolo de inmunohistoquímica para campo claro.....	54
Protocolo de inmunohistoquímica para fluorescencia	55
Anticuerpos.....	56
Visualización de la GFP sin realizar inmunotinción	57
Detección enzimática de la β -Galactosidasa	58
Microscopía y tratamiento de imágenes	58
Histología	58
Tinciones de Giemsa.....	59
Cuantificación de la longitud del ganglio ventral en embriones, larvas y adultos	60
Resultados	62
Generación de una línea transgénica <i>Gai-Gal4</i> mediante transposición dirigida a partir de la inserción $P(y^+=UAS)Gai^{367}$	63
Descripción del patrón de expresión de la nueva línea <i>Gai-Gal4</i>	64
Expresión de la línea <i>Gai-Gal4</i> en el estadio embrionario	65
Expresión de la línea <i>Gai-Gal4</i> en estadios larvarios.....	68
Ampliación de la expresión de la línea <i>Gai-Gal4</i> en el SNC larvario	70
Expresión de la línea <i>Gai-Gal4</i> en adulto	73
Caracterización de los fenotipos de falta de función del gen <i>Gai</i>	75
Los mutantes para <i>Gai</i> cigótico son viables y fértiles.....	75
Los mutantes que carecen del producto Gai materno y cigótico (<i>Gai</i> ⁻) presentan una viabilidad reducida y retraso en el crecimiento	78
Los mutantes <i>Gai</i> ⁻ presentan importantes defectos en la ecdisis	79

Las motoneuronas de los mutantes <i>Gai</i> ⁻ presentan una morfología, número y disposición normal	80
En la pared muscular larvaria en los mutantes <i>Gai</i> ⁻ encontramos fusiones y duplicaciones de algunos músculos	81
Los mutantes <i>Gai</i> ⁻ tienen defectos en la condensación del ganglio ventral ..	82
Análisis celular de alteraciones en el sistema nervioso de mutantes <i>Gai</i>⁻ ...	85
La disminución de actividad neuronal en los mutantes <i>Gai</i> ⁻ no es la principal responsable de la falta de condensación del ganglio ventral.	85
La migración de los hemocitos no está interrumpida en los mutantes <i>Gai</i> ⁻ . .	86
Tanto el patrón neuronal como el neuropilo están levemente desorganizados en los mutantes <i>Gai</i> ⁻	87
Los mutantes <i>Gai</i> ⁻ presentan problemas en el desarrollo y diferenciación de la glia lateral que podrían contribuir a la falta de condensación del ganglio ventral.	91
Los mutantes <i>Gai</i> ⁻ muestran defectos en el patrón de expresión de neuropéptidos.....	94
Sobre-expresión y expresión ectópica de transgenes bajo <i>Gai-Gal4</i>	96
La sobre-expresión de la proteína Gai silvestre no produce defectos fenotípicos aparentes.	97
La expresión de formas constitutivamente activas de la proteína Gai produce letalidad al expresarse bajo el <i>Gai-Gal4</i>	98
Experimentos de rescate	99
La expresión de Gai mediante la línea de expresión cigótica <i>Gai -Gal4</i> no rescata el fenotipo en individuos carentes de los productos maternos y cigóticos de Gai.....	100
La expresión de Gai mediante <i>Gai-Gal4</i> en una madre mutante para <i>Gai</i> no rescata el fenotipo en su descendencia homocigótica para la mutación. ...	101
Discusión	102
La expresión de Gai sugiere su implicación en procesos biológicos muy diversos	103
<i>Gai</i> se requiere para el desarrollo tardío y diferenciación de la glia lateral	105
La falta de Gai genera defectos en la posición (migración) de la glia lateral	106
El defecto de condensación del ganglio ventral en los mutantes <i>Gai</i> ⁻ se debe principalmente a defectos en la glia lateral	109
<i>Gai</i> está implicada en procesos neuroendocrinos.	111
Los mutantes <i>Gai</i> ⁻ presentan defectos en la expresión de neuropéptidos ¿Defectos en la identidad celular o problemas de regulación de la expresión?	112
La señalización mediada por Gai regula el proceso de la ecdisis	114
Alteraciones en la señalización de Gai producen defectos en la maduración de la cutícula y en la extensión de las alas.....	116
Implicación de Gai en procesos de división asimétrica en distintos tipos celulares	118
Defectos en la pared muscular en <i>Gai</i> ⁻ : implicación de Gai	119
Importancia del balance y dosis de <i>Gai-GDP/Gai-GTP</i> y $G\beta\gamma$ en la señalización mediada por proteínas G.....	120
Efectos de la pleiotropía en la viabilidad de los mutantes <i>Gai</i>⁻	122
Conclusiones.....	124
Bibliografía.....	126

Índice de figuras:

Figura 1.....	20
Figura 2.....	22
Figura 3.....	27
Figura 4.....	30
Figura 5.....	36
Figura 6.....	40
Figura 7.....	46
Figura 8.....	48
Figura 9.....	50
Figura 10.....	52
Figura 11.....	60
Figura 12.....	69
Figura 13.....	70
Figura 14.....	71
Figura 15.....	73
Figura 16.....	74
Figura 17.....	79
Figura 18.....	80
Figura 19.....	82
Figura 20.....	84
Figura 21.....	86
Figura 22.....	88
Figura 23.....	90
Figura 24.....	92
Figura 25.....	93
Figura 26.....	95
Tabla 1.....	66
Tabla 2.....	76

Abreviaturas

ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
AMPc	Adenina Monofosfato cíclico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CNV	Cuerda Nerviosa Ventral
BSA	Albúmina de Suero Bovino
DAB	Diamino Benicidina
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
Min	Minuto
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PP	Paraformaldehído
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
UAM	Universidad Autónoma de Madrid
UAS	<i>Upstream Activated Sequence</i>

Resumen

La señalización a través de proteínas G heterotriméricas es el mecanismo de señalización transmembrana más empleado a lo largo de la filogenia evolutiva. El complejo heterotrimérico $G\alpha\beta\gamma$ es activado por receptores GPCRs (*G Protein Coupled Receptors*), que responden a señales extracelulares que comprenden desde estímulos mecánicos o electromagnéticos hasta ligandos químicos como hormonas o neurotransmisores. Estudios recientes en invertebrados han implicado a la subunidad $G\alpha_i$ en la división asimétrica de precursores neuronales y el establecimiento de la barrera hematoencefálica, pero el análisis de mutantes sugieren que la regulación mediada por proteínas G heterotriméricas en estos procesos depende fundamentalmente de las subunidades $G\alpha_o$ y $G\beta\gamma$, mientras que $G\alpha_i$ juega un papel secundario. Para identificar los procesos en los que $G\alpha_i$ tiene una función esencial, hemos analizado mutantes de falta de función para el gen *Gai* en *Drosophila melanogaster*. Los mutantes *Gai⁻* que carecen del producto materno y cigótico, muestran una viabilidad muy reducida además de un pronunciado retraso en su desarrollo. Los defectos en el proceso de ecdisis y en la expresión de neuropéptidos de estos mutantes sugieren un papel esencial de $G\alpha_i$ en la señalización endocrina. Los mutantes *Gai⁻* también muestran el ganglio ventral elongado desde embrión hasta adulto. El análisis detallado del patrón celular del sistema nervioso central de mutantes *Gai⁻* indica que *Gai* es esencial para el desarrollo y/o diferenciación tardíos de la glia, y que defectos en este proceso son los responsables principales de la falta de condensación del ganglio ventral de los mutantes. Además, los mutantes *Gai⁻* muestran duplicaciones y fusiones de fibras musculares de la pared larvaria. Este fenotipo, junto con la similitud en el mecanismo de división asimétrica entre precursores neuronales y musculares, sugieren que el papel de $G\alpha_i$ en división asimétrica podría ser común a distintos tipos celulares.

Summary

Signalling through heterotrimeric G proteins is the transmembrane signalling mechanism more widely used throughout evolution. The heterotrimeric complex $G\alpha\beta\gamma$ is activated by GPCRs receptors (G Protein Coupled Receptors), which respond to extracellular signals comprising from mechanical or electromagnetic stimuli to chemical ligands like hormones or neurotransmitters. Recent studies in invertebrates have implicated the *Gai* subunit in the asymmetric division of neuronal precursors, and in the establishment of the blood brain barrier, but mutant analysis suggests that regulation by heterotrimeric G proteins in these processes depends fundamentally on the *Gao* and $G\beta\gamma$ subunits, whereas *Gai* plays a secondary role. In order to identify the processes in which *Gai* has an essential function, we have analyzed loss of function mutants for the *Gai* gene in *Drosophila melanogaster*. *Gai*⁻ mutants, which lack both maternal and zygotic products, show a reduced viability in addition to a pronounced delay in their development. Defects in the process of ecdysis and in the expression of neuropeptides shown by these mutants indicate an essential role for *Gai* in endocrine signalling. *Gai*⁻ mutants also display an elongation of the ventral ganglion, from embryo to adult. The detailed analysis of the cellular pattern in the central nervous system of *Gai*⁻ mutants indicates that *Gai* is essential for the development and/or differentiation of most glial cells, and that defects in this process are the main cause underlying the deficiencies in the condensation of the ventral ganglion observed in these mutants. In addition, *Gai*⁻ mutants show duplications and fusions of muscle fibres in the larval wall. This phenotype, and the similarity in the mechanism of asymmetric division of neuronal and muscular precursors, suggest that *Gai* could regulate asymmetric divisions in different cell types.

Introducción

Las proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas son esenciales para numerosos aspectos de la fisiología de los organismos (Cabrera-Veray y cols., 2003; Offermanns, 2003; Spiegel y cols., 2004). Actúan como transportadores de la información a través de la membrana plasmática. La información viaja en forma de señales extracelulares, que son recogidas por receptores de una gran superfamilia proteica, los receptores GPCRs (*G Protein Coupled Receptors*), también llamados receptores heptahelicoidales. Estos receptores se caracterizan por presentar siete regiones transmembrana y estar acoplados a proteínas G heterotriméricas, a las que activan en respuesta a diversas señales extracelulares (Karnik y cols., 2003; Hermans y cols., 2003). Las señales extracelulares a las que responden comprenden desde estímulos mecánicos o electromagnéticos hasta ligandos químicos como hormonas o neurotransmisores. Más de 1000 receptores de este tipo han sido identificados en cada genoma de mamífero estudiado (Morris y Malbon, 1999; Hollmann y cols., 2005; Wettschureck y Offermanns, 2006).

Las proteínas G heterotriméricas, localizadas en la cara interna de la membrana, están formadas por tres subunidades, α , β y γ , de las que se han identificado, en cada uno de los genomas de mamíferos estudiados hasta la fecha, 27, 5 y 14 genes, respectivamente. Las subunidades *alpha*, que definen las propiedades básicas de las proteínas G heterotriméricas, se dividen en 4 familias: *G α s*, *G α i/G α o*, *G α q/G α 11* y *G α 12/G α 13*. La combinación de una subunidad *alpha* con un heterodímero $\beta\gamma$ forma un subtipo concreto de proteína G heterotrimérica, con unas características de señalización determinadas. Estas proteínas se encuentran muy conservadas evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos, tanto en su estructura primaria como en su función (Morris y Malbon, 1999; Alberts y cols., 2002; Wettschureck y Offermanns, 2006).

Señalización mediada por proteínas G heterotriméricas

Cuando los receptores heptahelicoidales son activados por el estímulo adecuado, el receptor interacciona con las proteínas G y cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , lo que induce la disociación del complejo heterotrimérico en $G\alpha$ -GTP y $\beta\gamma$, iniciándose una compleja cascada de eventos

intracelulares (figura 1). Así, $G\alpha$ -GTP interacciona con efectores tales como las enzimas adenilil ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC) y la fosfodiesterasa de GMP cíclico, mientras que $G\beta\gamma$ interacciona y regula distintos efectores como algunas AC y fosfolipasa A2 (Prieto-Villapun y cols., 2005).

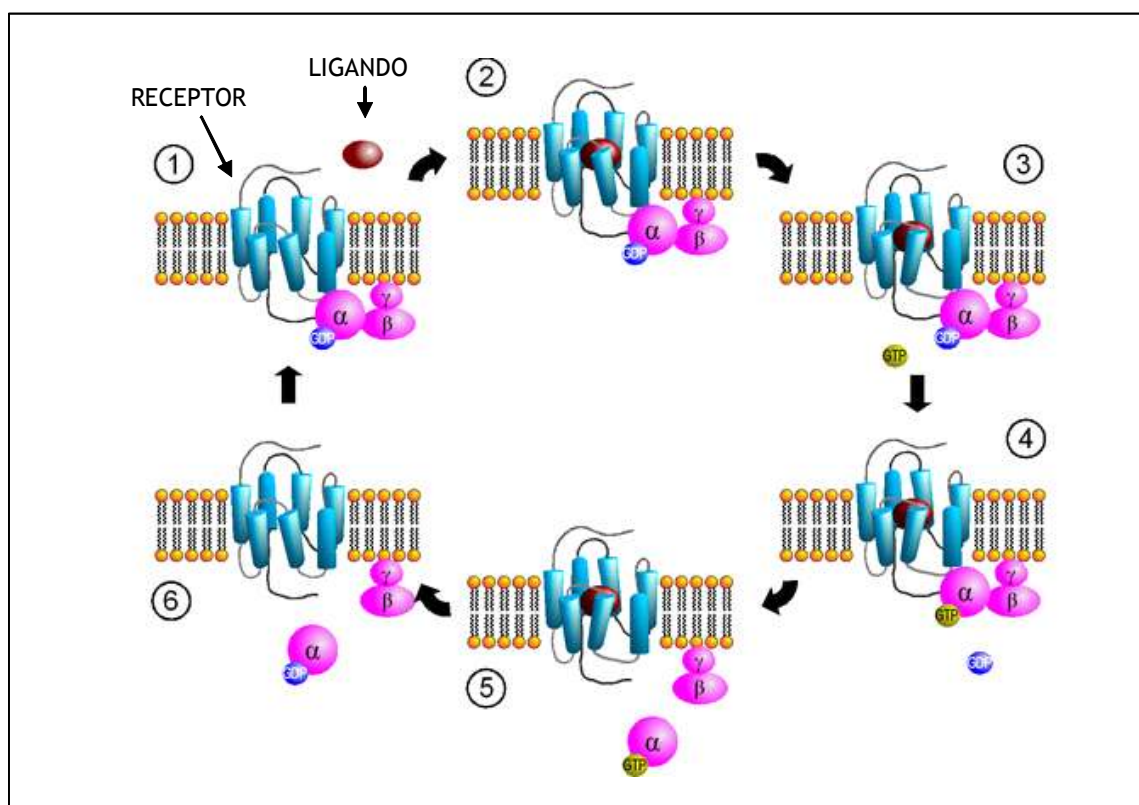


Fig. 1. Señalización mediada por proteínas G heterotriméricas. Cuando los receptores heptahelicoidales son activados por el estímulo adecuado (Ej. Ligando)- apartado 2 y 3-, el receptor interacciona con el complejo trimérico $G\beta\gamma$ y cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α -3 y 4-, lo que induce la disociación del complejo heterotrimérico en $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, iniciándose una compleja cascada de eventos intracelulares. La señalización llevada a cabo por las proteínas G finaliza cuando la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP -5 y 6-, induciendo la reasociación del trímero $G\alpha\beta\gamma$ y la inactivación por tanto de la proteína G.

Se ponen así en marcha diferentes rutas de señalización integradas por múltiples elementos de un puzzle que, finalmente, desembocan en la regulación de actividades celulares tan importantes como la transcripción de la información genética, proliferación, diferenciación, secreción o motilidad (Neves y cols., 2002; Rashid y cols., 2004).

La señalización llevada a cabo por las proteínas G finaliza cuando la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP, induciendo la reasociación del trímero $G\alpha\beta\gamma$ y la inactivación por tanto de la proteína G (Wettschureck y Offermanns, 2006) (figura 1).

Moduladores de la señalización de las proteínas G heterotriméricas

La actividad GTPasa de la proteína G aislada es mucho más baja de la observada en condiciones fisiológicas, lo que llevó al descubrimiento de componentes que intensifican la actividad GTPasa de la subunidad α , y contribuyen de este modo a su desactivación y permiten por tanto una rápida modulación de la señalización a través de proteínas G (figura 2)(Arshavsky y Bownds y cols., 1992; Berstein y cols., 1992; Kozasa y cols., 1998; Scholichy cols., 1999). A estos efectores se les conoce con el nombre genérico de proteínas GAP (*GTPase Activating Proteins*). De éstas, la mayoría pertenecen a un subtipo de proteínas conocidas como RGS (*Regulators of G proteins Signaling*), que contienen el dominio también llamado RGS que permite incrementar hasta cien veces la actividad GTPasa de las subunidades alpha (Ross y Wilkie, 2000; Neubig y cols., 2002).

En este panorama han aparecido recientemente nuevos e interesantes componentes que modulan la señalización ejercida a través de proteínas G, como son otra familia proteica con un dominio común llamado GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*) que da nombre a la familia. Las proteínas GDI y el complejo $G\beta\gamma$ compiten por el mismo sitio de unión a la subunidad alpha mientras ésta se encuentra unida a GDP, por lo que la unión de GDI a $G\alpha$ produce a la vez la disociación del complejo $\beta\gamma$, que puede actuar sobre sus efectores, e impide el intercambio de GDP por GTP en la subunidad alpha, que permanece inactiva (figura 2).

Modulando esta señalización también encontramos a las proteínas con actividad GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), que favorecen el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , contribuyendo de este modo al inicio de la señalización a través de proteínas G (figura 2)(Siderosvki and Willard, 2005). Los receptores asociados a proteínas G tienen actividad GEF, pero existen además proteínas citosólicas (no receptores) con esta actividad, como es el caso de Ric-8 (Wang y cols., 2005).

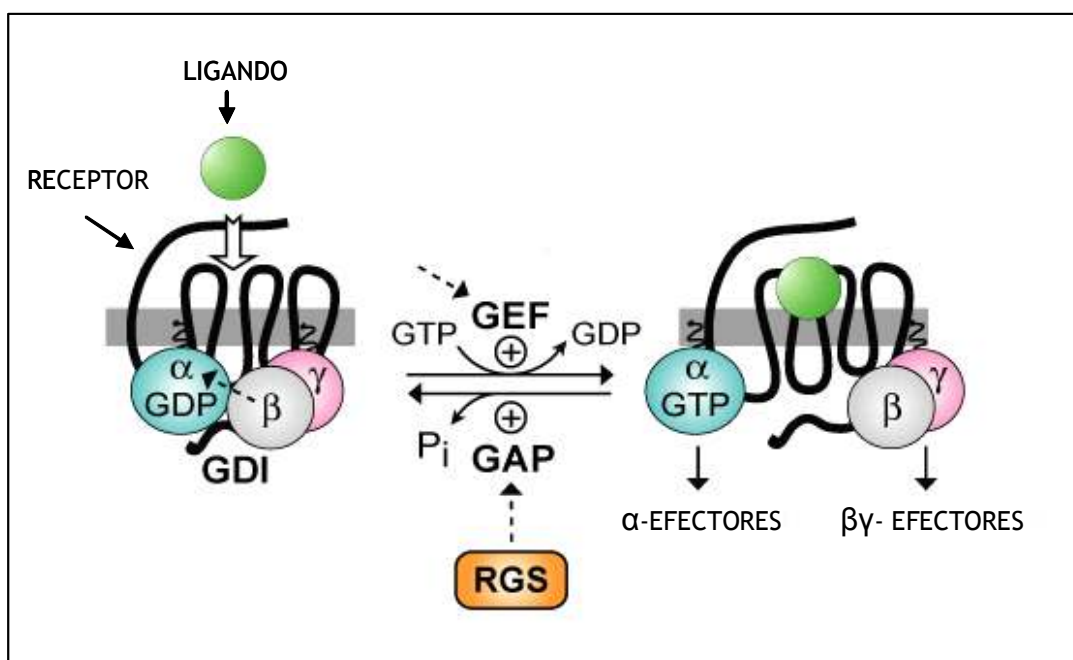


Fig. 2. Moduladores de la señalización a través de proteínas G heterotriméricas. Las proteínas GAP (*GTPase Activating Proteins*) intensifican la actividad GTPasa de la subunidad α , contribuyendo de este modo a su desactivación y permitiendo por tanto una rápida modulación de la señalización a través de proteínas G. La mayoría de las proteínas GAP pertenecen a un subtipo de proteínas conocidas como RGS (*Regulators of G proteins Signaling*), que contienen el dominio también llamado RGS que permite incrementar hasta cien veces la actividad GTPasa de las subunidades alpha. Las proteínas GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*) y el complejo $G\beta\gamma$ compiten por el mismo sitio de unión a la subunidad alpha mientras ésta se encuentra unida a GDP, por lo que la unión de GDI a $G\alpha$ produce la disociación del complejo $G\beta\gamma$ (liberándolo y por tanto permitiéndole actuar con sus efectores) e impiden el intercambio del GDP por el GTP en la subunidad alpha. Las proteínas con actividad GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) favorecen el intercambio de GDP por GTP, contribuyendo de este modo al inicio de la señalización a través de proteínas G. Los receptores asociados a proteínas G tienen actividad GEF.

Cabe resaltar que la actividad de algunos receptores GPCRs también puede ser modulada mediante una familia de proteínas llamadas RAMPs (*Receptor Activity-Modifying Proteins*), que modifican la especificidad del receptor por el ligando (Bermak y Zhou, 2001; Hepler, 2003).

Como podemos observar, la regulación de la señalización mediada por las proteínas G se puede ejercer en cada uno de los componentes de la ruta y e incluso a través de vías diferentes. Además de las ya comentadas hemos de añadir, por

supuesto, la regulación a nivel transcripcional e incluso postranscripcional de cada uno de los componentes. Probablemente esta versatilidad de la señalización a través de proteínas G ha permitido que sea, con mucho, el mecanismo de señalización transmembrana más empleado a lo largo de la filogenia evolutiva.

La complejidad de este tipo de señalización es inmensa. En este sentido hemos de añadir que la mayoría de los receptores son capaces de activar a más de un subtipo de proteína G. Por tanto, normalmente, la activación de un receptor acoplado a proteínas G resulta en la activación de varias cascadas de señalización vía distintos subtipos de proteínas G (Wettschureck y Offermanns, 2006).

La presencia de mutaciones específicas en genes que codifican para este tipo de proteínas nos puede ayudar a entender el funcionamiento de las mismas. De particular interés es la potencial utilidad de muchos de los componentes de este microsistema de señalización como nuevas dianas terapéuticas para multitud de enfermedades (Liebmann, 2004).

La subunidad $G\alpha_i$

La subunidad $G\alpha_i$ se aisló como la responsable de la inhibición en mamíferos de la enzima adenilato-ciclasa (AC) en respuesta a distintas hormonas, controlando los niveles intracelulares de AMPc. En estudios posteriores se ha descubierto que además de la AC, existen otros efectores para $G\alpha_i$, como por ejemplo la tirosina quinasa Src (Ma, YC y cols., 2000). Con el transcurso de las investigaciones, además de encontrar nuevos efectores para esta proteína, se le han otorgado numerosas implicaciones funcionales en los distintos animales donde se ha ido estudiando. Se ha podido comprobar que no solo interviene en la señalización por respuesta hormonal, sino que $G\alpha_i$ también participa en fenómenos como la división asimétrica, en organismos tan dispares como la levadura *Saccharomices cerevisiae*, los invertebrados *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, e incluso en mamíferos como el ratón (*Mus musculus*) (Huttner y Kosodo, 2005; Yu y cols., 2006). También se ha visto como en *Drosophila melanogaster* y la rana *Xenopus laevis*, $G\alpha_i$ está implicada en procesos totalmente distintos a los anteriores, mediando aspectos de la ruta de señalización de Wnt-Frizzled (Wnt-Fz). (Liu.T. y cols., 2001; Slusarski y cols., 1997; Liu y cols., 1999; Ahumada y cols., 2002).

En mamíferos se han descrito tres genes que codifican subunidades $G\alpha_i$ (*Gai1*, *Gai2*, *Gai3*). La similitud estructural entre las tres proteínas codificadas sugiere que

pueden tener funciones parcialmente redundantes. La mayoría de los estudios de mamíferos se han realizado en rata, ratón y humanos, así como estudios *in vitro* (cultivos celulares) con material derivado de estos mismos organismos (Wettschureck y Offermanns, 2004; Wettschureck y Offermanns, 2005).

Este tipo de investigaciones han arrojado a la luz interesantes funciones desempeñadas por los miembros de la familia *Gai*. Así, se ha visto que la activación de la NADPH oxidasa (complejo enzimático fundamental en la destrucción de agentes invasores a través de la respuesta inmune innata) es dependiente de esta familia proteica, implicando de esta manera a estas proteínas G en un proceso tan fundamental y conservado evolutivamente como lo es el sistema inmune innato (Marty y cols., 2006). No es ésta la única implicación de la familia *Gai* en procesos relacionados con el sistema inmune. Existen evidencias genéticas directas, en estudios realizados en ratón, de que la familia *Gai* regula la producción de citoquinas y otros factores quimioatrayentes que participan en el desarrollo de la respuesta inmune (Jonson y Druey, 2002; Xu y cols., 2003). De hecho, ratones a los que les falta, concretamente, *Gai2*, desarrollan colitis inflamatoria difusa (Hornquist y cols., 1997), que se asemeja en muchos aspectos a la colitis ulcerativa humana que también ha sido relacionada con mutaciones humanas en la familia *Gai* (Rudolph y cols., 1995). Estas patologías parecen estar causadas por un proceso inflamatorio debido a un exceso de citoquinas, cuya producción sería suprimida vía *Gai2* en condiciones fisiológicas normales (Wettschureck y Offermanns, 2004). También, en este contexto inmune, el bloqueo mediante el uso de la toxina pertúsica de los miembros de la familia *Gai* altera la migración de los linfocitos T (Spangrude y cols., 1985; Bacon y Camp, 1990). Recientemente se ha dilucidado la contribución de *Gai2* (junto con *Gao*) en la activación de otras células sanguíneas, las plaquetas (Jantzen y cols., 2001).

También es interesante el papel que tiene *Gai2* en funciones endocrinas y metabólicas, mediante la regulación de los niveles de AMPc intracelular. Ratones que expresan formas constitutivamente activas de *Gai2* en grasa, hígado y músculos esqueléticos, tienen reducidos los niveles de glucosa durante el ayuno, y a su vez muestran un incremento en la tolerancia a la glucosa (Chen y cols., 1997). Además, ratones en los que la expresión de *Gai2* ha sido bloqueada mediante ARN de interferencia tienen disminuida la tolerancia a la glucosa (Moxham y Malbon, 1996). Por lo tanto, parece ser que la regulación del metabolismo de la glucosa está mediada por rutas en las que participa la proteína G heterotrimérica *Gai2*, posiblemente a través de la insulina. Por otro lado, se sabe que la expresión de formas

constitutivamente activas de Gai2 en ratón produce tumores endocrinos (Dhanasekaran N. y cols., 1998). En humanos, mutaciones somáticas en la proteína Gai2 están relacionadas, de nuevo, con tumores endocrinos, posiblemente a través de defectos en la vía del AMPc (Lyons y cols., 1990; Dhanasekaran N. y cols., 1998; Lerman y cols., 1998).

En el sistema nervioso, Gai contribuye junto con Gao en la regulación de canales de Ca^{2+} vía $\text{G}\beta\gamma$, regulación que parece estar implicada en la modulación inhibitoria de la actividad neural (Jians y cols., 1998; Greif y cols., 2000). Por otro lado se sospecha que Gai podría estar regulando el tráfico vesicular, ya que se localiza en las vesículas sinápticas de neuronas (Ahnert-Hilger y cols., 1994), y, mediante experimentos de inmunohistoquímica y técnicas microscopía confocal *in vivo*, se ha visto que Gai3 regula el procesos de exocitosis (Kreft y cols., 1999).

En ratón, Gai participa en el desarrollo del pulmón (Kinane y cols., 1999), así como en la regulación de la contracción del músculo liso pulmonar (Chiba y cols., 2001). También se sabe, por estudios de ganancia de función realizados en ratón, que Gai2 protege de cardiopatías mediante la activación de vías adrenérgicas, asignándole de este modo un papel cardioprotector (Foerster y cols., 2003). De hecho, en humanos, mutaciones somáticas en la proteína Gai2 están relacionadas con patologías cardiacas, parece ser que a través de defectos en la vía del AMPc (Lyons y cols., 1990; Dhanasekaran N. y cols., 1998; Lerman y cols., 1998).

Los extensos estudios en ratón ponen también de manifiesto que Gai intensifica la proliferación de progenitores neurales en el cerebro (Shinohara y cols., 2004). Hay fuertes indicios que relacionan a miembros de la familia Gai con la regulación del ciclo celular, como son las alteraciones en el crecimiento celular causadas por la sobre-expresión de Gai2 (Chen y cols., 1997). También se ha visto que Gai1/2 está disminuida en cáncer de próstata (Prieto-Villapun y cols., 2005).

Solo una fracción de las múltiples funciones biológicas en las cuales está implicada la señalización mediada por proteínas G ha sido dilucidada hasta ahora. Es muy probable que muchas de sus funciones potenciales no hayan sido todavía descubiertas, debido a las importantes limitaciones que presenta su investigación en mamíferos. Estas limitaciones fundamentalmente son debidas a la redundancia funcional que poseen estas proteínas G heterotriméricas, que están muy estrechamente relacionadas entre sí, así como la presencia de una temprana letalidad embrionaria en los individuos mutantes para estas proteínas (Wettschureck y Offermanns, 2004).

La mosca *Drosophila melanogaster* nos ofrece un modelo mucho más operativo con el que poder trabajar, ya que reúne la relativa sencillez anatómica-funcional de los invertebrados y un potencial genético inalcanzable hoy en día por ningún otro modelo de estudio. Además, la falta de redundancia de estas proteínas facilita, con mucho, el estudio de las mismas. Por otro lado, el alto grado de conservación, tanto funcional como estructural, que muestran estas proteínas en gran parte de los procesos centrales del desarrollo y fisiología de distintos organismos, nos permiten predecir que las conclusiones obtenidas en *Drosophila*, facilitarán extraordinariamente el conocimiento de organismos más complejos.

***Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

Drosophila melanogaster se clasifica en el phylum Artropoda, clase Insecta, orden Diptera, familia Drosophilidae. Son moscas con una amplia distribución geográfica, encontrándose en regiones de clima templado por todo el planeta. Se trata de un animal de pequeño tamaño (unos 3mm de longitud) que se alimenta principalmente de fruta (Ashburner, 1976; Ashburner, 1989).

Este animal empezó a utilizarse en estudios de laboratorio por W. E. Castle en 1901 por su fácil mantenimiento en cautividad y su corto ciclo de vida. En la universidad de Columbia, en 1909, T.H. Morgan comenzó a utilizar *Drosophila* como modelo de estudios genéticos. Desde entonces el empleo de este organismo modelo se ha ido extendiendo por todo el mundo y hoy día está a la cabeza de los animales más empleados en los laboratorios, no solo en los de biología del desarrollo, sino en multitud de disciplinas biológicas. Este amplio uso experimental ha permitido que se hayan generado infinidad de líneas mutantes y herramientas genéticas que permiten realizar gran variedad de experimentos *in vivo* utilizando esta especie (Ashburner, 1976; 1989).

Gran parte del éxito de esta especie en su empleo en la investigación animal se debe a una suma de características que la hacen sumamente útil. Gracias a su pequeño tamaño pueden mantenerse grandes poblaciones de estos dípteros en un mínimo espacio. Su alimentación no resulta problemática y es barata. Son animales con un claro dimorfismo sexual. Esta característica resulta muy útil a la hora de trabajar con la genética de un organismo. Tienen además pocos requerimientos en

general y basta con mantenerlos a una temperatura adecuada con alimento suficiente para que se puedan reproducir y se desarrollen perfectamente. Unido a estas cualidades está el que el ciclo biológico de esta especie se completa en 10 días si se mantienen a 25° C. Además es un animal que tiene una dotación cromosómica de $n=3+1$, lo que hace más fácil su estudio. Presenta también la ventaja genética de que en los machos no se produce recombinación. Más aún, el genoma de *D. melanogaster*, que se encuentra completamente secuenciado, se caracteriza por tener pocos elementos repetidos y ser pequeño. Esto facilita en sumo grado el estudio de la función de los genes, ya que se minimizan las redundancias.

El ciclo biológico de *D. melanogaster* (figura 3) se compone de una etapa embrionaria que dura 1 día, tres estadios larvarios (LI, LII y LIII) que en conjunto duran 4 días (los estadios LI y LII duran 1 día cada uno y el estadio de LIII dura 2 días) y una etapa de pupa que dura 5 días. Al finalizar este último estadio emergen de la pupa los imagos tras la metamorfosis, en perfectas condiciones para reproducirse y proseguir el ciclo vital con una nueva generación. Durante esos 10 días se van formando las diversas estructuras que forman parte de los individuos adultos. Por ejemplo, las estructuras cuticulares adultas comienzan a formarse ya en el embrión.

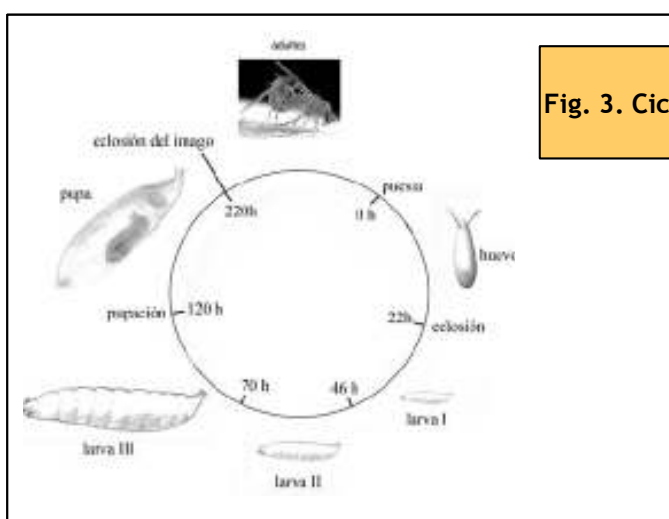


Fig. 3. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*

La subunidad Gai en *Drosophila melanogaster*

Proteínas G heterotriméricas en *Drosophila melanogaster*

Los receptores asociados a proteínas G conocidos en *Drosophila* rondan los 200 (Randall y cols., 2006), y han sido clasificados en 4 familias atendiendo a su

homología con los conocidos en vertebrados. Los estímulos a los que responden, como en el caso de otros organismos, van desde la luz hasta hormonas peptídicas o neuropéptidos. En *Drosophila* se conocen cinco genes que codifican proteínas G α (*Gai*, *Gao*, *Gas*, *Gaq* y *Gaf*), y, a diferencia de mamíferos, existe un único gen para cada tipo de subunidad alpha. De esta manera, la redundancia debida a la existencia de distintos subtipos no existe (Ishimoto y cols., 2005). Por otro lado, existen 2 genes que codifican proteínas G β (*G β 13F* y *G β 76C*) y 2 que codifican G γ (*G γ 1* y *G γ 30A*) (<http://flybase.indiana.edu>). Mutaciones en algunos de estos genes han permitido esclarecer la función de estas proteínas.

En *Drosophila*, *Gas* es necesario para el normal crecimiento y función de las sinapsis neuromusculares, ya que en mutantes para *Gas* se produce un decremento significativo del número de botones sinápticos, de la extensión de la arborización sináptica así como de la facilitación de la actividad sináptica (Wolfgang y cols., 2004). De *Gas* también se conoce su implicación en la percepción del dulce, probablemente a través de la regulación de los niveles de AMPc (Ueno y cols., 2006). La expresión de formas constitutivamente activas de proteína *Gas* deteriora las habilidades de aprendizaje de la mosca. La proteína *Gao* de *Drosophila* participa en la formación del corazón (Fremion. F. y cols., 1999), y está implicada en la ruta de polaridad celular señalizada por Frizzled (*Fz*) (Katanev y cols., 2005). Además, muy recientemente se ha conocido que también la señalización a través de *Gao* es requerida para el aprendizaje asociativo en la mosca (Ferris y cols., 2006). Por último, de *Gaq* se conoce su implicación en el fenómeno de la fototransducción (Elia y cols., 2005).

Centrándonos en *Gai* hemos de decir que el conocimiento de dicha subunidad ha sido exiguo hasta hace poco tiempo. Los estudios anteriores al comienzo de esta tesis doctoral (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990; Wolfgang y cols., 1991; Wolfgang y cols., 1995) analizaron el patrón de expresión espacio-temporal tanto del ARNm como la proteína *Gai* mediante *northern blot*, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en cortes de parafina. La proteína *Gai* se detecta ya en el comienzo de la embriogénesis (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990), lo que sugiere un fuerte componente materno de la proteína. La presencia de proteína persiste en la embriogénesis tardía, localizándose principalmente en el sistema nervioso central (SNC), cardioblasto presuntivo, glándula protorácica y órganos cordotonaes (Wolfgang y cols., 1990). Los estudios de larva y adulto son más escasos,

pero en líneas generales se mantiene la señal descrita en embriogénesis tardía (Wolfgang y cols., 1990).

Durante el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se han publicado artículos en los que se ha descrito la implicación de Gai en fenómenos de división asimétrica tanto de neuroblastos como de precursores de órganos sensoriales, así como su participación en el desarrollo y formación de la barrera hematoencefálica (Yu y cols., 2006; Schwabe y cols., 2005).

Papel de Gai en la división asimétrica de neuroblastos

Recientemente se ha publicado la implicación de las proteínas G en procesos de división asimétrica, tanto en *Drosophila* como en otros organismos como el gusano *C.elegans*, la levadura *S.cerevisiae* o en ratón (Knoblich, 2001; Huttner y Kosodo, 2005). En *Drosophila*, la implicación de las proteínas G en este tipo de división, ha sido estudiada fundamentalmente en neuroblastos, aunque también se ha descrito en los precursores de los órganos sensoriales (SOPs) (Schaefer y cols., 2001; Fenwei Yu y cols., 2003).

Las neuronas en el sistema nervioso central embrionario de *Drosophila* derivan de unos progenitores neurales llamados neuroblastos (NBs). Los neuroblastos se forman por delaminación de un epitelio especializado llamado neuroectodermo ventral. Los NBs se dividen asimétricamente a lo largo del eje apico-basal (figura 4), produciendo dos células hijas de distinto tamaño e identidad. La célula hija basal es la más pequeña y se llama Célula Madre Ganglionar (CMG), que sufre solo una división más para producir dos neuronas, o una neurona y una célula glial. La célula hija apical es la más grande, retiene la identidad de neuroblasto y sufre distintas divisiones asimétricas de las cuales surgen distintas CMGs basales (Jan y Jan, 2001; Knoblich, 2001; Fuse y cols., 2003; Betschinger y Knoblich, 2004; Wang y Chia, 2005; Yu y cols., 2006).

Para que estas divisiones asimétricas se produzcan de la forma correcta han de cumplirse tres requisitos fundamentales: (1) La correcta localización y segregación de determinantes de destino celular (tales como Prospero y Numb así como sus proteínas adaptadoras Miranda y Pon respectivamente), (2) la orientación apico-basal del huso mitótico, y (3) la generación de un huso mitótico asimétrico, con una predominancia del huso apical (figura 4). Esta asimetría en el huso es la responsable directa de la diferencia de tamaños entre las células hijas (Knoblich 2001; Giansanti y cols., 2001;

Cai y cols., 2003). Para que los determinantes de destino celular se segreguen de forma correcta, la orientación del huso mitótico ha de estar coordinada con la localización de estos determinantes (Wang y Chia, 2005).

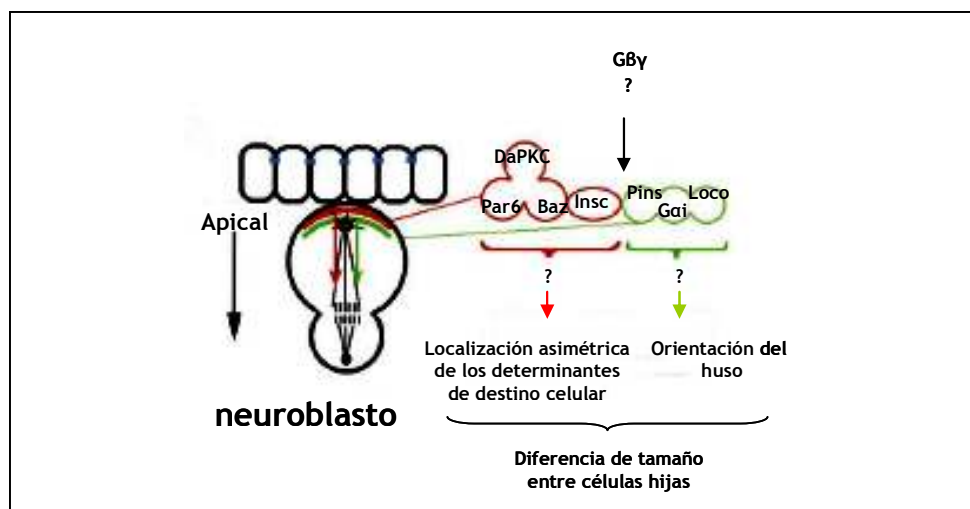


Fig. 4. Componentes de la división asimétrica de neuroblastos. Tanto la localización asimétrica de los determinantes de destino celular, como la orientación y asimetría del huso son controlados por el complejo apical, que comprende dos rutas de señalización parcialmente redundantes: DmPar6/Bazooka/DaPKC (llamadas en su conjunto proteínas Par) y Pins/Gai(Gao) - Loco/Gai(Gao). La localización basal de los determinantes depende fundamentalmente de las proteínas Par, mientras que Pins/Gai/LoCo tienen un papel predominante en la orientación del huso mitótico. Sin embargo, ambos complejos parecen presentar cierta redundancia funcional en la determinación de la asimetría del huso, y por tanto en la generación de dos células de diferente tamaño. El heterodímero Gβγ libre (y por tanto activo) es requerido para la localización asimétrica de los componentes apicales, y para la formación de un huso asimétrico, pero la relación jerárquica de Gβγ respecto a los demás componentes no está clara. Modificado de Cai y cols., 2003

Estos aspectos de la división asimétrica son controlados por un complejo proteico localizado apicalmente (complejo apical) que comprende dos rutas de señalización parcialmente redundantes: DmPar6/Bazooka/DaPKC (llamadas en su conjunto proteínas Par) y Pins/Gai(Gao)-LoCo/Gai(Gao), siendo la proteína Inscuteable el nexo de unión entre las dos rutas (figura 4). Las proteínas del complejo apical Pins y Loco poseen dominios denominados GoLoco, los cuales poseen actividad GDI, es decir, mediante este dominio tienen la capacidad de unirse a la subunidad Gai cuando esta está unida a GDP, estabilizando este complejo y liberando (y por tanto activando) al heterotrímero βγ (Kimple y cols., 2002; Yu y cols., 2005). Tanto Loco como Pins compiten por su unión a Gai.

Mutaciones que afecten a algún componente del complejo apical conducen a defectos en la orientación del huso mitótico y en la localización de los componentes basales, aunque apenas se verá afectada la asimetría del huso (Kraut y col, 1996; Yu y cols., 2000; Kaltschmidt y cols., 2000; Petronczki y Knoblich, 2001; Kaltschmidt y Brand, 2002; Cai y cols., 2003; Yu y cols., 2003). Para que estos defectos aparezcan con una alta frecuencia, y para que la asimetría de huso se vea afectada (produciendo células hijas del mismo tamaño) es necesario mutar componentes de ambas vías, que muestran por tanto cierta redundancia en sus funciones (Cai y cols., 2003). Sin embargo, a pesar de existir cierta redundancia, parece que la localización basal de los determinantes depende fundamentalmente de las proteínas Par, mientras que Pins/Gai/LoCo tienen un papel predominante en la orientación del huso mitótico. Ambos complejos participan en la determinación de la asimetría del huso (Wozard y cols., 1999; Schober y cols., 1999; Betschinger y cols., 2003; Izumi y col, 2004). A su vez, la correcta localización de Pins-Gai durante la delaminación del neuroblasto depende de las proteínas Par (Cai y col, 2003; Izumi y cols., 2004). Sin embargo, cuando el neuroblasto ha completado el proceso de delaminación, la localización de todas las proteínas es dependiente unas de otras, de manera que en ausencia de un miembro las otras se muestran parcialmente deslocalizadas (Schober y cols., 1999; Wodarz y cols., 1999; Schaefer y cols., 2000; Cai y cols., 2003).

La pérdida de función tanto de Gai como de Pins o LoCo causa un fenotipo muy similar: el 21% de los NBs embrionarios presentan alterada la división asimétrica. Es importante observar el bajo porcentaje con el que aparece este fenotipo, que parece deberse por un lado a la posible redundancia de funciones que presenta el complejo apical, y por otro a la redundancia que muestran Gai y Gao en la regulación del heterodímero $G\beta\gamma$, el cual también tiene un papel activo en el fenómeno de la división asimétrica (Yu y cols., 2003; Yu y cols., 2005).

El heterodímero $G\beta\gamma$ está formado por las subunidades $G\beta_{13F}$ y $G\gamma_1$. El análisis de la pérdida de función de $G\beta_{13F}$ o $G\gamma_1$, así como de la sobre-expresión de Gai o Gao en neuroblastos, que produce un secuestro del heterodímero $G\beta\gamma$, han demostrado que $G\beta\gamma$ libre (y por tanto activo) es requerido para la localización asimétrica de los componentes apicales, y para la formación de un huso asimétrico (Schaefer y cols., 2001; Fuse y cols., 2003; Yu y cols., 2003; Yu y cols., 2005). Sin embargo la relación jerárquica de $G\beta\gamma$ respecto a los demás componentes no está clara. Además, en mutantes de falta de función para cualquiera de los componentes del heterodímero $G\beta\gamma$ se reducen los niveles de proteína Gai, parece ser que por

degradación de la misma (Schaefer y cols., 2001). Entonces, dado que los niveles de $G_{\alpha i}$ regulan los de $G\beta\gamma$ y viceversa, se torna muy difícil establecer una relación jerárquica entre ellos.

La liberación, y por tanto la activación del heterodímero $G\beta\gamma$ no parece realizarse a través de receptor, sino de manera redundante a través de la actividad GDI de los dominios GoLoco de las proteínas Pins y Loco. Estas proteínas facilitarían la disociación del heterodímero uniéndose y estabilizando a la $G_{\alpha i}$ unida a GDP (Takesono y cols., 1999, Natochin y cols., 2000 y Schaefer y cols., 2001). La falta de función simultánea de Pins y Loco produce defectos fenotípicos indistinguibles de aquellos observados en la falta de función de $G\beta 13F$ o $G\gamma 1$ (Yu y cols., 2005), mientras que la falta de función de $G_{\alpha i}$ produce defectos en muy bajo porcentaje. ¿Cómo se explica esta aparente contradicción? Basándonos en el fenotipo de falta de función, podemos decir que $G_{\alpha i}$ parece jugar un papel menos importante que $G\beta\gamma$ en la generación de un huso asimétrico, y por tanto en la generación de células hijas de distinto tamaño (Yu y cols., 2005). Sin embargo, Pins y Loco son esenciales para la activación de $G\beta\gamma$, componente esencial en este proceso. Se ha demostrado que ambas proteínas también se unen y regulan a $G_{\alpha o}$. $G_{\alpha o}$ se expresa en neuroblastos y la sobre-expresión de $G_{\alpha o}$ produce alteraciones en el patrón de división de neuroblastos. Además, $G_{\alpha o}$ es esencial en la división asimétrica de los precursores de los órganos sensoriales (SOPs). Por tanto, es posible que $G_{\alpha o}$ tenga un papel predominante sobre $G_{\alpha i}$, pero para responder a esto hay que esperar a poder analizar la pérdida de función de $G_{\alpha o}$ (mutaciones $G_{\alpha o}^-$ son letales en la línea germinal).

Por último, el correcto balance entre los niveles de $G_{\alpha i}$ -GDP y $G_{\alpha i}$ -GTP, y probablemente de $G_{\alpha o}$ -GDP/ $G_{\alpha o}$ -GTP, son cruciales para la localización asimétrica de los componentes apicales, debido a que la liberación del complejo $G\beta\gamma$ depende del guanilnucleótido unido a la subunidad $G_{\alpha i}$. Este balance está regulado, al menos en gran parte, por el dominio RGS que posee la proteína Loco, que, como ya hemos comentado anteriormente, tiene actividad GAP, que facilita la conversión de GTP en GDP en $G_{\alpha i}$, y por tanto inhibe así la señalización de las proteínas G (Yu y cols., 2001; Yu y cols., 2005). Por tanto, la proteína Loco estaría regulando la actividad de las proteínas G a través de dos mecanismos distintos, uno mediante el dominio GoLoco (actividad GDI), con el que permitiría la liberación del complejo $\beta\gamma$, y el otro mediante el dominio RGS (actividad GAP), con el que obligaría a la reasociación del heterotrímero y pondría fin de esta manera a la señalización de las proteínas G (Wang y cols., 2005).

En el caso de los precursores de órganos sensoriales (SOPs), la división asimétrica ocurre esencialmente de una manera muy similar, salvo que *Inscuteable* no participa en ella. Las células se dividen asimétricamente en el eje antero-posterior con los mismos mecanismos que en el caso de los neuroblastos, para lo que requieren por tanto la participación del complejo Pins/Gai/LoCo/Gao. Por tanto, la participación de las proteínas G es también imprescindible en este proceso, aunque en este tipo celular está demostrado que Gao es el componente esencial, que transduce la señal de polaridad activada por la unión del ligando Wingless (Wg) al receptor Frizzled (Fz), mientras que, de nuevo, Gai desempeña un papel secundario (Katanaev y cols., 2005; Katanev y Tomlinson, 2006). La señalización Wg-Fz está muy conservada a lo largo de la escala evolutiva (Wang y Malbon, 2006).

Como hemos comentado, recientemente se ha publicado la implicación de las proteínas G en procesos de división asimétrica en ratón (*Mus musculus*), demostrando una vez más, el alto grado de homología, no solo en estructura sino también en función, que presenta este tipo de proteínas a lo largo de la filogenia (Knoblich, 2001; Huttner y Kosodo, 2005).

Papel de Gai en el desarrollo de la glia de *Drosophila melanogaster*

Históricamente, las neuronas han sido el centro de atención de aquellos que se han interesado en el estudio del sistema nervioso, independientemente del modelo animal elegido. Sin embargo en los últimos años la glia está mostrando ser el gigante dormido de la neurociencia, y poco a poco, el velo de misterio que la rodea va desapareciendo según se le van otorgando nuevas e importantes funciones.

Las células de la glia están íntimamente asociadas a las neuronas; en los humanos la glia constituye un 90% de la masa cerebral. Se ha comprobado que la diversificación de las células gliales correlaciona con un aumento de la complejidad del sistema nervioso. Esta observación está siendo confirmada por el creciente número de funciones que les está siendo asignada a la glia (Jones, 2004).

Homología funcional entre la glia de vertebrados e invertebrados

Las homologías funcionales entre la glia de vertebrados e invertebrados son más grandes de lo que se pensaba. En vertebrados e invertebrados, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP), las células de la glia no actúan como un

sustrato pasivo en el que crecen y se desarrollan las neuronas y las redes que éstas conforman, sino que las células gliales contribuyen a la migración de las neuronas a través de la producción de pistas, reguladas por rutas como la del *Epidermal Growth Factor* (EGF). Así por ejemplo, en el caso del SNC de *Drosophila*, la glia lateral del neuropilo responde a la proteína Vein secretada por los axones, que se une y activa al receptor de tipo EGF en las células gliales (Griffiths e Hidalgo, 2004). Estas mismas interacciones de señalización también existen entre neuronas y glia en el desarrollo embrionario de vertebrados, donde se han identificado rutas en las que participa de nuevo un receptor del tipo EGF. Cabe destacar que aquí la complejidad es mayor que en el caso de *Drosophila*, ya que por ejemplo se han identificado varios genes que codifican receptores del tipo EGF (Seep y cols., 2003). Entre los ligandos de la ruta de vertebrados reseñamos que se ha identificado un homólogo de Vein llamado Neurogulina, aunque en el caso de vertebrados la Neurogulina actúa en el SNP. Errores en la ruta de señalización del tipo EGF resultan en defectos de fasciculación tanto en axones sensoriales como axones motores (Seep y cols., 2003). En este sentido es digno de mencionar las similitudes entre vertebrados e insectos en el papel que juega la glia, mediante interacciones similares a las anteriormente descritas, en el proceso de formación tanto de la retina como del bulbo olfativo (Tayler y cols., 2004, Tolbert y cols., 2004).

Volvemos a encontrar homologías funcionales en el caso de la protección iónica que ofrece la glia a las neuronas y sus axones. En el caso de los insectos, la hemolinfa que poseen contiene una alta concentración de iones potasio. Para evitar la entrada de estos iones en el líquido que baña a las redes neuronales, se ha desarrollado una barrera hematoencefálica creada por las células gliales de superficie. La barrera física está formada por uniones septadas que sellan las células que conforman esta barrera. En el SNP también existe una barrera que físicamente impide la permeabilidad de los iones. Esta barrera la conforman las células gliales que rodean a los axones, las cuales están íntimamente unidas de nuevo por uniones septadas (Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005). Por otro lado, en el fluido que baña a los axones, las concentraciones iónicas (principalmente de Na^+ y K^+) se mantienen gracias a la acción de bombas situadas en las células gliales que rodean a estos axones (Lane y cols., 1982). Esta es una función altamente análoga a la que realizan las células gliales en el sistema nervioso de vertebrados, donde juegan un papel crucial manteniendo los niveles de K^+ mediante la utilización de bombas análogas a las identificadas en insectos (Kofuji y Newman, 2004).

Además de la homeostasis iónica y las funciones de barrera, la glia de los insectos juega un papel importante en las interacciones metabólicas con los axones a los que rodean, otra característica común con la glia de vertebrados. Existen evidencias de que la glia de *Drosophila* tiene un papel activo en la re-captación de neurotransmisores en la hendidura sináptica, pudiendo jugar cierto papel modulador en la sinapsis (Besson y cols., 1999). En la glia de vertebrados, concretamente en los astrocitos, también son bien conocidos estos fenómenos de recaptación (Marcaggi y cols., 2004).

Desarrollo de la glia en *Drosophila melanogaster*: implicación de la señalización por proteínas G heterotriméricas

En el embrión de *Drosophila* encontramos aproximadamente 60 células gliales y 700 neuronas en cada neurómero abdominal, es decir, la glia representa aproximadamente el 10% de las células que componen el SNC. Estas células gliales se han clasificado atendiendo a la posición, morfología y, fundamentalmente, por la expresión de marcadores moleculares. Basándonos en la posición y en la expresión de dichos marcadores, podemos realizar una clasificación muy útil de las células de la glia (figura 5). Esta clasificación dividiría la glia en dos grandes grupos: la glia lateral y la glia de la línea media (Klambt y cols., 1996; Granderath y cols., 1999).

La glia de la línea media está situada dentro del neuropilo, tiene su origen en el mesectodermo, y su desarrollo depende de genes de polaridad segmental, que determinan valores posicionales, y del gen *single minded* (Crews y cols., 1988; Hummel y cols., 1999). La función principal de este tipo de glia es la separación de las comisuras (dos paquetes axonales que unen de forma metamérica a los dos tractos axonales longitudinales, de manera que la comisura anterior y la comisura posterior establecen el principio y fin de cada metámero neuronal o neurómero) y la correcta organización de fascículos axonales en las comisuras (Shandala y cols., 2003).

La glia lateral es un grupo heterogéneo de células provenientes del neuroectodermo ventral que comprende: la glia de superficie (que a su vez se subdivide en glia de salida, glia subperineurial) que forma la barrera hematoencefálica, las células de la glia del cortex (también llamadas células gliales del cuerpo celular), y la glia lateral del neuropilo (que a su vez comprende células gliales A y B y la glia longitudinal) (ver figura 5) (Jacobs y cols., 1989; Klambt y cols.,

1991; Udolf y cols., 1993; Ito y cols., 1995; Bossing y cols., 1996; Campos Ortega y Hartenstein, 1997; Schmidt y cols., 1997; Schmid y cols., 1999; Sepp y cols., 2000).

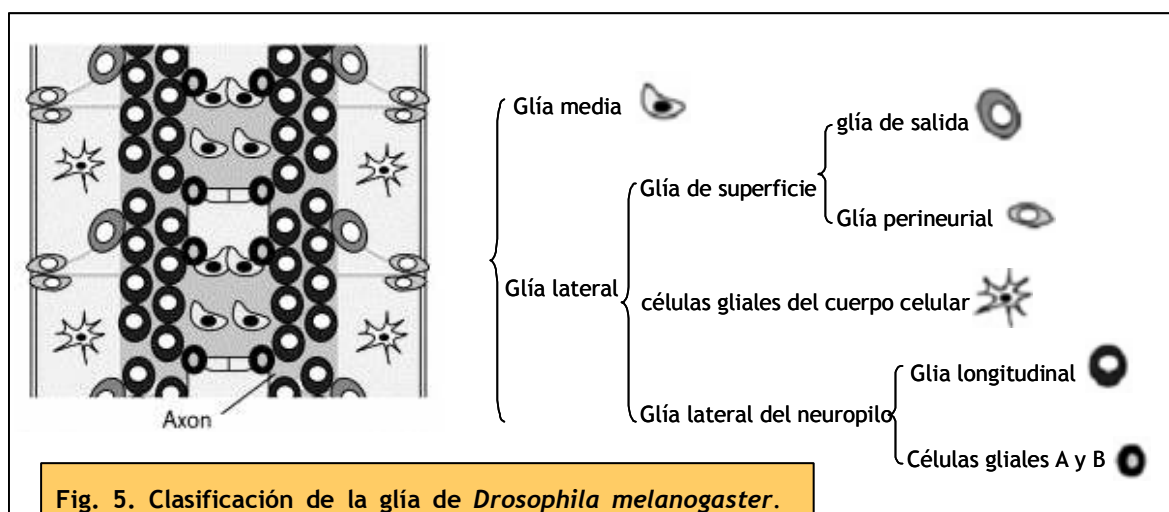


Fig. 5. Clasificación de la glía de *Drosophila melanogaster*.

Disposición de los distintos tipos de células gliales en la cuerda ventral embrionaria de *Drosophila melanogaster*. La glía mayoritariamente se clasifica en dos grandes grupos: la glía de la línea media y la glía lateral. La glía lateral es un grupo heterogéneo de células, que comprende: la glía de superficie (incluye glía de salida y glía subperineurial), que forma la barrera hematoencefálica; las células de la glía del cortex (también llamadas células gliales del cuerpo celular); y la glía lateral del neuropilo (que a su vez comprende células gliales A y B y la glía longitudinal) (modificado de Granderath y cols., 1999)

El desarrollo y la temprana diferenciación de todas las células de la glía lateral (entre ellas la glía lateral del neuropilo) dependen estrictamente de la función de un gen maestro denominado *gcm* (*glial cells missing*) que codifica un factor de transcripción que actúa a modo de interruptor. Las células que expresan *gcm* adquieren características gliales, mientras que la ausencia de *gcm* especifica características neuronales, determinando así la correcta inicialización de la gliogénesis (Hosoya y cols., 1995; Jones y cols., 1995; Vincent y cols., 1996; Klämbt y cols., 2001).

Las siguientes etapas de la gliogénesis lateral ocurren a través de la activación transcripcional de genes diana situados jerárquicamente por debajo de *gcm*. Por un lado se persigue promover la diferenciación celular de la glía, mediante la activación de los factores de transcripción Repo y Pointed. Los genes que codifican ambas

proteínas son dependientes de *gcm*, se expresan en toda la glia lateral y están implicados en el programa de desarrollo tardío y diferenciación glial. De manera simultánea se impide el desarrollo neuronal mediante la activación del represor transcripcional codificado por el gen *tramtrack p69 (ttkp69)*, el cual es un inhibidor del destino neuronal (Giesen y cols., 1997; Granderath y Klambt, 2000; Klambt y cols., 2001; Jones, 2001; Jones, 2004). Sin embargo, esta compleja red reguladora que encontramos jerárquicamente por debajo de *gcm* no es estrictamente lineal. Se ha comprobado que tanto *gcm* como *repo*, *pointed* y *ttkp69* aparecen cooperando en el mantenimiento de la expresión de otros genes específicos de glia.

Uno de estos genes es *loco*, protagonista también en el apartado de la división asimétrica. El gen *loco* fue aislado por Granderath y colaboradores en una búsqueda de genes críticos para el desarrollo tardío y diferenciación de la glia (Granderath y cols., 1999). Este mismo grupo describe a *Loco* como una proteína con un dominio Go-Loco y un dominio RGS (con actividad GAP) que interacciona físicamente con *Gai*. La expresión inicial de *loco* es dependiente de la función de *gcm*, pero durante estados posteriores del desarrollo embrionario la transcripción de *loco* parece estar bajo control directo de *pointed* y *repo* (Granderath y cols., 1999; Yuasa y cols., 2003).

loco se expresa a lo largo del desarrollo en toda la glia lateral. Los embriones mutantes *loco* tienen una morfología general normal, pero tienen problemas para salir del huevo. En estudios inmunohistoquímicos realizados en estos embriones mutantes, en los que se analiza la expresión de marcadores específicos de la glia lateral, se observa que los núcleos de las células de la glia lateral aparecen en una posición más variable que en individuos silvestres (Granderath y cols., 1999). Análisis ultraestructurales de mutantes homocigóticos *loco* revelan defectos en la diferenciación de la glia lateral, concretamente en la glia de superficie que forma la barrera hematoencefálica (Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005). La barrera hematoencefálica la constituye la glia de superficie al final del desarrollo embrionario. Esta barrera rodea al SNC, aislándolo de la alta concentración de potasio que presenta la hemolinfa, y garantizando por tanto la correcta propagación de los potenciales de acción. En los mutantes *loco*, las células gliales de superficie tienen dificultades para envolver y sellar correctamente los tractos axonales longitudinales del SNC, lo que deriva en un aislamiento iónico defectuoso por parte de dicha barrera. Rara vez nace algún individuo adulto mutante homocigótico para el gen *loco*, pero cuando lo hace muestra dañadas las capacidades locomotoras (de ahí el nombre del gen). Concluyendo, *Loco* participa en el desarrollo final y diferenciación celular

de la glia lateral en general y de la glia de superficie en particular (Granderath y cols., 1999; Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005).

Se han identificado más componentes que trabajan junto con Loco en la formación de la barrera hematoencefálica. Estos componentes son: un receptor acoplado a proteínas G llamado Moody y las subunidades G α , G α i y G β γ de las proteínas G heterotriméricas. En última instancia, son las uniones septadas entre las células gliales de superficie las que físicamente mantienen la impermeabilidad iónica de la barrera hematoencefálica. Para la correcta formación y mantenimiento de estas uniones septadas se requiere la estabilización de la actina cortical, y las últimas investigaciones demuestran que las proteínas G (G α , G α i y G β γ) regulan y estabilizan la disposición de esta actina cortical, y por tanto las uniones septadas. Estudios de falta de función y sobre-expresión demuestran que G β γ y G α tienen un papel más activo en la estabilización de la actina cortical, mientras que G α i parece participar indirectamente en este proceso, regulando al heterodímero G β γ . Así que mientras que la falta de función de G α resulta en defectos importantes en la formación de la barrera hematoencefálica, la falta de función de G α i produce defectos leves. Por otro lado, la sobre-expresión en glia de formas silvestres tanto de G α i como de G α provoca defectos importantes en la formación de esta barrera, probablemente a causa del secuestro de G β γ (Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005). Finalmente, la sobre-expresión glial de formas constitutivamente activas de G α i no tiene efectos sobre el desarrollo de la barrera hematoencefálica, mientras que formas constitutivamente activas de G α alteran profundamente la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que la acción de G α -GTP, pero no de G α i-GTP, sobre sus efectores tiene un papel relevante en la formación de la barrera hematoencefálica. En este esquema, el receptor Moody actuaría como regulador positivo de las proteínas G, y Loco (a través de su dominio RGS) como regulador negativo. Sin embargo, sorprendentemente, la pérdida de función de ambos producen el mismo fenotipo: una interrupción del aislamiento de las neuronas del SNC. Este fenómeno no es común, y normalmente se observa en rutas que generan una señal, o bien localizada, o bien cuantificada en esa célula (Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005).

Al inicio de esta tesis doctoral apenas se conocían funciones de G α i en *Drosophila*. A lo largo del desarrollo experimental de esta tesis han ido apareciendo publicaciones en las que se han ido descubriendo implicaciones de esta subunidad en

la fisiología y desarrollo de este organismo. Sin embargo, los resultados publicados, en los que se implica a *Gai* en fenómenos de división asimétrica y formación de la barrera hematoencefálica, sugieren que *Gai* tiene una función secundaria en estos procesos, y que el protagonismo real lo adquiere $G\beta\gamma$ y/o *Gao*. En ambos procesos, se cumple que: 1) la falta de *Gai* produce fenotipos mucho más leves que la falta de *Gao* y/o $G\beta\gamma$; 2) la sobre-expresión de formas constitutivamente activas de *Gai* no genera fenotipos aparentes, mientras que la sobre-expresión de formas constitutivamente activas de *Gao* altera gravemente el proceso; y 3) la sobre-expresión de formas silvestres de *Gai* y *Gao* da lugar a alteraciones graves, aparentemente por el secuestro de $G\beta\gamma$. Nuestro objetivo es identificar procesos en los que *Gai* tenga un papel principal. Para ello, en el desarrollo de esta tesis doctoral, hemos estudiado con detalle el papel que tiene la subunidad *Gai* en el desarrollo de *Drosophila*, estudiando en detalle diferentes aspectos de la fisiología y desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

Antecedentes

Aislamiento de mutantes en el gen que codifica la proteína *Gai* en *Drosophila melanogaster*

Una mutagénesis de ganancia de función realizada por la Dra. Torroja identificó el producto del gen *Gai* como una proteína candidata a participar en procesos de tráfico vesicular en neuronas. La mutagénesis de ganancia de función se basa en el sistema UAS-Gal4 (Brand y Perrimon, 1993; ver materiales y métodos), y permite sobre-expresar genes al azar en tejidos específicos de *Drosophila*, en busca de fenotipos concretos. Los elementos Gal4 y UAS se introducen en la mosca mediante elementos P transponibles que se insertan al azar en el genoma (ver materiales y métodos para una explicación más detallada de estas técnicas). Una de las inserciones (del tipo UAS) se produjo en el primer exón del gen que codifica la proteína *Gai* (ver figura 6). Este elemento P se llamó $P(y^+=UAS) \textit{Gai}^{367}$.

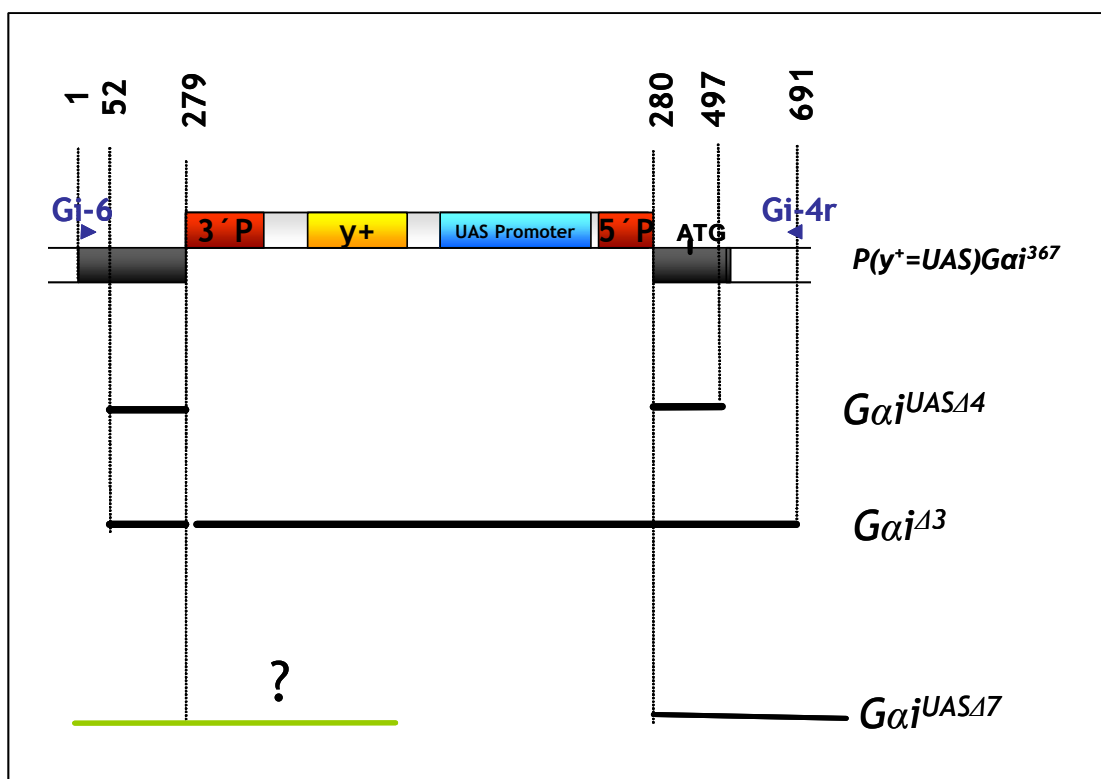


Fig. 6. Mapa de alelos mutantes en *Gai* de *Drosophila*. El esquema superior muestra el primer exón (rectángulo gris) del gen *Gai* con la inserción $P(y^+=UAS)$ presente en el alelo $P(y^+=UAS)Gai^{367}$, flanqueado por secuencias intrónicas (rectángulos blancos abiertos). Debajo, las barras representan las regiones delecionadas en cada uno de los alelos mutantes generados a partir de $P(y^+=UAS)Gai^{367}$. El mutante $Gai^{\Delta 3}$ deleciona la práctica totalidad del primer exón (excepto los 52 primeros nucleótidos), incluida la señal de iniciación de traducción ATG, todo el elemento P y 194 nucleótidos del primer intrón. El alelo $Gai^{UAS\Delta 4}$ tiene delecionado gran parte del primer exón, dejando intactos los 52 primeros y los 13 últimos nucleótidos del mismo y la totalidad del elemento P (por tanto conserva tanto las secuencias UAS como el marcador y^+). Al mutante $Gai^{UAS\Delta 7}$ le falta la práctica totalidad del primer exón (incluyendo el ATG de iniciación) y gran parte del primer intrón (hasta el nucleótido 3753), aunque desconocemos la extensión de la deleción en la región 5' del gen (barra verde). En éste mutante, el elemento P está parcialmente delecionado, habiendo perdido el marcador y^+ aunque conserva las secuencias UAS.

A partir de la inserción $P(y^+=UAS) Gai^{367}$, y mediante el uso de técnicas genéticas de movilización de transposones (Preston y cols., 1996; Preston cols., 1996), se generaron las líneas mutantes: $Gai^{UAS\Delta 4}$, $Gai^{\Delta 3}$, $Gai^{UAS\Delta 7}$, con deleciones en la región 5' del gen *Gai* (Figura 6). Estas tres mutaciones delecionan el codón ATG de inicio de la traducción. El mutante con mayor parte delecionada es $Gai^{UAS\Delta 7}$, al que le falta la práctica totalidad del primer exón (incluyendo el ATG de iniciación) y gran parte del primer intrón. El elemento P, en éste mutante, está parcialmente delecionado, habiendo perdido el marcador y^+ aunque conserva las secuencias UAS. La deleción de $Gai^{\Delta 3}$ cubre la práctica totalidad del primer exón (excepto los 52 primeros

nucleótidos), todo el elemento P y 194 nucleótidos del primer intrón. El alelo *Gai*^{UASΔ4} tiene deleciónada parte del primer exón, excepto los 52 primeros y los 13 últimos nucleótidos del mismo. Este mutante mantiene intacto el elemento P (por tanto conserva tanto las secuencias UAS como el marcador y⁺).

Al inicio de esta tesis doctoral no estaban publicados otros mutantes en el gen *Gai* aislados en *Drosophila*.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es indentificar los procesos en los que *Gai* juega un papel predominante, en el desarrollo y fisiología de *Drosophila melanogaster*, y especialmente en el sistema nervioso central de este organismo. Para conseguir este objetivo nos hemos propuesto:

- 1.- Estudio detallado del patrón de expresión espacio-temporal del gen *Gai*, poniendo especial atención a la expresión que pueda tener en el SNC. Para poder realizar este estudio nos proponemos generar una herramienta que nos permita expresar genes marcadores bajo el promotor del gen *Gai*.
- 2.- Caracterización y análisis del fenotipo de los mutantes de falta de función para el gen *Gai* de *Drosophila* generados en nuestro laboratorio. Este análisis lo realizaremos a lo largo del desarrollo de *Drosophila*, incidiendo de forma especial en el sistema nervioso.
- 3.- Estudio del efecto de la expresión ectópica de formas normales y mutadas de la proteína *Gai*.

Materiales y métodos

Estirpes de *Drosophila*

Todas las estirpes utilizadas pertenecen a la especie *Drosophila melanogaster*. Su cuidado y manipulación se realizó siguiendo técnicas clásicas descritas por Asburner (1989). Todas las estirpes fueron cultivadas en un medio compuesto por azúcar (7 %), agar (1.15 %), levadura (10 %) y harina de trigo (5 %), utilizando ácido propiónico (0.5 %) como antimicótico, y crecidas a 25 °C con una humedad relativa del 60% y bajo un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad.

Las cepas utilizadas como tipo silvestre fueron *Canton S* y *Oregón R*. Para el desarrollo de este trabajo se han usado las siguientes estirpes de moscas:

- Para el estudio del patrón de expresión: las líneas *UAS-GFPnls* (Bloomington Stock Center) y *UAS-lacZ* (Brand y Perrimon, 1993).
- Para la transposición dirigida: las líneas *y w P(w⁺)Gal4;AbdB^{lacZ}/TM3 Sb, ry⁵⁰⁶ DfC7/TM3 Sb Δ2-3*, y *y w;TM3 Sb/TM6B* (cedidas todas ellas por G. Morata).
- Los alelos mutantes utilizados para el estudio de falta de función han sido: *Gai^{UASΔ4}*, *Gai^{UASΔ7}* y *Gai^{Δ3}* (creados por la Dra. Torroja en el laboratorio de la Dra. White).
- Para el estudio de sobre-expresión de la subunidad Gai: las líneas *w;UAS- Gai(II)* y *w; UAS- Gai(III)* (cedidas por el Dr. Forte).
- Para el estudio de la expresión de formas constitutivamente activas: *w;UAS- Gai constitutiva (II)* y *w;UAS- Gai constitutiva (III)* (cedidas por el Dr. Forte).

Sistema Gal4-UAS

Este sistema, desarrollado por Brand y Perrimon (1993), consiste en introducir en el genoma de *Drosophila* un activador transcripcional de levaduras llamado Gal4. Esta mosca transgénica se cruza con otra en la que se ha insertado una secuencia UAS, a la que reconoce y se une Gal4 (figura 7). Este sistema permite expresar, de manera específica, el gen localizado en posición 3' a las secuencias UAS en aquellos tejidos donde se expresa el activador transcripcional Gal4.

Estos dos elementos (el ADNc que codifica el Gal4 y la secuencia UAS) se introducen en la mosca por medio de elementos P. Los elementos P son transposones específicos de *D.melanogaster* que utilizan para la transposición la recombinasa denominada transposasa, que reconoce las repeticiones terminales invertidas del elemento P para movilizarlo e insertarlo en el genoma. Durante los últimos años se ha

ido perfeccionando su manejo y hoy en día son la columna vertebral de la mayoría de las investigaciones genéticas de *Drosophila*. Para poder seguirles la pista en el genoma, estos elementos P llevan un marcador que produce algún rasgo fenotípico (como el gen w^+ que produce ojos rojos, o el gen y^+ que produce un color de cuerpo normal) cuando se colocan en un fondo genético mutante para ese marcador. Estos elementos P se introducen en un vector plasmídico y mediante microinyección se integran en el genoma de la mosca.

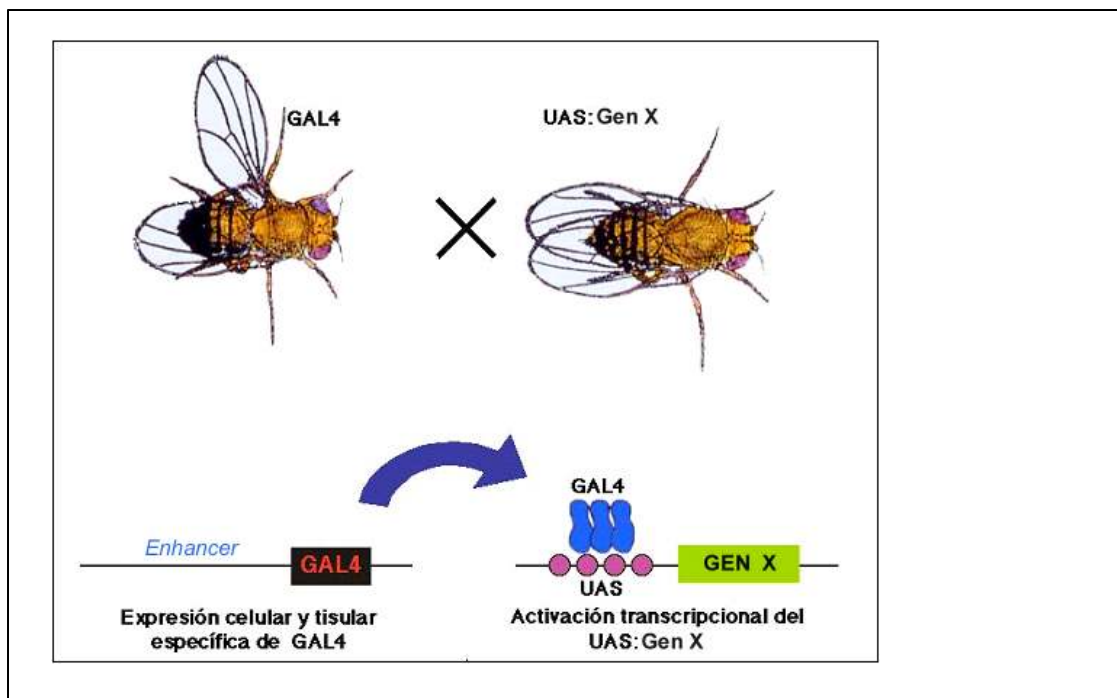


Fig.7. Sistema Gal4-UAS. Este sistema, desarrollado por Brand y Perrimon (1993), consiste en introducir en el genoma de *Drosophila* el activador transcripcional de levaduras Gal4. Esta mosca transgénica se cruza con otra en la que se ha insertado una secuencia UAS, a la que reconoce y se une Gal4. Este sistema permite expresar, de manera específica, el gen localizado en posición 3' a las secuencias UAS (gen X) en aquellos tejidos donde se expresa el activador transcripcional Gal4. (Modificado de Brand y Perrimon, 1993).

El sistema Gal4-UAS nos permite varias opciones:

- Expresar un gen conocido en tejidos y momentos específicos conocidos: se introduce el ADNc del Gal4 con un promotor conocido, y las secuencias UAS unidas a un gen también conocido.
- Expresar un gen conocido en tejidos y momentos al azar: en este caso las secuencias UAS se colocan 5' de un gen conocido, pero el ADNc Gal4 se inserta al azar en el genoma de la mosca y se seleccionan las líneas en las que la

expresión de Gal4 se dirige por un *enhancer* genómico con un patrón de expresión que nos pueda interesar (que seleccionamos utilizando marcadores tipo UAS-GFP o UAS-Lacz).

c) Expresar genes al azar en un tejido y momento conocido: El ADNc del Gal4 se inserta asociado a un promotor conocido o con un patrón conocido, mientras que las secuencias UAS se insertan al azar, normalmente en la región 5' del gen.

Esta última modalidad se llama una búsqueda o mutagénesis por ganancia de función y es la que se utilizó para aislar la inserción en el gen *Gai* del $P(y^+)UAS$. Este elemento P lleva como marcador el gen y^+ (que produce un color de cuerpo normal, reconocible en un fondo mutante). En este trabajo hemos sustituido este $P(y^+)UAS$ por un elemento Gal4, para poder expresar un gen conocido en los momentos y tejidos conocidos en donde de manera normal se expresaría el gen *Gai* (la primera de las opciones descritas).

El sistema Gal4-UAS es sensible a temperatura. A 30°C, Gal4 tiene su máxima actividad transcripcional, de modo que a esa temperatura la transcripción del gen asociado al UAS será máxima. Por el contrario, temperaturas por debajo de 18°C dan lugar a niveles muy bajos de transcripción. Este hecho es bastante ventajoso porque permite un mayor grado de flexibilidad, pero también requiere un especial cuidado de las condiciones térmicas del experimento. Todos los experimentos donde utilizamos el sistema Gal4-UAS se hicieron a una temperatura constante de 25°C.

Transposición dirigida

La sustitución precisa de un elemento P por otro es lo que se llama transposición dirigida (Seep y Auld, 1999; y figura 9), e implica un elemento P diana (el que se quiere sustituir) y uno donador (por el que se quiere sustituir). Esta técnica se basa en la conversión génica: cuando a un elemento P se le añade una fuente exógena de transposasa (los elementos P que se suelen utilizar están manipulados para evitar saltos indeseados de tal modo que no pueden transcribir su propia transposasa), éste salta dejando unas huellas correspondientes a las repeticiones terminales invertidas. El cromosoma que porta dicho elemento P (diana) se coloca

sobre un cromosoma balanceador que impide el apareamiento entre cromosomas homólogos. El hueco que deja el salto del elemento P diana es rellenado por la maquinaria de reparación del ADN, que busca homología de los extremos rotos en otra parte del genoma. Por lo anteriormente comentado, la maquinaria de reparación obvia al cromosoma homólogo como molde, y encuentra homología en las repeticiones terminales invertidas del elemento P donador, con lo que el hueco se rellena utilizando a éste como molde (ver figura 8).

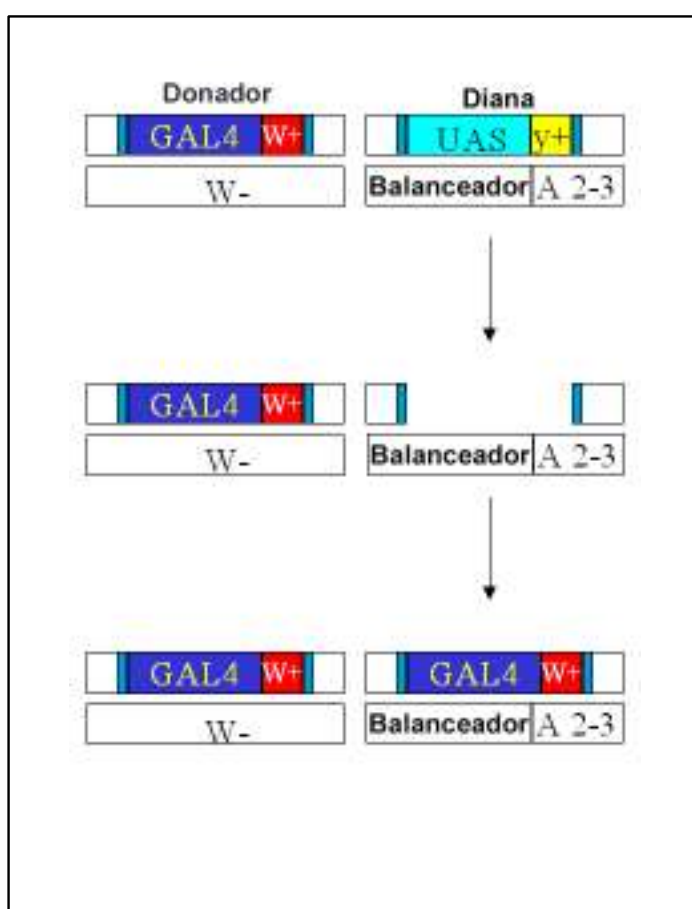


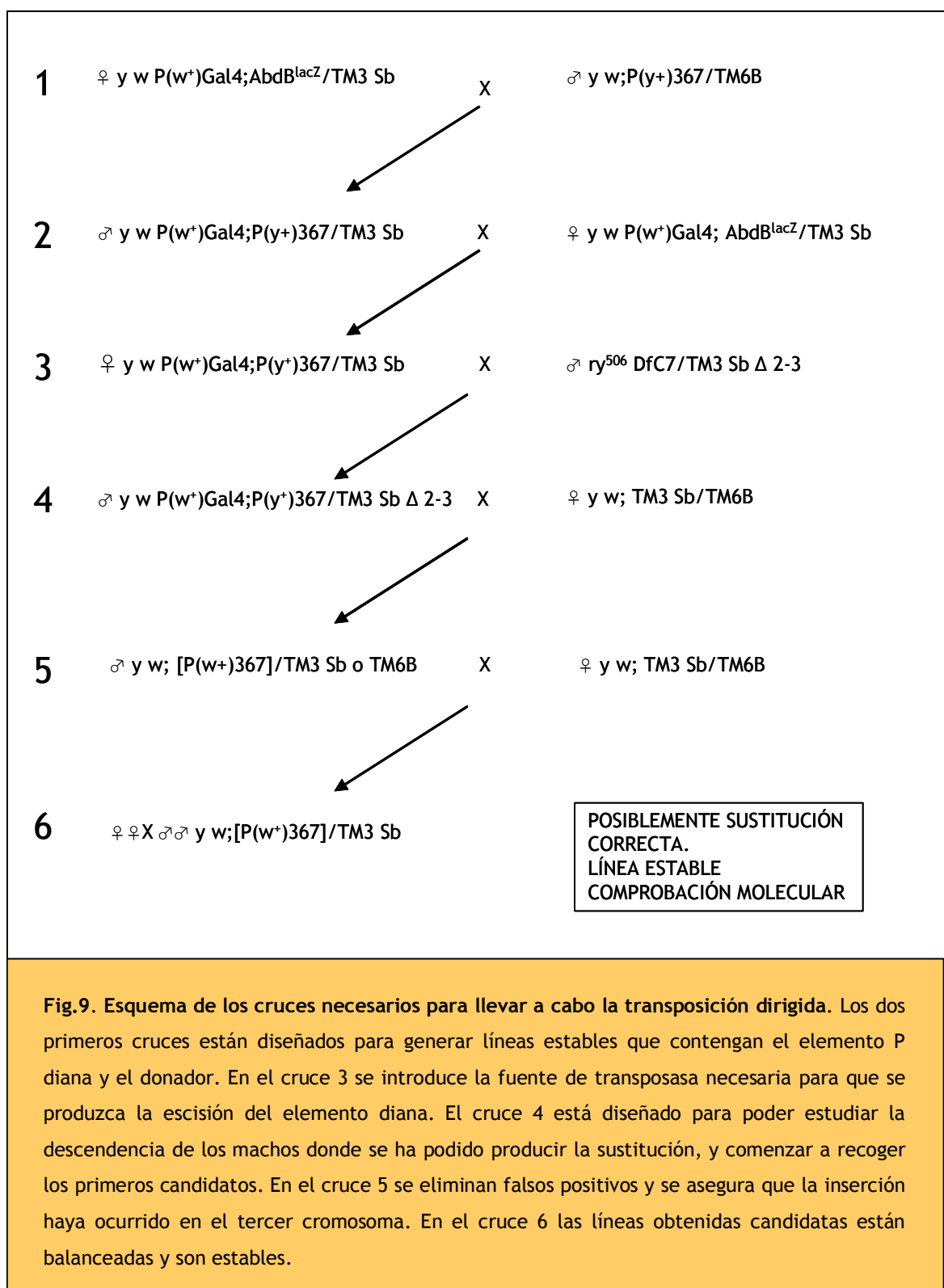
Fig.8 . Transposición dirigida.

La figura muestra los pasos por los que se produce la sustitución del elemento P, así como los elementos implicados en la misma: elemento P diana (el que se quiere sustituir), elemento P donador (por el que se quiere sustituir), y fuente exógena de transposasa ($\Delta 2-3$). El cromosoma que porta el elemento P diana se dispone sobre un cromosoma balanceador que impide el apareamiento entre cromosomas homólogos. El hueco que deja el salto del elemento P diana es rellenado por la maquinaria de reparación del ADN (fenómeno de conversión génica), que busca homología de los extremos rotos en otra parte del genoma, y utiliza las repeticiones invertidas del elemento P donador.

Para llevar a cabo la transposición dirigida, los cruces preliminares se diseñaron para generar estirpes que contuvieran los elementos P diana y donador. Estas estirpes de elementos P eran usados en las primeras generaciones. El experimento consistía en

seis generaciones (para simplificar se desarrolló el experimento con la línea original $P(y^+=UAS) Gai^{367}$ (ver figura 9); en el caso de la deficiencia $Gai^{(y^+)UAS\Delta4}$ el desarrollo sería exactamente el mismo):

1. Machos $y w P(w^+)Gal4;AbdB^{lacZ}/TM3 Sb$ eran cruzados en masa con vírgenes $y w; P(y^+=UAS) Gai^{367}/TM6B$.
2. Machos $y w P(w^+)Gal4;P(y^+=UAS) Gai^{367}/TM3 Sb$ eran cruzados en masa con vírgenes $y w P(w^+)Gal4;AbdB^{lacZ}/TM3 Sb$ para generar una línea estable que contenga ambos elementos P (diana y donador).
3. Vírgenes $yw P(w^+)Gal4;P(y^+=UAS) Gai^{367}/TM3 Sb$ se cruzaban en masa con machos $ry^{506} DfC7/TM3 Sb \Delta2-3$. Estos machos portan la fuente de transposasa ($\Delta2-3$) necesaria para el proceso de transposición de los elementos P.
4. Todos los machos $y w P(w^+)Gal4;P(y^+=UAS) Gai^{367}/TM3 Sb \Delta2-3$ eran recolectados individualmente y cruzados, de forma también individual, con vírgenes $y w;TM3 Sb/TM6B$. En estos machos se ha podido producir el proceso de sustitución (la transposición dirigida en sentido estricto). El cruce con esas hembras se realiza para quitar la fuente de transposasa (y de este modo evitar que pueda saltar de nuevo) y para comenzar a estudiar mediante el análisis fenotípico visual si la sustitución se ha producido con éxito. La sustitución podría haber ocurrido en aquellos machos que sean fenotípicamente y (por lo tanto carecen del elemento $P(y^+)UAS$) y w^+ (y por tanto portan un $P(w^+)Gal4$ en un cromosoma distinto del X).
5. Se recolectaban de forma individual los machos $y w; P(w^+=GAL4)[Gai^{367}]/TM3 Sb$ o $TM6B$, de fenotipo $y w^+$. Estos machos pueden llevar un $P(w^+)$ insertado en un punto distinto de Gai o en Gai . Llegados a éste punto se cruzaban, siempre de forma individual, de nuevo con vírgenes $y w; TM3 Sb/TM6B$. El resultado de éste cruce nos indicaba si el nuevo elemento P está o no en el cromosoma que nos interesa (el tercer cromosoma), o si por el contrario la inserción se ha producido en otro sitio, en cuyo caso se desechaba.
6. Se recogían para estudio los posibles individuos $y w; P(w^+=GAL4)Gai^{367}/TM3 Sb$ o $TM6B$ de los viales en los que nunca aparecen los dos balanceadores del tercer cromosoma juntos (esto nos asegura que el nuevo elemento P se encuentra en el tercer cromosoma). Aún tendremos que comprobar la sustitución mediante técnicas moleculares de PCR y secuenciación.



PCR y secuenciación

Para extraer el ADN genómico de las moscas de estudio, estas se anestesian en hielo (unos diez individuos). Se homogeneizan suavemente las moscas en un tampón

de lisis (10µl de tampón por mosca) cuya composición es: 0.1M Tris-HCl, 0.1M de NaCl, 0.1M de EDTA y 0.5% de SDS, que se debe añadir siempre al final (Sambrook y cols., 1989). El líquido resultante se incubaba a 65°C durante 30 min, se añade acetato potásico 8M (14µl/100µl de homogeneizado de mosca) y se mantiene 30 minutos en hielo. Este homogeneizado se centrifuga a velocidad máxima durante 15 minutos. Posteriormente se retiran 120µl de sobrenadante, a los que se añade 0.5 vol de isopropanol y se centrifuga durante 15 minutos más. Se retira el sobrenadante de esta última centrifugación, se vuelve a centrifugar unos segundos, y al sobrenadante restante y se le añaden 200 µl de etanol al 70% frío para precipitar en ADN. Después de centrifugar 15 min, se retira el etanol, se deja secar el etanol restante y se resuspende en 150 µl de TE. El ADN se guarda a -20°C.

Un mapa con la situación de los oligonucleótidos utilizados en PCR se puede ver en la figura 10: Gi-3 (5´GCA GCA TCT CGA AAT TGT TG3´), Gi-4r (5´TTG TT CAT CCC ATG CCT TC3´), LT5P (5´GTG TAT ACT TCG GTA AGC TTC GT3´), LT53P (CCA CCT TAT GTT A), LT-5C (5´CTG AAT AGG GAA TTG GGA ATT CG3´), Gi-6 (5´ATC ATA TTG CGC ACA GCA AA3´), Gi-2r (5´TCT TCA TCA GGA GCA CGA TCT3´) y GAL4r (5´CGA CAC TCC CAG TTG TTC TTC3´). La PCR usada fue la *GeneAmp PCR system 9700* de *Applied Biosystems*. El programa de amplificación consistió en 30 ciclos, con 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 55°C (alineamiento) y otros 30 segundos a 72°C (elocación), en cada ciclo. Todas las reacciones contenían soluciones estandarizadas de PCR de la casa comercial *Roche* (con la *AmpliTaq Gold* como enzima). El ADN amplificado resultante se corrió en un gel de agarosa al 1% en una fuente de electroforesis *EPS 300* de *Pharmacia Biotech* a 100V. La visualización se hizo mediante la fluorescencia del bromuro de etidio (2µl de bromuro de etidio en 100ml de agarosa) en un transiluminador de rayos ultravioleta.

Para la secuenciación, el ADN de las moscas de la nueva línea *Gai*^{P(w+)GAL4Δ4} se extrajo, se amplificó por PCR el fragmento comprendido entre los oligonucleótidos Gi-4r (oligonucleótido antisentido específico del gen *Gai*) y LT-53P (oligonucleótido específico los elementos P). El producto de PCR se aisló en una columna de purificación de ADN (*GFX PCR* de *Amersham Pharmacia*) y se secuenció en el Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM (SIDI), utilizando para ello los oligonucleótidos antes mencionados.

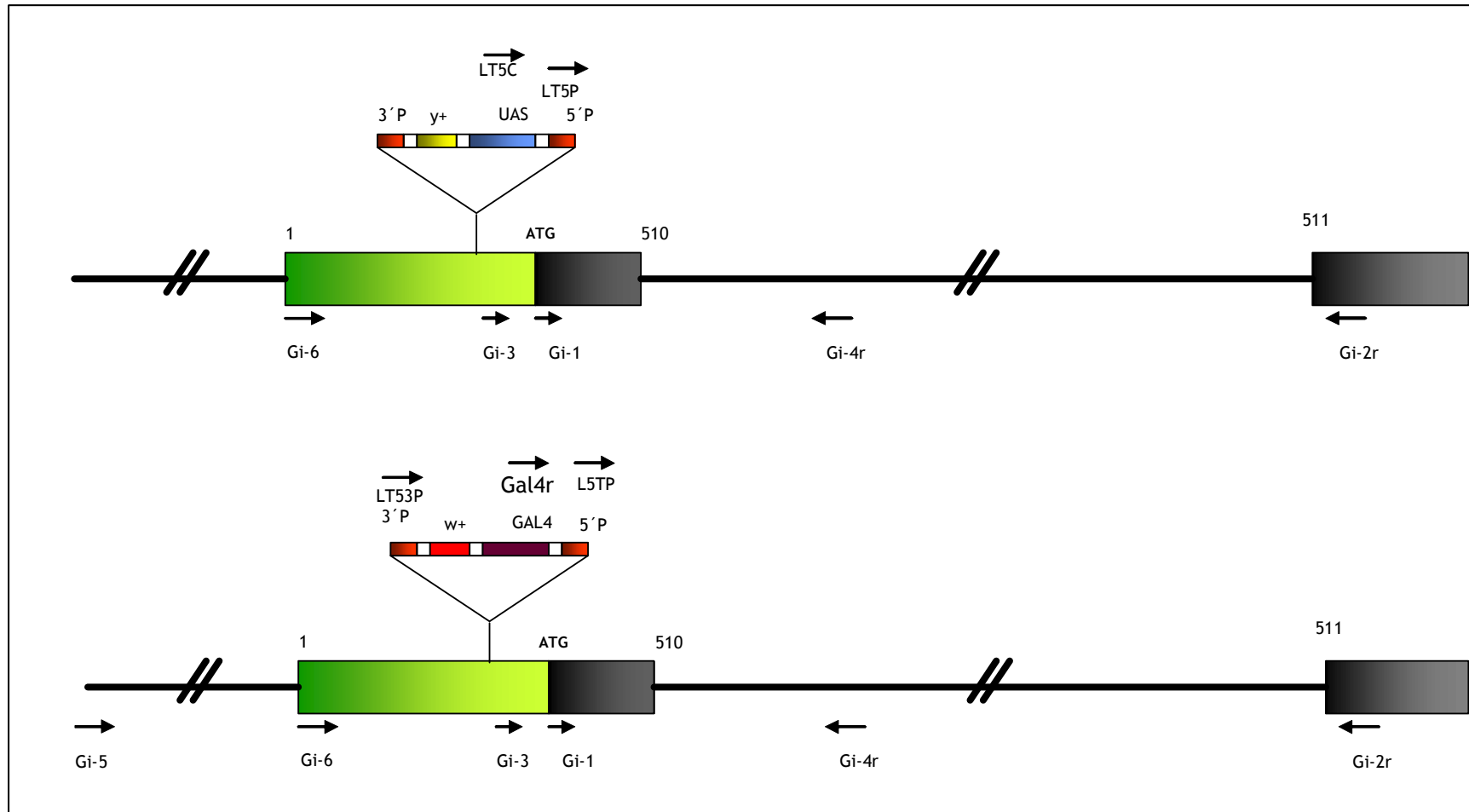


Figura 6. Disposición de los cebadores en el gen *Gai*. El esquema muestra el exón 1 y el inicio del exón 2 (rectángulos) del gen *Gai*, con la zona codificante coloreada en gris. Las flechas representan la posición y orientación de los oligonuclótidos que se usan para comprobar mediante PCR la correcta sustitución de un elemento P por otro, y amplificar por RT-PCR los transcritos de los alelos mutantes.

Recolección y fijación de embriones

Las puestas de embriones se realizaban sobre placas *petri* con una papilla especial para puestas (fabricada con 100 ml de zumo de frutas, 3% de agar, 5.4% de azúcar, todo ello calentado hasta la ebullición; luego se añade 1ml de ácido acético cuando la temperatura haya descendido de los 60°C, y cuando la papilla adquiera el estado sólido se añade un poco de pasta de levadura sobre la propia placa de puesta). Sobre la placa *petri* se coloca un vial del mismo diámetro que dicha placa, en el que el extremo superior del vial está tapado con una rejilla que permite la ventilación pero no permite ni la salida ni entrada de moscas. Las moscas se dejan poniendo huevos a 25°C durante 16 horas. Posteriormente los huevos se recolectan con ayuda de un pincel húmedo y una micropipeta, y se echan a un pocillo con agua. Cuando se han recolectado todos se lavan profusamente con agua hasta asegurarse que nos hemos desprendido de todas las impurezas. Se decorionan con una solución del 50% de lejía y 50% de agua (hasta ver bajo la lupa que ha desaparecido el corion). Se vuelven a lavar varias veces con agua. Con ayuda de un pincel seco se echan en un recipiente con una solución de 50% heptano y 50% de paraformaldehído (al 4% en un tampón fosfato), y de este modo se fijan durante 20 minutos en continua agitación. Luego se quita la fase inferior (fijador), se añade metanol, y se agita fuertemente durante un minuto (de este modo los embriones se desprenden de la membrana vitelina). Posteriormente se retira la fase correspondiente al heptano (que es la superior) y se añade metanol. Se lava en metanol tres veces. Por último se lavan 3 x 20 minutos con PBT+NGS 3% para rehidratarlos y bloquearlos, y se les somete al protocolo de inmunohistoquímica que se explica en un apartado posterior. Para estadiar a los embriones hemos utilizado los criterios de Campos Ortega y Hatenstein (Campos Ortega y Hatenstein, 1997).

Disección y fijación de ganglios nerviosos

Los ganglios nerviosos de larvas se diseccionan en PBS, y se fijan en paraformaldehído (al 4% en un tampón fosfato) durante 30 minutos. Posteriormente se lavan y permeabilizan dos veces 10 minutos en PBT y después se tratan con el protocolo de inmunohistoquímica que podemos ver en un apartado posterior.

En el caso de los ganglios adultos en primer lugar se recolectan las moscas adultas y se les quita las patas, las alas, y la probóscide, para que posteriormente se puedan fijar y pueda penetrar el fijador en la mosca. Esta primera fijación dura 20 minutos. Después se realiza la extracción del ganglio y/o cerebro (el medio que se emplea para ello es el mismo fijador) y se dejan fijando otros 20 minutos más. Después se realizan dos lavados de 10 minutos en PBT y se les aplica el protocolo de inmunotinción descrito en un apartado posterior.

Visualización de los músculos de la pared larvaria y sus uniones neuromusculares

Para visualizar el patrón segmental del sistema neuromuscular larvario el protocolo de disección es el siguiente: en primer lugar la larva se fija mediante alfileres entomológicos, lo más estirada posible, en posición dorsal sobre una placa petri cuyo suelo es de silgar (material que permite la fijación de alfileres). Una vez fijada, para inmovilizar a la larva, se le añade una gota de una solución fosfato con quelante de calcio (1XPBS + EDTA 0.5mM). A continuación, con unas tijeras de disección se realiza un corte de la pared larvaria desde posterior hasta anterior, recorriendo la línea media dorsal. Una vez realizado este corte, se abre la larva “en filete” y se fija la cutícula larvaria lo más estirada posible a la placa, teniendo especial cuidado de no dañar la pared larvaria. A continuación se finaliza la disección larvaria retirando los órganos internos. Posteriormente se fija el tejido en una solución de formaldehído al 4% diluido en PBS durante 10 minutos. Después se aplica el protocolo de inmunotinción de campo claro especificado en un apartado posterior. Para la visualización del patrón de músculos y uniones neuromusculares hemos utilizado en anticuerpo 10F1 (ver apartado de anticuerpos).

Protocolo de inmunohistoquímica para campo claro

Una vez que la muestra está fijada, hidratada y limpia se añade el anticuerpo primario diluido en PBT y se incuba toda la noche a 4°C. Posteriormente se retira el

anticuerpo y se lava 6 x 10 min en PBT. Luego se añade el anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBT, y se incuba 2 horas a temperatura ambiente. Se retira el anticuerpo secundario y se lava 6 x 10 min en PBT. En el caso de los tejidos que no sean embriones se han de desactivar las peroxidasas endógenas incubando el tejido durante 15 minutos en PBT+8µl de 30% H₂O₂/ml y posteriormente se hacen dos lavados de 15 minutos en PBT. Durante el tiempo que se hacen estos lavados se preincuba la mezcla *A/B Complex* del kit avidina/biotina (*Vectastain ABC Kit, Laboratorios Vector*) durante al menos 30 min. Posteriormente se añade la mezcla *A/B Complex* al tejido y se incuba durante 60min. Luego se lava 3 x 10 min con PBT. Se pasan los embriones u otros tejidos a un pocillo y se quita el PBT. Posteriormente se añade DAB (500 µl) y H₂O₂ al 3% (1.5 µl), y se observa en la lupa de disección hasta ver señal en los embriones o los tejidos pertinentes. Una vez que hemos visto señal se lava con PBT 2 x 10 min, y una vez con PBS durante 10 min.

Tanto el DAB como el PBT del primer lavado son muy tóxicos y deben ser tratados como residuos especiales.

Después se deshidrata con concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a etanol 100%, y entonces se pasa a xileno. Para montarlo permanentemente, el tejido se monta en un porta, se retira el xileno y se añade medio de montaje *Depex* con una punta de micropipeta cortada.

Protocolo de inmunohistoquímica para fluorescencia

Los embriones u otros tejidos se lavan 3 x 20 minutos con PBT + NGS (3%) para rehidratarlos y bloquearlos. Después se añade el anticuerpo primario diluido en PBT y se incuba toda la noche a 4°C. Posteriormente se retira el anticuerpo y se lava 6 x 10 min en PBT. Luego se añade el anticuerpo secundario unido a un fluoróforo diluido en PBT y se incuba 2 horas a temperatura ambiente.

Se retira el anticuerpo secundario y se lava 6 x 10 min en PBT. Luego se hace un lavado de 5 min en PBS, se pasa el tejido a un porta, se retira el PBS y se añade medio de montaje para fluorescencia (normalmente *Vectashield* de *Vector*) y se estudia en el microscopio de fluorescencia (*Leica*) o en el microscopio confocal (*Microradiance-BioRad*), según el experimento.

En el caso de los dobles marcajes (casos en los que se visualizan dos anticuerpos primarios en la misma muestra) se realiza el protocolo anteriormente descrito con el primero de los anticuerpos y después sobre la misma muestra se repite el protocolo de inmunohistoquímica de fluorescencia con el segundo de los anticuerpos.

Anticuerpos

PRIMARIOS

- Anti- Elav (9F8A9); *Hybridoma Bank*, monoclonal de ratón. Usado 1/25
- Anti- Repo (8D12); *Hybridoma Bank*, policlonal de conejo. Usado 1/50
- Anti- Gai I: cedido por Knoblich, policlonal de conejo. Usado 1/100 ó 1/1000
- Anti- Gai II: cedido por J.A. knoblich, policlonal de conejo. Usado 1/1000
- Anti- Gai: cedido por W. Chia, policlonal de cobaya. Usado 1/500
- Anti-FMRFamida: *BioTrend*, policlonal de conejo. Usado 1/2000
- Anti-Leucoquinina IV: cedido por J. Veentra, policlonal de conejo. Usado 1/50
- Anti-EcR (10F1): *Hybridoma Bank*, monoclonal de ratón. Usado 1/100
- Anti-Crq: cedido por B. Olofsson, policlonal de rata. Usado 1/1000
- Anti-Crq: cedido por B. Olofsson, policlonal de conejo. Usado 1/1000
- Anti-BP102: *Hybridoma Bank*, monoclonal de ratón. Usado 1/ 5
- Anti-FasII (1D4): *Hybridoma Bank*, monoclonal de ratón. Usado 1/75
- Anti-GFP (A-6455): *Molecular Probes*, policlonal de conejo. Usado 1/300
- Anti-GFP: *Invitrogen*, policlonal de conejo. Usado 1/200
- Anti- β -Galactosidasa: *ICN Biomed-Cappel*, policlonal de conejo. Usado 1/1000

SECUNDARIOS

- Anti-IgG de ratón-biotina, policlonal de cabra. *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de conejo-biotina, policlonal de cabra. *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de rata-biotina, policlonal de cabra. *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 488, policlonal de cabra: *Invitrogen*, usado a 1/500

- Anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488, policlonal de cabra: *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de rata-Alexa Fluor 546, policlonal de cabra: *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 546, policlonal de cabra: *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 546 policlonal de cabra: *Invitrogen*, usado a 1/500
- Anti-IgG de rata-Alexa Fluor 546, policlonal de cabra: *Invitrogen*, usado a 1/500

MARCADORES

- Faloidina-TRITC: *Sigma*. Alcaloide extraído de *A.phalloides*. Usado 1/500

Visualización de la GFP sin realizar inmunotinción

La proteína GFP (Proteína Fluorescente Verde, natural de algunas especies de celentéreos) emite fluorescencia a 540 nm, lo que permite visualizarla directamente al microscopio de fluorescencia en tejidos diseccionados en PBS y fijados en PP/PBS (paraformaldehído al 4% en PBS). En estado normal, la proteína GFP es soluble y se localiza preferentemente en el citoplasma celular, aunque actualmente se han creado variantes para poder visualizar compartimentos más específicos. Nosotros hemos utilizado la GFP-nls, en la que la GFP está fusionada a una secuencia de localización nuclear, de esta manera se localiza preferentemente en el núcleo de la célula que lo expresa.

La proteína GFP también se puede visualizar utilizando un anticuerpo específico que reconozca a la proteína (Anti-GFP) siguiendo cualquiera de los protocolos de inmunotinción anteriormente descritos. En este trabajo hemos utilizado ambos métodos de detección.

Detección enzimática de la β -Galactosidasa

El transgen UAS-LacZ codifica para la proteína bacteriana β -Galactosidasa. Esta proteína tiene actividad enzimática, pudiendo transformar un sustrato químico (X-gal) en una sustancia coloreada, que puede verse *in situ* o cuantificarse por espectrofotometría.

Al igual que ocurre con la proteína GFP, la proteína β -Galactosidasa puede detectarse con un anticuerpo específico que reconozca a esta proteína (Anti- β -Gal). En este trabajo se ha utilizado el método enzimático de detección, excepto cuando hemos colocalizado la expresión de β -Gal con la de otra proteína, en cuyo caso hemos realizado los dobles marcajes mediante inmunofluorescencia que hemos descrito anteriormente.

Microscopía y tratamiento de imágenes

Para microscopía de campo claro se utilizó un microscopio *Leica Wild MPS52*, las imágenes fueron capturadas digitalmente por una cámara Leica adaptada al microscopio utilizando el *LM50 (Image Manager)*. Para microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal *BioRad (Hercules, CA) radiance 2000* mediante el software *Lasersharp 2000.v4*. En ambos casos las imágenes se procesaron con el programa de tratamiento de imágenes *Adobe Photoshop 6.0*.

Histología

En nuestro caso, solo hemos utilizados cortes histológicos en el caso de individuos adultos. Previo a cualquier manipulación posterior, las moscas se anestesiaban con CO₂. Para la fijación del tejido, a las moscas se les seccionaban las alas, la probóscide y las patas. Las moscas eran fijadas durante una hora en AAF (Ácido acético glacial al 0.05%, formaldehído al 37% y etanol al 85%). Posteriormente eran deshidratadas en series de alcohol al 80, 90 y 100%, y transferidas a xileno antes de ser embebidas en parafina líquida a 57°C durante la noche. Para la preparación de

los bloques de parafina, se dispusieron las muestras en cubetas de parafina líquida también a 57°C, se orientaron adecuadamente para la obtención de secciones, y se dejaron enfriar a 25°C. Posteriormente se realizaron cortes de 10 µm de cada uno de los bloques, con un microtomo automático de la casa Leica. Luego se extendieron las secciones sobre un portaobjetos, previamente polisinado, con agua. El exceso de agua se retiró con una pipeta Pasteur y las secciones se dejaron secar a 37°C durante 2 horas.

Tinciones de Giemsa

La tinción de Giemsa emplea como colorantes fundamentales una mezcla de azul de metileno, eosina, y varios azules en disolución acuosa (A y B), que son derivados por metilación del azul de metileno. El fundamento de esta técnica se basa en la disociación controlada de las sales de eosinato que ocurre por la mezcla de Giemsa con agua destilada. Tanto la eosina como el azul de metileno son muy sensibles a variaciones de pH de las diferentes estructuras celulares, de forma que las que tienen carácter básico fijan la eosina, mientras las que tienen propiedades ácidas fijan principalmente el azul de metileno. Esto explica que las estructuras basófilas se tiñen de color azul mientras que los componentes acidófilos adquieren un color rosado.

En caso de la tinción con Giemsa sobre cortes histológicos, una vez desparafinadas las secciones con xileno, y rehidratadas en series decrecientes de etanol, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con Giemsa al 1% en agua destilada durante 10 minutos. Posteriormente se lavó el exceso de colorante con agua destilada y fueron deshidratadas en series crecientes de etanol, para eliminar posibles restos acuosos, y aclaradas con xileno. Finalmente se montaron en el medio de montaje *Depex*, y se dejaron secar hasta su análisis al microscopio óptico.

En el caso de tinciones *in toto* (de larvas en nuestro caso), una vez diseccionado el material en PBS (solución tampón fosfato) y fijado en formaldehído al 4%, se incubó con Giemsa al 1% en agua destilada durante 10 minutos. Posteriormente se lavó el exceso de colorante con agua destilada, y el tejido fue deshidratado en series crecientes de etanol, para eliminar posibles restos acuosos, y aclarado con xileno. Finalmente se montaron en medio de montaje *Depex*, y se dejaron secar hasta su posterior análisis al microscopio óptico.

Cuantificación de la longitud del ganglio ventral en embriones, larvas y adultos

Embriones: En embriones del estadio 17 se mide la longitud del SNC respecto a la longitud total del embrión en el eje antero-posterior (figura 11).

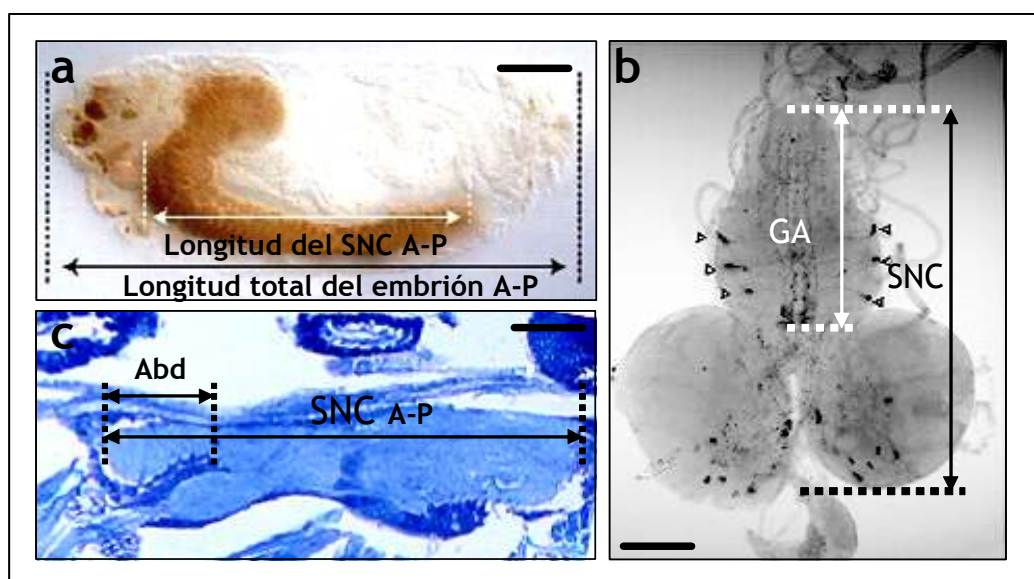


Fig. 11 . Método de cuantificación de la elongación del ganglio ventral. En a) podemos observar cómo se cuantifica la elongación en el estadio embrionario, comparando la proporción Longitud SNC/Longitud total del embrión en el estadio 17 en embriones silvestres y mutantes. En este caso, el embrión está teñido con el anticuerpo anti-Elav para ver con mayor facilidad el SNC del embrión (barra de referencia 25 μm). En b) observamos los parámetros medidos en los estadios larvares, donde se compara la proporción del ganglio abdominal (GA)/Longitud total del sistema nervioso central (SNC) en larvas del tercer estadio silvestres y mutantes teñidos con el anticuerpo anti-FMRFamida. Anterior está abajo. El límite anterior del ganglio ventral está establecido por las células subesofágicas, que expresan FMRFamida. Barra de referencia 50 μm . En c) observamos un corte de parafina donde se muestra el ganglio abdominal de un adulto teñido con Giemsa. En el estado adulto se compara la longitud de la porción abdominal del ganglio ventral (Abd) frente a la longitud total del ganglio ventral (SNC). Barra de referencia 50 μm .

Larvas: En larvas del estadio 3 teñidas con el anticuerpo anti-FMRFamida se mide la longitud del ganglio ventral respecto a la longitud de todo el sistema nervioso. Para medir el ganglio ventral se toma de referencia las células subesofágicas

inmunoreactivas al anticuerpo anti-FMRFamida como límite anterior, y el final del ganglio como límite posterior (ver figura 11).

Adultos: Se mide la longitud de los segmentos abdominales respecto a la longitud total del ganglio (ver figura 11).

Resultados

En el presente apartado describiremos pormenorizadamente el patrón de expresión espacio-temporal del gen que codifica la proteína Gai detectado por una inserción $P(w^+)Gal4$ en el exón 1 del gen *Gai*, poniendo especial atención a la expresión en el SNC. Posteriormente describiremos los fenotipos mutantes de falta de función en *Drosophila* para el gen *Gai*, donde analizamos con gran resolución los fenotipos observados en el SNC. Concluimos los resultados describiendo el análisis de la expresión ectópica de formas silvestres de Gai (efectos de ganancia de función) así como de formas constitutivamente activas de la misma.

Generación de una línea transgénica *Gai-Gal4* mediante transposición dirigida a partir de la inserción $P(y^+=UAS)Gai^{367}$

Como hemos comentado en antecedentes, los alelos $P(y^+=UAS)Gai^{367}$ y $Gai^{UAS\Delta4}$ habían sido previamente generados por la Dra. Torroja. Para poder aprovechar la enorme versatilidad del sistema Gal4-UAS optamos por realizar una técnica de sustitución llamada transposición dirigida, en la que se sustituye un elemento P por otro. En nuestro caso buscábamos sustituir un elemento P de la línea $P(y^+=UAS)Gai^{367}$ por uno del tipo $P(w^+=GAL4)Gai^{367}$. Si la sustitución se producía de forma correcta obtendríamos una nueva herramienta que nos proporcionaría mucha versatilidad a la hora de diseñar experimentos, entre los que destacan la expresión de genes marcadores (para poder ver la expresión del gen *Gai*), experimentos de rescate (expresando copias normales del gen *Gai* en fondos mutantes gobernadas bajo el nuevo elemento P generado, de tipo GAL4), experimentos de sobre-expresión (realizados de la misma manera que los experimentos de rescate solo que en fondo silvestre en lugar de fondos mutantes), o expresión de formas constitutivamente activas (formas de Gai manipuladas genéticamente para que siempre estén activas).

La descripción detallada de la técnica de la transposición dirigida se recoge en material y métodos

Los cruces se realizaron para obtener la sustitución en dos líneas: $P(y^+=UAS)Gai^{367}$ y $Gai^{UAS\Delta4}$ (mutante generado a partir de la línea anterior, ver antecedentes), para poder hacer los experimentos sobre fondo silvestre y sobre fondo mutante. Sin embargo, no obtuvimos ninguna línea Gal4 en el cromosoma III a partir de la línea $P(y^+=UAS)Gai^{367}$ (por lo que la frecuencia de transposición resultante fue

de un 0% de un total de 1077 individuos donde se podía haber producido la transposición), pero sí obtuvimos una única línea Gal4 en el cromosoma III a partir de la línea $Gai^{UAS\Delta 4}$ (con una frecuencia de transposición de 0.05% de un total de 2077 individuos donde se podía haber producido la transposición). Posteriormente, mediante PCR y secuenciación del ADN extraído de esta nueva línea de moscas (ver material y métodos) se confirmó que la sustitución había ocurrido en el lugar correcto, en el gen Gai , y que dicha sustitución fue extremadamente precisa (nucleótido a nucleótido).

Por tanto, ahora teníamos una línea que expresa el activador transcripcional Gal4 en los sitios donde de manera natural se expresa el gen que codifica para la subunidad Gai , y podíamos de esta manera aprovechar la versatilidad que ofrece el sistema Gal4-UAS. La nueva línea se denominó $Gai^{P(w^+)GAL4\Delta 4}$. De ahora en adelante, llamaremos $Gai-Gal4$ a esta línea $Gai^{P(w^+)GAL4\Delta 4}$.

Descripción del patrón de expresión de la nueva línea $Gai-Gal4$

Gracias a la transposición dirigida sustituimos un elemento $P(y^+)UAS$ diana de la línea $Gai^{UAS\Delta 4}$, por un elemento $P(w^+)Gal4$ donante, por lo que ahora teníamos una línea $Gai-Gal4$. Como el elemento P estaba insertado en el primer exón, y dado que el mapeo de la delección $Gai^{UAS\Delta 4}$ indicaba que la zona 5' reguladora del gen no estaba afectada, asumimos que el patrón de expresión que veríamos empleando genes marcadores (mediante el sistema Gal4-UAS) sería el mismo que observaríamos para el gen Gai en una mosca silvestre.

Quisimos ver si esta línea reproducía el patrón espacio-temporal del gen Gai , que ya había sido publicado parcialmente con anterioridad en *Drosophila* (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990; Wolfgang y cols., 1991) y en *Manduca sexta* (Copenhaver y cols., 1995). Para ello utilizamos transgenes marcadores del tipo UAS-X. En primer lugar usamos el transgen UAS-GFPnls, en el que la secuencia UAS dirige la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) y dicha proteína se incorpora al núcleo de la célula. Por tanto la proteína fluorescente se expresará en los sitios donde se expresa el activador transcripcional $Gai-Gal4$. En segundo lugar, para confirmar y completar estos resultados usamos otro gen marcador llamado UAS-lacZ, que expresa la enzima β -Galactosidasa, y que se detecta mediante una tinción enzimática (ver en

materiales y métodos).

Estos experimentos se completaron con inmunotinciones (realizadas tanto en nuestro laboratorio como en el de la Dra. Alicia Hidalgo en Birmingham, Inglaterra), con anticuerpos específicos para la proteína Gai, pero nunca conseguimos ver señal alguna a pesar de cambiar las condiciones de fijación (tipo de fijador, tiempos de fijación, porcentaje de fijador, temperatura de fijación), permeabilidad (metanol, tritón, Tween... todos ellos a distintas concentraciones), condiciones de bloqueo (BSA, NGS, distintas concentraciones), tipo de anticuerpo (nos cedieron distintos anticuerpos, procedentes de distintos animales: rata, conejo y coballa), concentración de anticuerpo (todos los primarios mencionados usados a múltiples concentraciones), uso de fluorescencia, uso de DAB (ver materiales y métodos), amplificación de señal con terciarios, uso de mayor concentración de sales en los lavados, o distintos medios de montaje (*Prolong Gold*, *Vectashield*, *Mowiol*, *Ortofenilendeamina*...). En ninguno de los casos conseguimos ver señal.

La expresión que vemos mediante *Gai-Gal4* es bastante generalizada en todos los estadios del desarrollo de *Drosophila*, es decir, no se restringe ni a un tejido concreto, ni a una región del organismo, ni a un momento del desarrollo determinado. Todo lo que se conoce sobre la expresión de *Gai*, tanto lo publicado anteriormente, como los resultados que describimos a continuación están sintetizados en la tabla 1.

Expresión de la línea *Gai-Gal4* en el estadio embrionario

A lo largo de este apartado nos referiremos a expresión proteica como aquella que se detecta utilizando un anticuerpo policlonal, desarrollado en conejo, específico contra la proteína Gai de *Drosophila*, a expresión de ARNm como aquella que se detecta mediante técnicas de hibridación *in situ* utilizando una sonda específica que reconoce el ARNm del gen *Gai*, y a expresión génica a aquella que se detecta usando genes marcadores (*UAS-GFP-nls* y *UAS-LacZ*) mediante en empleo del sistema UAS-Gal4 donde el Gal4 es *Gai-Gal4*.

	Proteína (Inmunotinción)	mRNA (<i>in situ</i>)	Expresión génica (sistema Gal4- UAS)
Embriogénesis temprana	<ul style="list-style-type: none"> -Periferia del embrión (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990) -Polo posterior del embrión (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990) -Cuando se forma el blastodermo sincitial desaparece la señal (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990) 	_____	_____
Embriogénesis tardía	<ul style="list-style-type: none"> -Est.10 en neuroblastos (Fenwei Yu y cols., 2003) -Est.14 en cardioblasto presuntivo y futura glándula protorácica (Wolfgang y cols., 1990) - Est.15 en órganos cordotonales (Wolfgang y cols., 1990) -Est.17 SNC (cuerpos celulares y algún paquete axonal (Wolfgang y cols., 1990) 	<ul style="list-style-type: none"> -Est 14-17 Señal (?)en SNC (resultados de esta tesis) -Est.16 Glia lateral (Granderath, sin publicar) 	_____
Estadios larvarios	<ul style="list-style-type: none"> - En cardioblasto y glándula protorácica (Wolfgang y cols., 1990) - Algún tracto axonal aislado (ningún cuerpo celular) (Wolfgang y cols., 1990) 		<ul style="list-style-type: none"> -Cuerpo graso (resultados de esta tesis) -Tubo digestivo (resultados de esta tesis) -Sistema nervioso periférico (SNP) - SNC (tanto cuerpos celulares- células neurosecretoras, motoneuronas, glia- como neuropilo) (resultados de esta tesis)
Adulto (ovario)	-Celulas foliculares y oocito (Wolfgang y cols., 1990)	-Celulas nodriza y oocito (Wolfgang y cols., 1990)	-Celulas foliculares (resultados de esta tesis)
Adulto (resto)			<ul style="list-style-type: none"> -SNC (resultados de esta tesis) -SNP (resultados de esta tesis) -Cuerpo graso (resultados de esta tesis) -Digestivo (resultados de esta tesis)

Tabla 1. Cuadro sinóptico con la expresión de Gai

Embriogénesis temprana:

Expresión proteica: utilizando el anticuerpo policlonal contra la proteína Gai de *Drosophila* en secciones de parafina se observa que cuando comienza la embriogénesis hay proteína Gai en la periferia del embrión en forma de gránulos, y durante las cuatro primeras divisiones nucleares estos gránulos se concentran en polo posterior. Luego, durante la etapa de blastodermo sincitial desaparece la señal (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990).

Expresión génica: nosotros, utilizando el sistema Gal4-UAS con los dos transgenes marcadores (*UAS-GFPnls* y *UAS-LacZ*) no observamos expresión alguna durante la embriogénesis temprana (ver discusión).

Embriogénesis tardía:

Expresión proteica: el grupo de Wolfgang (Wolfgang y cols., 1990) describió que la proteína Gai vuelve a detectarse en el estadio 14, aunque posteriormente se ha publicado la presencia de proteína Gai en estadios anteriores (a partir del estadio 10), durante los cuales comienzan las divisiones asimétricas de neuroblastos (Fenwei Yu y cols., 2003). En el estadio 14 se detecta proteína en el cardioblasto presuntivo (señal que persiste incluso en estadios larvarios) y en la futura glándula protorácica. En el estadio 15 se detecta proteína, de nuevo realizando inmunohistoquímica en secciones de parafina, en los futuros órganos cordotonales (órganos sensoriales que actúan como receptores mecánicos de tensión). En el estadio 17 se observa señal en ganglio ventral nervioso, concretamente en 11 pares de grandes células mediales y dorsales que podrían corresponder a células gliales, en algunas células más aisladas no identificadas y en algún paquete axonal (única señal que se mantiene durante la vida larvaria).

Expresión de ARNm: El grupo de Sebastián Granderath analizó la expresión de ARNm en el sistema nervioso embrionario de *Drosophila* mediante hibridación *in situ* de embriones *in toto* y encontraron señal de Gai en células gliales, aunque nunca han llegado a publicar este resultado (Granderath y col, datos sin publicar). Posteriormente el grupo de Schwabe ha confirmado mediante hibridaciones *in situ* la localización de Gai en células de la glía lateral (Schwabe y cols., 2005).

Expresión génica: nosotros mediante el sistema Gal4-UAS (utilizando como transgenes marcadores tanto *UAS-GFPnls* como *UAS-LacZ*) tampoco observamos señal

alguna en la embriogénesis tardía. La explicación a no encontrar señal con este sistema a lo largo de la embriogénesis podría ser porque tanto el ARN mensajero como la proteína Gai que existen en estos estadios podrían ser aportados por la madre (efecto materno), y que la expresión del activador transcripcional *Gai-Gal4* no recoge dicha contribución materna sino sólo la cigótica.

Expresión de la línea *Gai-Gal4* en estadios larvarios

No se conocía mucho sobre el patrón de Gai en la larva. Mediante inmunotinción, utilizando el anticuerpo específico contra la proteína Gai de *Drosophila*, en cortes histológicos, el grupo de Wolfgang había detectado que la proteína Gai persistía en los estadios larvarios tanto en el cardioblasto como la de la glándula protorácica (Wolfgang y cols., 1990). La señal detectada en el SNC era escasa, tan solo algún tracto axonal aislado, pero en ningún caso veían expresión en cuerpos celulares.

Nosotros, expresando con *Gai-Gal4* las proteínas marcadoras GFP-nls y Lacz, encontramos expresión en los estadios larvarios (expresión génica), y esta expresión difiere notablemente de lo publicado anteriormente en *Drosophila*, aunque es similar a la que estaba descrita en *Manduca sexta* (Copenhaver y cols., 1995). Al no encontrar diferencias apreciables entre el patrón de expresión de los tres estadios larvarios nos centraremos en la expresión del tercer estadio larvario.

Observamos expresión en el cuerpo graso larvario (figura 12), lo que da cuenta de un gran porcentaje de señal debido a la gran cantidad de grasa que posee la larva. Encontramos señal también en zonas discretas del tubo digestivo: células del proventriculo (figura 12), y en células del digestivo medio, que debido a su morfología, probablemente se correspondan a histoblastos imaginales (figura 12). También hay señal en células del digestivo posterior. Observamos señal en unas células asociadas a la tráquea, que por posición y morfología podrían ser las células INKA neurosecretoras (ver introducción) (figura 12). También se observa una fuerte expresión en las glándulas salivales, aunque se trata con toda probabilidad de una expresión artefactual, ya que se puede encontrar en numerosas líneas Gal4 (independientemente de las secuencias reguladoras que controlen su expresión).

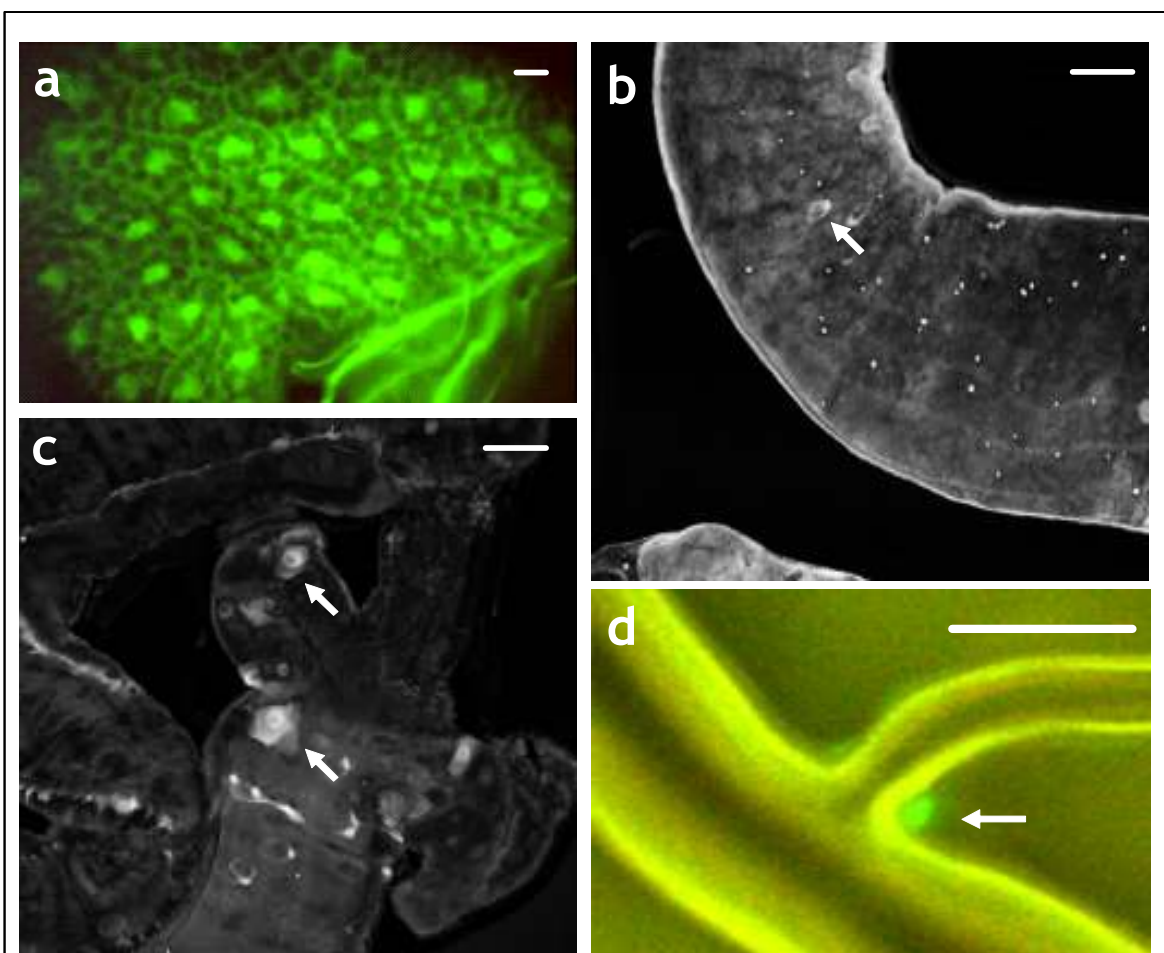
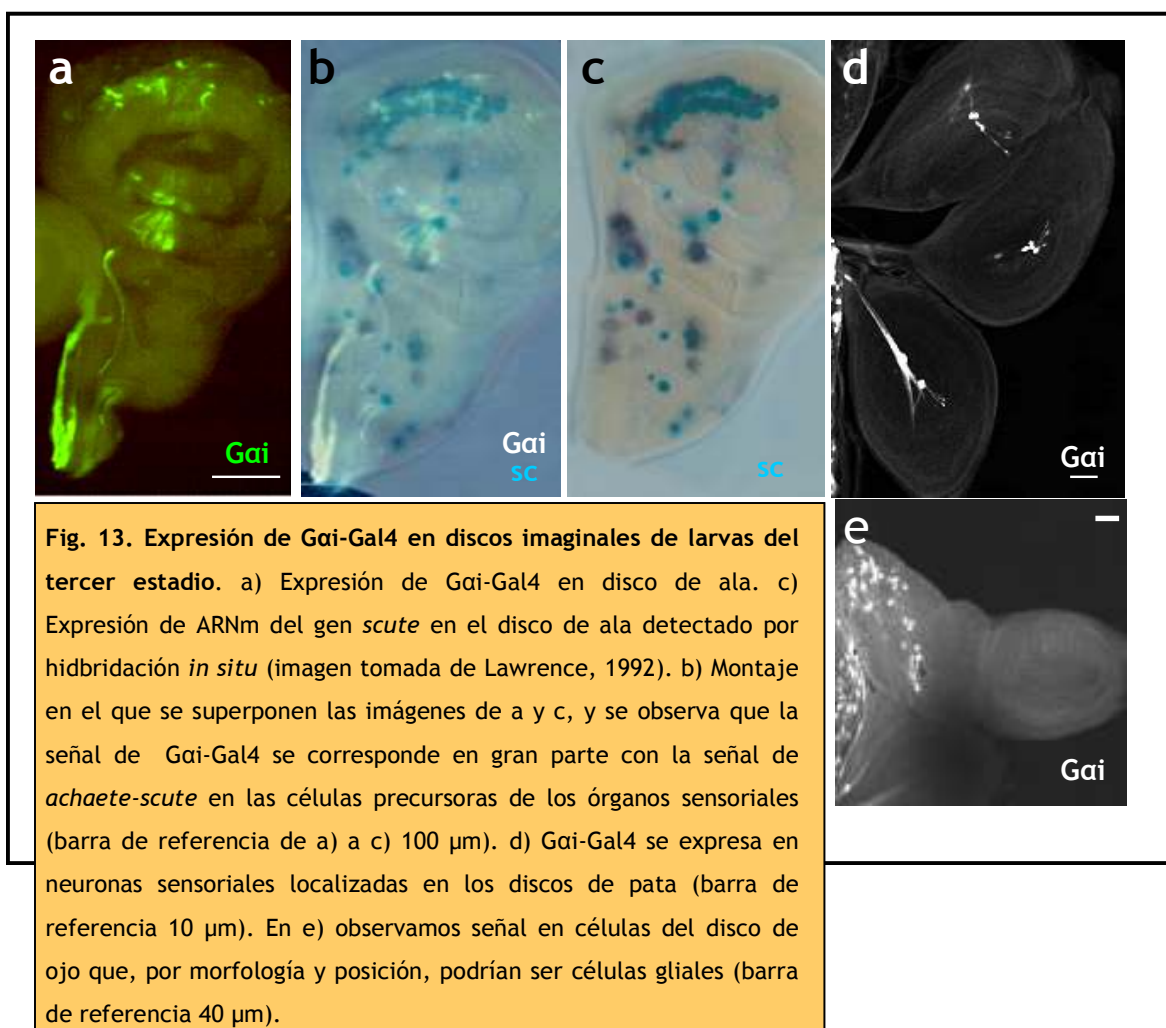


Fig.12 . Patrón de expresión de Gai-Gal4 en el tercer estadio larvario. La señal del Gai-Gal4 es visualizada mediante microscopía de fluorescencia o confocal gracias al gen marcador UAS-GFP. En a) podemos observar la señal en el cuerpo graso. Barra de referencia 20 μm . En b) se observa señal en el digestivo medio (probablemente histoblastos imaginales - flechas -). En c) se observa señal en las células del proventrículo (digestivo anterior). Barra de referencia en b) y c) 100 μm . En d) observamos señal en una célula que rodea a la tráquea, que por posición y morfología podría ser una célula INKA (señalada por la flecha), relacionada con el sistema endocrino. Barra de referencia 50 μ .

También observamos señal en los discos imaginales: disco de ala y disco de ojo-antena (figura 13). El patrón de expresión que Gai muestra en el disco de ojo-antena se restringe a células que por morfología y posición recuerdan a las células gliales, y además es muy similar al del marcador glial repo. En el disco de ala, la señal se localiza en la región que expresa componentes del complejo génico *achaete-scute*, que se expresa en células precursoras de órganos sensoriales.



Llama la atención la elevada de expresión que se observa en el SNC. Como podemos ver en la figura 14, en el ganglio ventral la señal es muy generalizada, sin delimitarse a una región concreta. En los hemisferios cerebrales también podemos ver abundante señal, siendo la señal dentro de estos especialmente intensa en la zona del cerebro central. También se observa señal en neuronas del SNP, como las que podemos ver en la figura 13 sobre el disco de pata.

Nosotros no hemos visto señal alguna en la glándula protorácica (órgano endocrino donde se sintetiza la ecdisona). Pudiera ser que la secuencia reguladora que posee el *Gai-Gal4* no sea completa, y que en la región que le falta se encuentre la que dirige la expresión en esta glándula (ver discusión).

Ampliación de la expresión de la línea *Gai-Gal4* en el SNC larvario

Debido a que nuestro interés se centra principalmente en estudiar la función de Gai en el desarrollo y función del sistema nervioso, analizamos con más detalle la

expresión de *Gai-Gal4* en el SNC (figura 14).

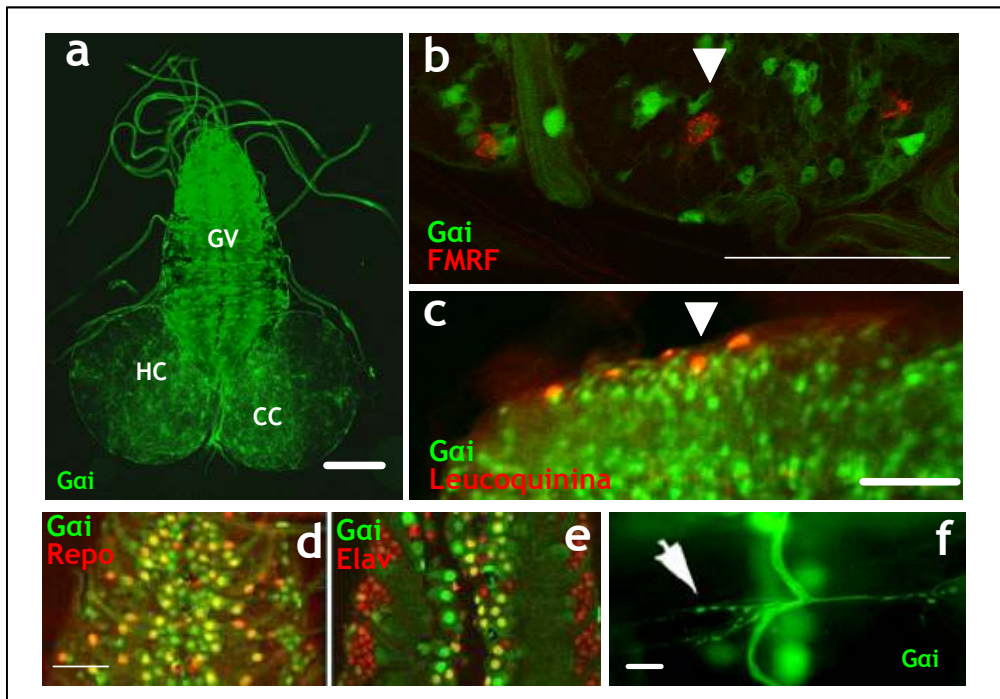


Fig. 14. Expresión de *Gai* en el Sistema Nervioso Central larvario. En todas las figuras la expresión del *Gai-Gal4* es visualizada gracias al UAS-GFP. En el ganglio ventral (GV) la señal es muy generalizada, sin delimitarse a una región concreta (a). Se ve abundante señal en la región perteneciente a los hemisferios cerebrales (HC), siendo la señal dentro de estos especialmente intensa en la zona del cerebro central (CC) (barra de referencia 50 μ m). En b) observamos un hemiganglio torácico del tercer estadio larvario donde en rojo podemos ver la señal del anticuerpo anti-FMRFamida y en verde la expresión de *Gai-Gal4* visualizado con el gen marcador UAS-GFPnls. La cabeza de flecha apunta a una célula Tv con colocalización de ambas señales. En c) tenemos un hemiganglio abdominal del tercer estadio larvario, donde en rojo podemos ver la señal del anticuerpo anti-Leucoquinina, y en verde la expresión de *Gai-Gal4* visualizado con el marcador UAS-GFPnls. La cabeza de flecha es un ejemplo de la colocalización de ambas señales, que se observa en todas las células leucoquinéricas ABLK (barra de referencia en b y c 25 μ m). En d) podemos ver una región del ganglio ventral en la que en verde se ve la expresión del *Gai-Gal4* y en rojo la expresión detectada con el anticuerpo anti-Repo, que marca toda la glia lateral. Podemos observar que la inmensa mayoría de las células expresan tanto Repo como GFP. En e) observamos una región del ganglio ventral en la que en verde se ve la expresión del *Gai-Gal4* y en rojo la señal del anticuerpo anti-Elav, que marca todas las neuronas. Podemos observar que tan solo en unas pocas células colocalizan las dos señales (barra de referencia 50 μ m). En f) la flecha señala la unión neuromuscular expresando *Gai-Gal4* (barra de referencia 10 μ m)

Expresión en neuronas

Para ver si *Gai* se expresa en neuronas realizamos dobles marcajes para detectar la proteína fluorescente GFP-nls, dirigida con el *Gai-Gal4*, junto con un

marcador que se expresa en todas las neuronas (el anticuerpo anti-Elav). Esta colocalización mostró que la mayoría (aproximadamente el 90%) de las células que expresaban GFP no colocalizaban con dicho marcador. Es decir, la mayoría de las células que expresan *Gai* no tienen identidad neuronal (figura 14d). Solo el 10% de las células *Elav* positivas presentaban señal GFP, delatándose de este modo como neuronas (figura 14e).

En los estudios realizados en *Manduca sexta*, observaron expresión de proteína *Gai* en motoneuronas y células neurosecretoras (Copenhaver y cols., 1995). Nosotros también pudimos, en algunos casos, concretar que tipo de neuronas son las que expresan *Gai-Gal4*. Por ejemplo, existe una clara señal de la proteína marcadora GFP en la terminación neuromuscular larvaria de los segmentos abdominales (figura 14f), lo que indica que al menos las motoneuronas abdominales sí expresan *Gal4*, al igual que ocurre en *Manduca sexta*. Sabemos también que algunas de las neuronas que expresan el *Gai-Gal4* son células neurosecretoras, resultado obtenido gracias a estudiar la colocalización de los genes marcadores (siempre bajo el gobierno del *Gai-Gal4*) con los anticuerpos que reconocen a los neuropéptidos FMRFamida y Leucoquinina (figura 14 b y c). Sin embargo, sólo las células peptidérgicas del ganglio ventral expresan GFP, mientras que las células peptidérgicas de los hemisferios cerebrales carecen de señal GFP (datos no mostrados). Estos datos coinciden, de nuevo con los obtenidos en el estudio de *Manduca sexta*.

Expresión en células gliales

Los resultados de la colocalización con *Elav* demostraron la identidad neuronal de solo una subpoblación de las células que expresan *Gai* (revelado por la expresión de *Gai-Gal4*), evidenciando que el resto de las células no eran neuronales. Para ver si esas células podrían pertenecer a la glia, hicimos un doble marcaje con un anticuerpo que reconoce la proteína *Repo* específica de glia. La mayoría de las células que expresan *Gai* colocalizan con *Repo* (aproximadamente el 85%) aunque existen algunas células gliales que no expresan *Gai* (figura 14d).

Resumiendo, *Gai* se expresa en la mayoría de las células gliales en el SNC larvario, y en un bajo porcentaje (10%) de neuronas, que incluyen motoneuronas y células neurosecretoras. Sin embargo, aproximadamente el 5% de las células con señal *Gai* no expresan ni *Elav* ni *Repo*, sugiriendo que podrían ser células precursoras, bien neuroblastos, bien glioblastos o bien otras células madre neurales.

Expresión de la línea *Gai-Gal4* en adulto

En adulto se mantiene la señal que hemos descrito en el sistema nervioso central, en el cuerpo graso, tubo digestivo y glándulas salivales. Observamos también señal en el sistema nervioso periférico (recordemos que en la larva veíamos expresión en células que eran susceptibles de ser precursores de órganos sensoriales). Esta señal la podemos observar en zonas sensoriales de antenas, pata, alas, palpos maxilares, probóscide y cutícula (figura 15).

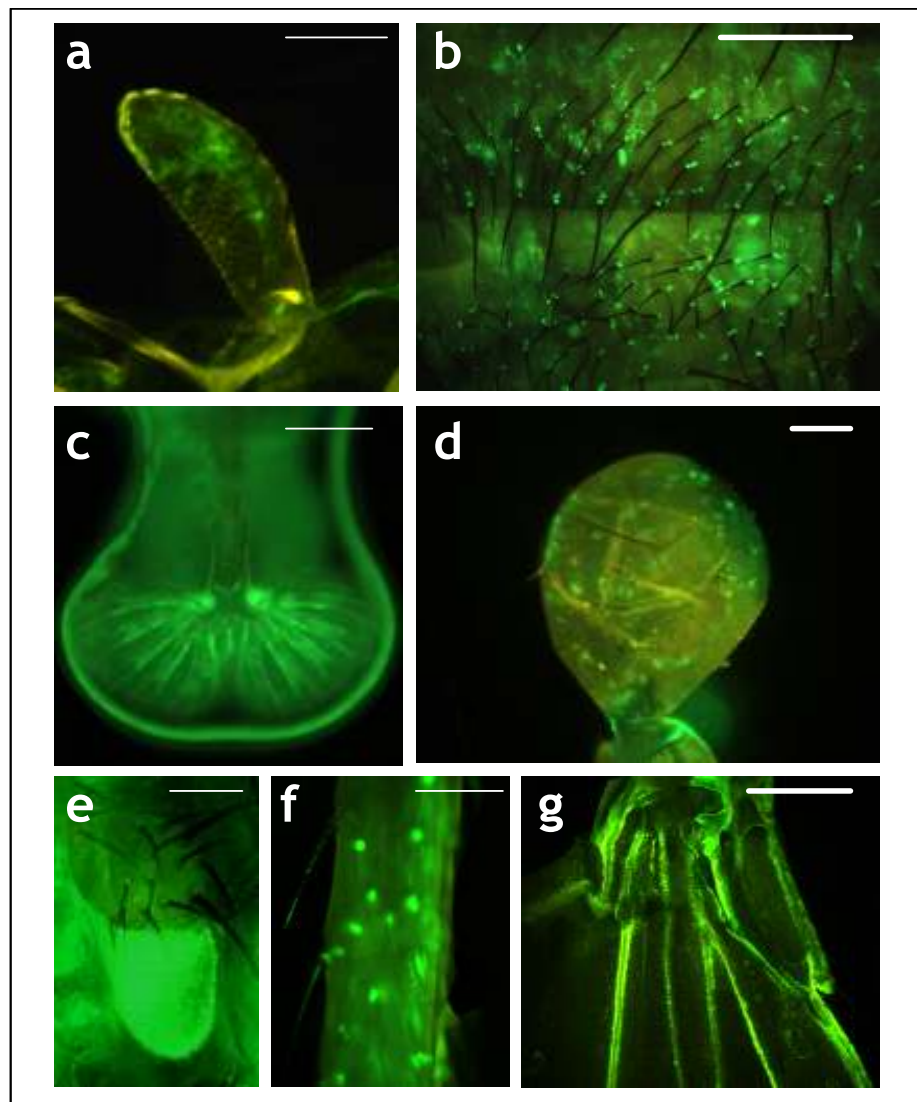
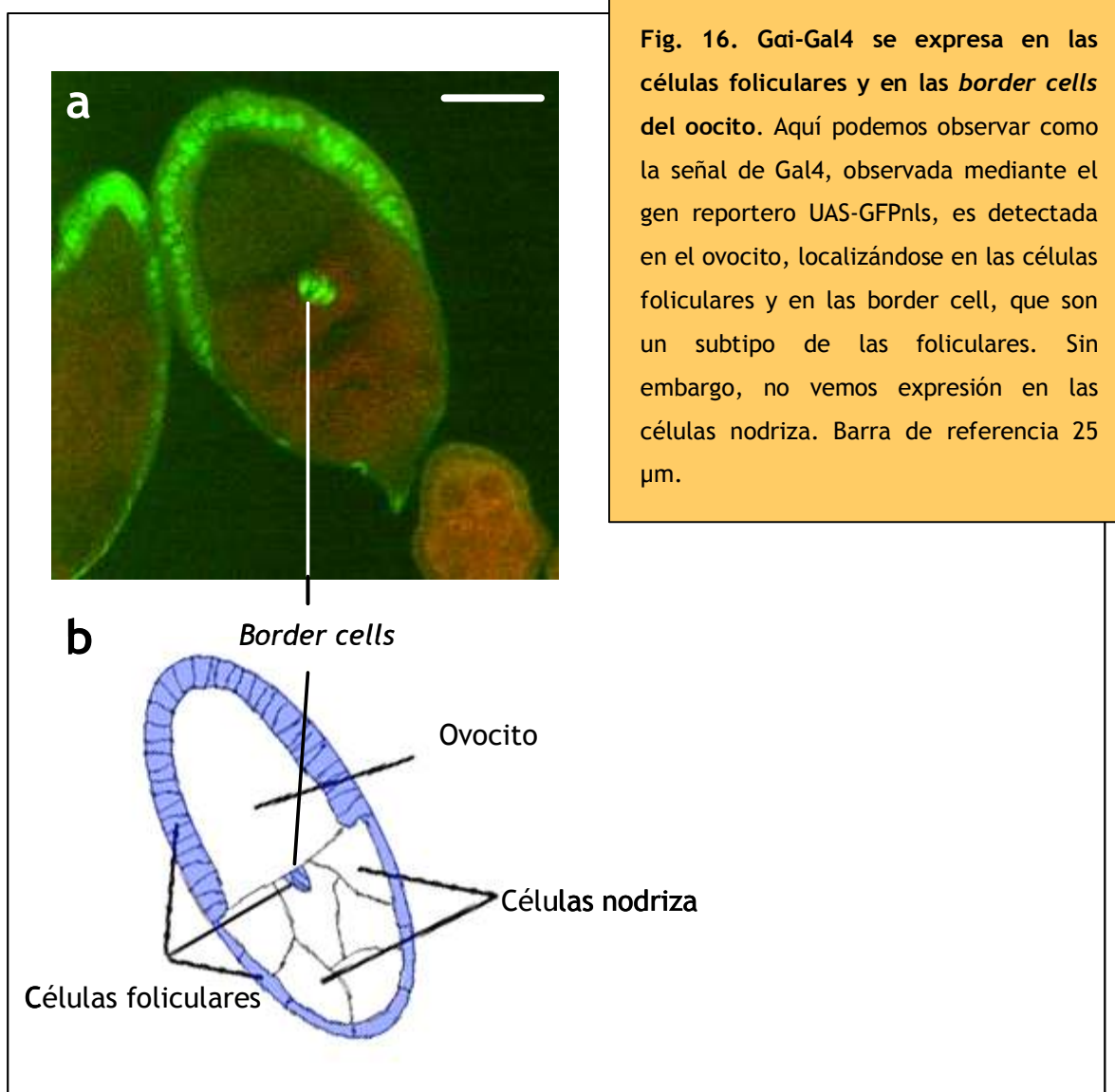


Fig. 15. Patrón de expresión de *Gai-Gal4* en sistema nervioso periférico del adulto. La señal del *Gai-Gal4* es visualizada *in toto* mediante microscopía de fluorescencia gracias al gen marcador *UAS-GFP*: a) palpo maxilar (barra de referencia 25 μm); b) cutícula (barra de referencia 50 μm); c) probóscide (barra de referencia 50 μm); d) halterio (barra de referencia 100 μm); e) antena (barra de referencia 25 μm); f) pata (barra de referencia 20 μm) y g) ala (barra de referencia 200 μm).

Estudios anteriores habían encontrado, mediante hibridaciones *in situ*, expresión de ARNm de G α i en cortes de parafina de los ovarios, concretamente en las células nodriza y en el oocito (Wolfgang y cols., 1991). También detectaron en cortes de parafina de los ovarios expresión proteica, siendo esta expresión distinta a la del ARNm. En las primeras etapas de la maduración del oocito detectan proteína en células foliculares y algunos gránulos en el oocito. Posteriormente la señal se extiende a todas las células foliculares y se observan más gránulos en el citoplasma del oocito, y según avanza la maduración del oocito se pierde la señal en las células foliculares y la señal se reduce a gránulos en el ooplasma. No ven proteína en las células nodriza (Wolfgang y cols., 1991).



Nosotros dirigiendo el transgen *UAS-GFP-nls* con el *Gai-Gal4*, también vemos señal en los ovarios, donde la señal está bien definida y restringida a todas las células foliculares, incluyendo las denominadas *border cells*. No encontramos señal en las células nodrizas ni tampoco en el oocito (figura 16).

Caracterización de los fenotipos de falta de función del gen *Gai*

Al inicio de esta tesis doctoral, no se había publicado la existencia de ningún mutante para el gen *Gai*. Por tanto, los mutantes desarrollados por la Dra. Torroja, y que son los utilizados en este trabajo eran los primeros mutantes para el gen *Gai* en *Drosophila melanogaster*. Posteriormente, el grupo de Fengwei Yu publicó la existencia de otros mutantes para este gen generados por ellos mismos (Yu y cols., 2003).

Como hemos podido ver en antecedentes, disponíamos de distintos alelos mutantes en *Gai*. Los dos primeros alelos con los que trabajamos fueron el *Gai^{UASΔ4}* y el *Gai^{UASΔ7}*, de los cuales el alelo con mayor delección es el *Gai^{UASΔ7}*. Ambos conservan la secuencia UAS del elemento P insertado. Posteriormente dispusimos del alelo *Gai^{Δ3}*, que es el más extremo, fenotípicamente, de todos los que tenemos, y por ello es con el que hemos realizado la mayoría de los experimentos. La inmensa mayoría de los experimentos se han realizado con varios alelos, y los fenotipos observados son los mismos.

Los mutantes para *Gai* cigótico son viables y fértiles

Sorprendentemente, a pesar de la localización tan generalizada de la proteína *Gai* (tanto en el espacio como en el tiempo), los mutantes en *Gai* son viables y fértiles y no se observan defectos morfológicos y anatómicos aparentes. Este hecho probablemente se debe a que tanto la proteína como el ARNm son suministrados por la madre al oocito, es decir, el gen tiene efecto materno (Wolfgang y cols., 1991).

Aunque fértiles, las hembras mutantes para *Gai* cruzadas por machos mutantes en *Gai* depositan pocos huevos. Por esta razón, y debido a la expresión de *Gai* en ovarios (Wolfgang y cols., 1991; este trabajo), los ovarios de los mutantes homocigóticos para el gen *Gai* se han estudiado con especial interés.

Para el estudio de los ovarios hemos realizado cortes de parafina que posteriormente se han teñido con Giemsa. De esta manera no hemos observado ninguna anomalía aparente. Además hemos hecho un estudio más detallado de estas estructuras analizando la organización del citoesqueleto, observando la actina de sus células en ovarios *in toto*, mediante el uso de faloidina unida a un fluoróforo (la faloidina es un alcaloide extraído de la *Amanita faloides*, que se une de forma específica a los filamentos de actina). Tampoco en este estudio hemos observado diferencias anatómicas o morfológicas entre los ovarios mutantes y los silvestres (no mostrado). Por tanto, los ovarios mutantes no presentan diferencias anatómicas o morfológicas, lo que sugiere que la baja fertilidad de las hembras mutantes en *Gai* no se debe a defectos en la ovogénesis. De hecho, posteriormente comprobamos que la fertilidad de las hembras mutantes para *Gai* es normal cuando se cruzan por machos heterocigóticos para la mutación en *Gai*. Por tanto, la baja deposición de huevos al cruzar hembras por machos mutantes en *Gai* podría deberse a defectos en el apareamiento con machos mutantes, y no a defectos en la viabilidad per se.

♂ \ ♀	<i>Gai</i>^{Δ3}	<i>Gai</i>^{UASΔ4}	<i>Gai</i>^{UASΔ7}	<i>Gai</i>^{P(w+)}<i>Gal4Δ4</i>
<i>Gai</i>^{Δ3}	40%	65%	98%	100%
<i>Gai</i>^{UASΔ4}		80%	92%	3.3%
<i>Gai</i>^{UASΔ7}			99%	6.7%
<i>Gai</i>^{P(w+)}<i>Gal4Δ4</i>				92%

Tabla 2. Estudio de la complementación de los distintos alelos de *Gai*. En esta tabla están recogidos los estudios de viabilidad realizados al cruzar moscas heterocigóticas para cada uno de los alelos, y representa el porcentaje de la descendencia transheterocigótica u homocigótica, según corresponda, respecto a la descendencia heterocigótica. El alelo que presenta la viabilidad más reducida en homocigosis es *Gai*^{Δ3}, seguido de *Gai*^{UASΔ4} y el *Gai*^{UASΔ7}. Problemas graves de viabilidad muestran los transheterocigóticos *Gai*^{P(w+)}*Gal4Δ4*/*Gai*^{UASΔ7} y *Gai*^{P(w+)}*Gal4Δ4*/*Gai*^{UASΔ4} (ver texto para más explicación)

Al cruzar hembras mutantes en *Gai* con machos heterocigóticos para la mutación en *Gai*, observamos que aunque viables, el porcentaje de progenie mutantes homocigóticos *Gai* es menor que el porcentaje de progenie heterocigótica. Por tanto, para estudiar la severidad de los distintos alelos mutantes para *Gai* analizamos su viabilidad, estudiando el porcentaje de progenie homocigótica obtenida a partir de padres heterocigóticos. Los resultados de estos experimentos están recogidos en la tabla 2, donde podemos ver que el alelo más extremo es *Gai*^{Δ3} seguido del *Gai*^{UASΔ4}, mientras que los menos extremos serían el *Gai*^{UASΔ7} y *Gai*^{P(w+)Gal4Δ4}.

También se realizó un estudio de complementación entre los distintos alelos, analizando la viabilidad de los transheterocigóticos hijos de mutantes heterocigóticos (tabla 2). De este estudio llama la atención la baja viabilidad de la progenie en *Gai*^{P(w+)Gal4Δ4}/*Gai*^{UASΔ4} y *Gai*^{P(w+)Gal4Δ4}/*Gai*^{UASΔ7} (3.3%, n=160 y 6.7%, n=124 de viabilidad respectivamente). La explicación a este hecho reside en la naturaleza de las deleciones de los alelos *Gai*^{UASΔ4} y *Gai*^{UASΔ7}, que a diferencia del alelo *Gai*^{Δ3}, conservan la secuencia UAS, de modo que la unión a esta secuencia del activador transcripcional Gal 4 desembocará en la expresión de las secuencias localizadas en posición 3' (ver antecedentes). Todos los alelos mutantes tienen delecionada la secuencia ATG de iniciación de traducción *Gai*, aunque la extensión de la deleción varía en cada uno de ellos. La Dra. Torroja, al generar estos alelos (ver Antecedentes) los estudió mediante RT-PCR y secuenciación (usando distintas combinaciones de oligonucleótidos, ver Materiales y métodos) y pudo ver los distintos transcritos que producen cada uno de ellos. En el caso del alelo *Gai*^{UASΔ4} se detectan fundamentalmente 2 transcritos, que, asumiendo que se tradujesen a proteína, utilizando la primera secuencia ATG del transcrito, producirían: el primero una proteína a la que le faltarían los 36 aa N-terminal; y el segundo, una proteína a la que le faltarían 53 aa N-terminal (en esta última deleción faltaría parte del sitio de unión al GTP y probablemente parte de la región GTPasa de la subunidad *alpha* - Morris y Malbon, 1999 -). En el caso del alelo *Gai*^{UASΔ7} se detecta principalmente un transcrito, que asumiendo que se tradujesen a proteína utilizando la primera secuencia ATG del transcrito, produciría una proteína a la que le faltarían también los 53 aa N-terminal. Por tanto, las proteínas que se estarían expresando a partir de las secuencias UAS de los alelos *Gai*^{UASΔ7} y *Gai*^{UASΔ4} serían formas truncadas de *Gai* que de alguna forma podrían interferir con los procesos en los que se encuentra implicada *Gai*, o incluso otras proteínas G, empeorando con mucho la viabilidad de estos individuos.

Los mutantes que carecen del producto *Gai* materno y cigótico (*Gai*⁻) presentan una viabilidad reducida y retraso en el crecimiento

Dada la viabilidad y falta de fenotipos obvios que presentan los mutantes a los que solo les falta el componente cigótico de *Gai*, realizamos el análisis del fenotipo en la segunda generación en los individuos mutantes procedentes de padres homocigóticos para la mutación en *Gai*, que carecen tanto de producto materno como de cigótico. A partir de ahora, de no ser que se diga lo contrario, nos referiremos a estos individuos como mutantes *Gai*⁻.

A estos mutantes les hemos hecho un seguimiento pormenorizado de su desarrollo en busca de posibles defectos en el mismo. Para ello, seguimos el desarrollo de 171 huevos depositados (figura 17) del alelo *Gai*^{UASΔ4}. La viabilidad de los mutantes *Gai*⁻ está sustancialmente reducida (1,5% de viabilidad). Los picos de letalidad más acusados los observamos en el paso del primer estadio larvario al segundo, y durante la metamorfosis; de hecho, sólo el 5% de las pupas acaban eclosionando. Tan solo un 1.5% de los huevos depositados llegan a imago, pero sorprendentemente, los pocos individuos que eclosionan son fértiles.

La letalidad no es el único aspecto anormal de su desarrollo, presentan también un importante retraso en su crecimiento como podemos ver en la figura 17. Los sucesivos estadios de desarrollo de los mutantes *Gai*⁻ pueden llegar a ser en algunos individuos 4 días más largos que los estadios de individuos silvestres. De los pocos individuos que llegan a pupa la inmensa mayoría acaba muriendo. Este retraso en el crecimiento está acompañado en estos mutantes por una mala movilidad y una muy baja actividad (ver discusión).

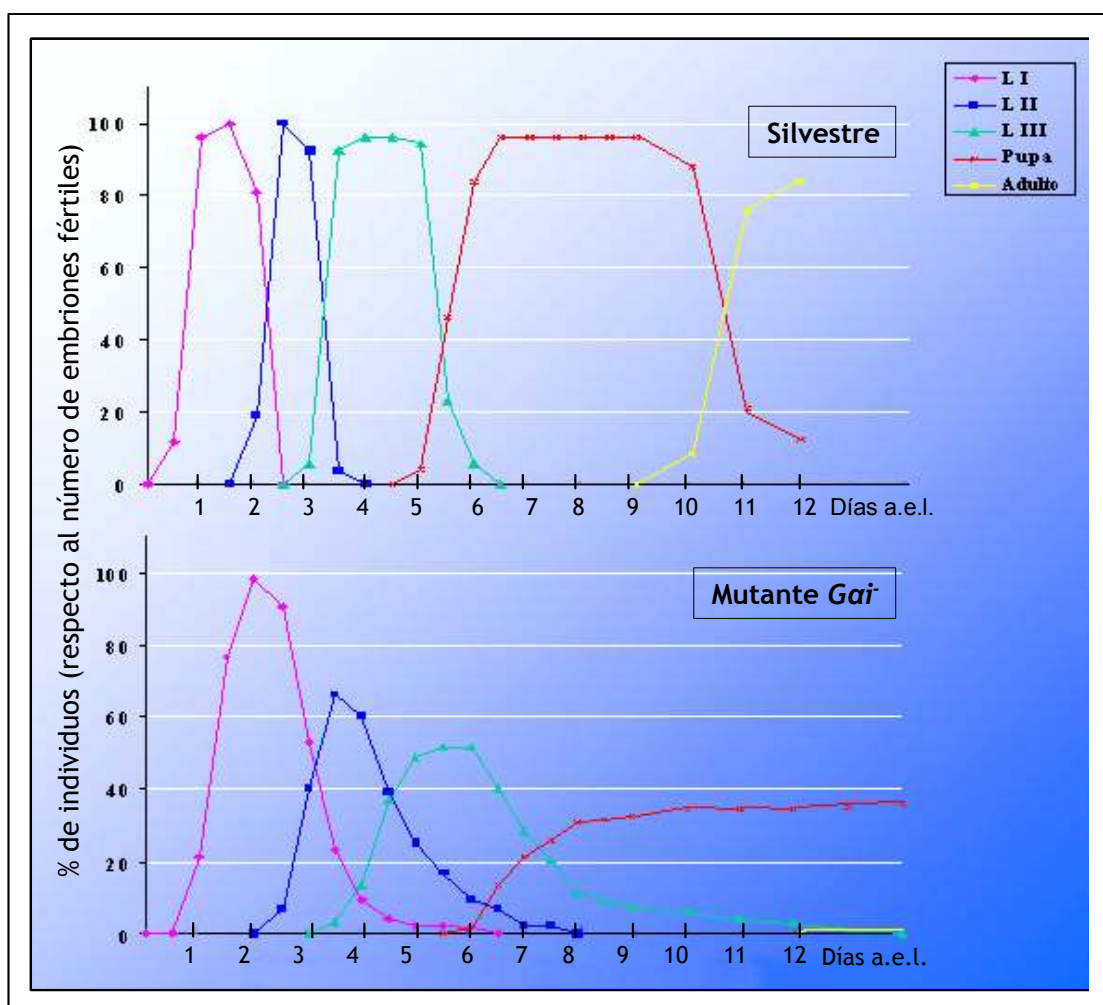


Fig. 17. Los mutantes *Gai* muestran viabilidad reducida y retraso en el crecimiento. En esta figura observamos un estudio de viabilidad, donde se representa el número individuos supervivientes a lo largo del paso del tiempo (en días después de la deposición del huevo o días a.e.l., del inglés *after egg laying*). La gráfica superior pertenece a los individuos silvestres, y la inferior corresponde a los individuos mutantes *Gai*. La viabilidad de los mutantes *Gai* está sustancialmente reducida. Los picos de letalidad más acusados los observamos en el paso del primer estadio larvario al segundo y durante la metamorfosis, de manera que tan solo un 1.5% de los huevos depositados llegan a imago. Los mutantes *Gai* presentan también un importante retraso en su crecimiento, como se puede observar por la existencia de larvas I mutantes a los 7 días a.e.l. (2.5 días a.e.l. máximo para el silvestre) o de larvas III mutantes 12 días a.e.l. (6.5 días a.e.l. máximo para LIII silvestre).

Los mutantes *Gai* presentan importantes defectos en la ecdisis

Además del retraso en el crecimiento, las larvas mutantes *Gai* presentan defectos en su ecdisis. Los mutantes *Gai* tienen muchos problemas para deshacerse de la mandíbula que corresponde al estadio anterior, y es muy frecuente encontrar individuos con la mandíbula correspondiente al estadio en el que se encuentran más la que poseían en el estadio anterior (figura 18) (poseen doble mandíbula el 90% de

las larvas muertas). En raras ocasiones coexisten incluso las tres mandíbulas de los tres estadios larvarios. Lo mismo ocurre, sólo que con mucha menor frecuencia, con la cutícula, y se observa de vez en cuando alguna larva mutante donde coexisten las cutículas de dos estadios larvarios (figura 18b). Estos fenotipos se observan con todos los alelos.

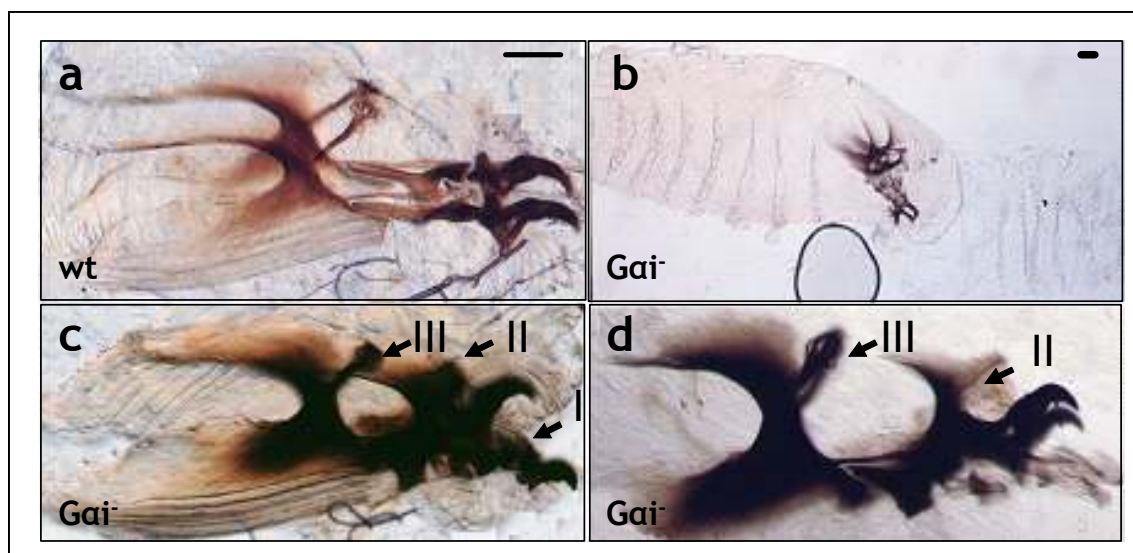


Fig. 18. Las larvas mutantes *Gai*⁻ presentan defectos en la ecdisis. En a) observamos la mandíbula de una larva del tercer estadio silvestre. b) - d) Larvas mutantes *Gai*⁻. En ocasiones, se observan larvas mutantes donde coexisten las cutículas de dos estadios larvarios (b, la flecha señala la cutícula vieja). En un alto porcentaje de larvas mutantes coexisten mandíbulas de 3 (c) o 2 (d) estadios larvarios. Las flechas señalan las mandíbulas de estadios larvarios III, II y/o I en las larvas mutantes. (Barra de referencia 20 μ m).

Las mutaciones publicadas en las que aparecen estos problemas de ecdisis suelen corresponder a problemas en la síntesis de ecdisona (o en su secreción) o a problemas en la señalización que desencadena la ecdisona (Park y cols., 2002) (ver Discusión).

Además de analizar el ciclo vital de los mutantes *Gai*⁻, estudiamos en detalle si estos presentaban alteraciones anatómicas. En concreto, y dada la elevada expresión en el SNC, analizamos posibles alteraciones en el SNC derivadas de la falta de *Gai*.

Las motoneuronas de los mutantes *Gai*⁻ presentan una morfología, número y disposición normal

La expresión de *Gai* en motoneuronas, junto con la mala movilidad que presentan las larvas, nos llevaron a estudiar en detalle las terminaciones

neuromusculares larvarias de los mutantes *Gai⁻*. Estas se estudiaron en el tercer estadio larvario, y se tomaron como referencia las uniones neuromusculares de los músculos 4, 6/7, 12 y 13 de los 6 primeros segmentos abdominales. El patrón que siguen dichas uniones es constante y reproducible en todos los segmentos abdominales y entre individuos. Nosotros hemos visualizado las uniones neuromusculares mediante el anticuerpo 10F1, observando minuciosamente su morfología, su número, y su disposición, en busca de alguna anomalía. Tras este estudio podemos afirmar que las terminaciones neuromusculares de los mutantes *Gai⁻* son normales en todos los aspectos mencionados (cabezas de flechas en la figura 19a y c), a excepción de las terminaciones correspondientes a músculos defectuosos, defectos musculares que describimos en el apartado siguiente. Estos experimentos se han realizado con el alelo *Gai^{P(w+)}Gal4Δ4*.

En la pared muscular larvaria en los mutantes *Gai⁻* encontramos fusiones y duplicaciones de algunos músculos

A la vez que estudiábamos las uniones neuromusculares estudiamos con detenimiento el patrón muscular de la pared larvaria (responsables de los movimientos de reptación de la larva). Los músculos larvarios están muy bien estudiados y caracterizados, a la vez que siguen un patrón constante y totalmente reproducible. Cada segmento abdominal de la pared larvaria tiene tres capas musculares, en la interior se encuentran los músculos numerados del 1 al 7, en la exterior del 9 al 17 y en la superior del 18 al 29. El estudio de estos músculos se suele realizar, al igual que en el caso de las uniones neuromusculares, en los 6 primeros segmentos abdominales, y así lo hemos hecho aquí. En los mutantes *Gai⁻* el 20.83% de los músculos se encuentran alterados (72 hemisegmentos estudiados) (figura 19). El 11.47% de los músculos están duplicados (y por tanto dan lugar a músculos extras), y el 9.36% están fusionados (encontrando un músculo en el lugar donde debería haber dos, ver figura 19). Es decir, en la pared muscular larvaria en los mutantes *Gai⁻* encontramos fusiones y duplicaciones musculares. Estos experimentos se han realizado con el alelo *Gai^{P(w+)}Gal4Δ4*, y el fenotipo ha sido ratificado con el alelo *Gai^{Δ3}*.

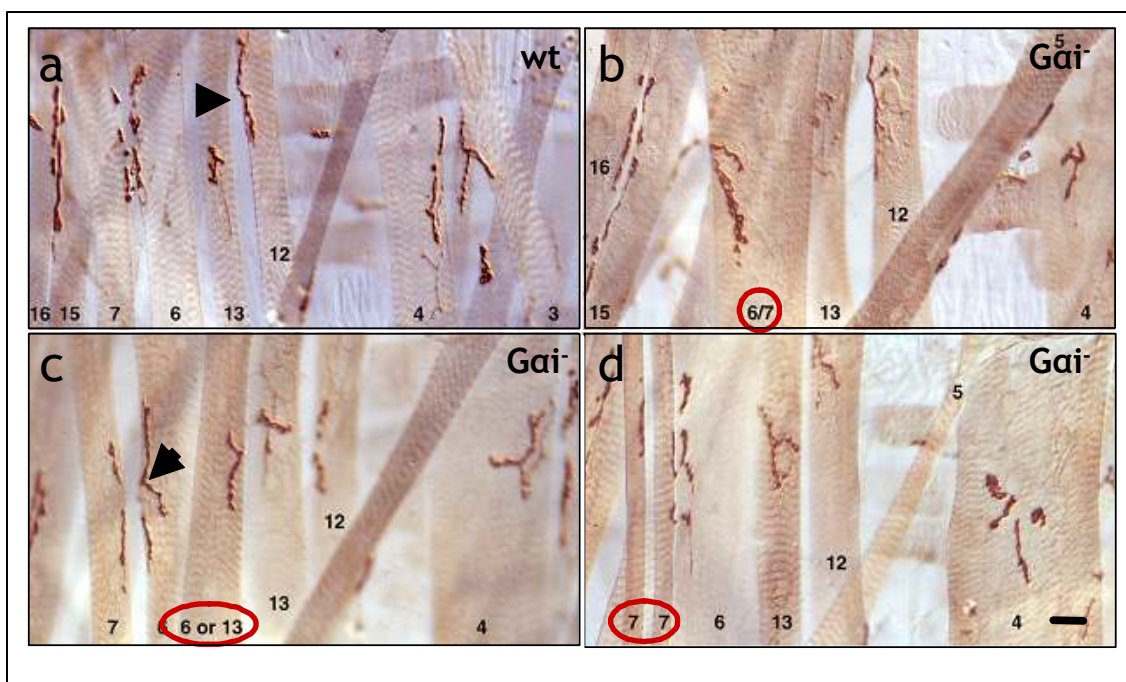


Fig.19. Los mutantes *Gai⁻* muestran fusión o duplicación de algunos de los músculos de la pared abdominal larvaria. Las imágenes muestran larvas del tercer estadio donde se muestran las fibras musculares de la pared abdominal. En a) podemos ver el individuo silvestre, y de b) a d) son mutantes *Gai⁻*. Podemos observar en b) una fusión entre los músculos 6 y 7; en c) duplicaciones en los músculos 6 ó 13; y en d) duplicación del músculo 7. Este fenotipo podría ser debido a fallos en la división asimétrica de los precursores musculares. Barra de referencia 20 μm .

Los mutantes *Gai⁻* tienen defectos en la condensación del ganglio ventral

El fenotipo más acusado que presentan los mutantes *Gai⁻* es, sin duda alguna, la anormal morfología que presenta su sistema nervioso central, concretamente el ganglio ventral. Como se puede apreciar en la figura 20, el ganglio ventral mutante es mucho más elongado que el del individuo salvaje. Es decir, existe una falta de condensación en el SNC. La expresividad del fenotipo es variable (aunque siempre es un fenotipo visible y llamativo), pero la penetrancia es completa (ambas en todos los estadios y alelos), se manifiesta en ambos sexos y aparece en todos los alelos mutantes.

La condensación del SNC es un proceso complejo por el cual un tejido sufre una coordinada reducción del tamaño y un incremento en la densidad celular durante el desarrollo. Aunque ocurre en muchos contextos del desarrollo, los mecanismos subyacentes a estos procesos son ampliamente desconocidos. Es en embriones donde este proceso está más estudiado. En el ganglio ventral embrionario, la condensación se produce a lo largo del eje antero-posterior, comienza al final del estadio 15 y se

desarrolla en su mayor parte al final del estadio 16 y principio del 17. En el estadio 15 el ganglio ventral ocupa el 80% de la longitud total del embrión mientras que al final del estadio 17 ocupa el 60%.

Hay tres procesos principales que coinciden con la condensación del SNC durante la embriogénesis:

- La deposición de matriz extracelular (a lo largo del SNC) por parte de los hemocitos.
- El inicio de la actividad del sistema nervioso central.
- El correcto desarrollo y diferenciación de las células de la glia, así como de la red neuronal y el neuropilo.

El fenotipo de falta de condensación del ganglio ventral lo vemos por primera vez en los mutantes *Gai⁻* en el estadio 17, cuando el ganglio ventral de los embriones silvestres ocupa el 61% de la longitud total del embrión (n=24), y el ganglio mutante embrionario ocupa el 68% del total del embrión (n=18); es decir, los ganglios mutantes embrionarios son un 11.5% más largos que los silvestres ($t_{40}=-24.287; p < < 0.001$) (figura 20). No dejamos de observar este fenotipo en ningún momento de la vida de la mosca, es decir, se mantiene a lo largo de los tres estadios larvarios, sobrevive a la metamorfosis de la pupa y tampoco desaparece en la vida del adulto (figura 20). Sin embargo, las proporciones de elongación respecto a los individuos silvestres varían mucho de embrión a larva, y de larva a adulto. En el embrión, el mutante es un 11.5% más elongado que el silvestre, en la larva un 45% ($t_{36}=-12.621; p < < 0.001$) y en el adulto un 25% ($t_{22}=-15.212; p < < 0.001$). Estos porcentajes probablemente son un reflejo de las distintas reestructuraciones que sufre el animal a lo largo de las distintas etapas.

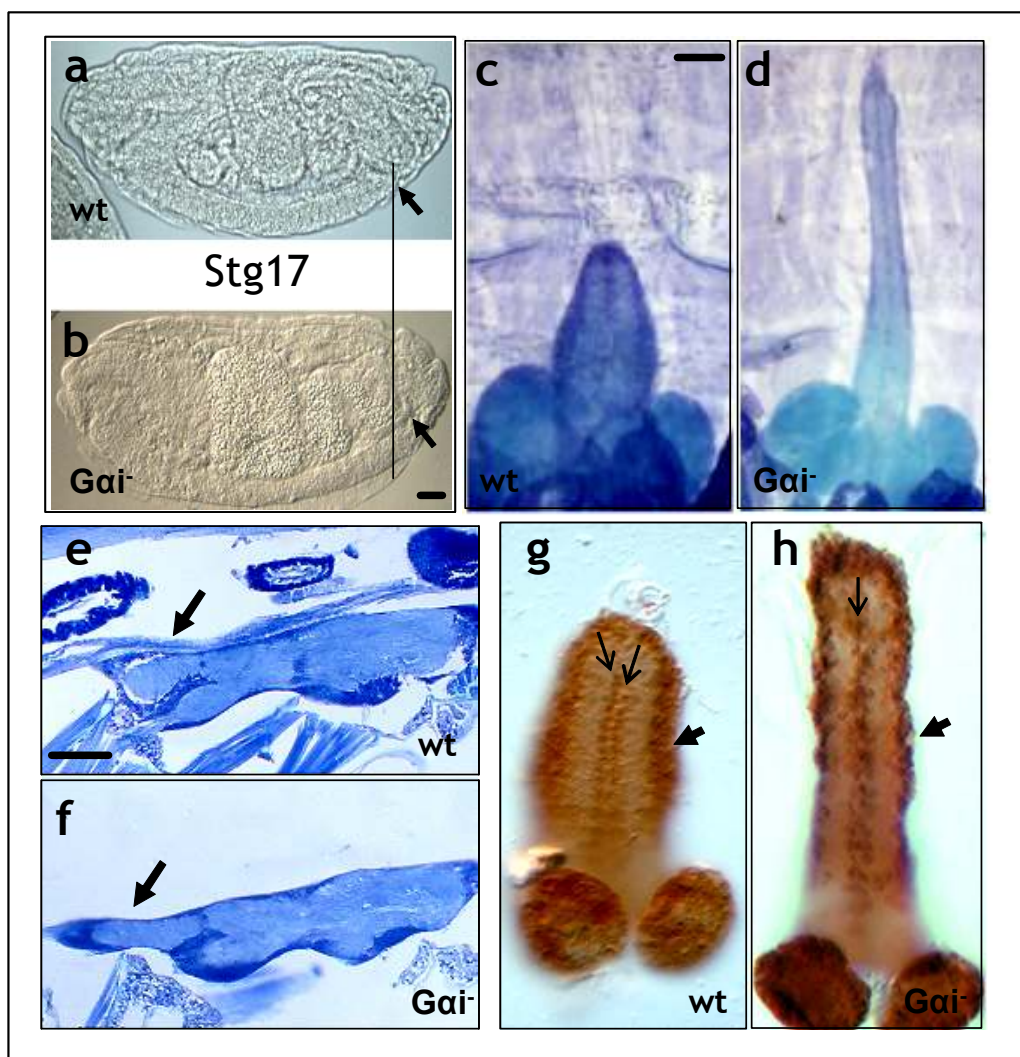


Fig. 20 . Los mutantes *Gai*⁻ muestran falta de condensación en el ganglio ventral. En a) observamos un embrión silvestre del estadio 17, en b) observamos un embrión mutante *Gai*⁻ del mismo estadio. El ganglio ventral mutante ocupa un 11.5% más que el silvestre (las flechas indican el final del ganglio)(Barra de referencia 20 μ m). En c) se muestra el SNC de un individuo silvestre del tercer estadio larvario teñido con Giemsa, y en d) el mismo estadio larvario de un mutante *Gai*⁻ (Barra de referencia 50 μ m). El ganglio ventral del individuo mutante es un 45% más largo que el silvestre. En e) se muestra un corte sagital del torax de un adulto salvaje teñido con Giemsa, donde se muestra el ganglio ventral (barra de referencia 50 μ m). Las flechas indican la región abdominal del ganglio ventral. En f) podemos observar el mismo corte mostrando el ganglio ventral de un individuo mutante *Gai*⁻. El ganglio ventral del individuo mutante es un 25% más largo que el silvestre (barra de referencia 50 μ m). En g) y h) se muestra el SNC de individuos del primer estadio larvario. Anterior es abajo. g) es silvestre y h) es mutante *Gai*⁻. Podemos observar como en los individuos mutantes *Gai*⁻, el cortex del ganglio ventral es más delgado que en los individuos silvestres (cabezas de flecha). También se puede observar como las dos columnas mediales de células (flechas) se encuentran totalmente desorganizadas en los individuos mutantes. Barra de referencia 50 μ m.

Hemos estudiado también el patrón neuronal mediante el anticuerpo anti-Elav (que reconoce todas las neuronas) en el ganglio ventral larvario, con el fin de observar posibles diferencias en la disposición de las neuronas, dada la extraña

morfología que presentan los ganglios alongados mutantes *Gai⁻*. El ganglio nervioso ventral, de las larvas silvestres, está formado por una gruesa capa de neuronas que constituyen el cortex (en la periferia de todo el ganglio), que a su vez rodea a dos gruesas bandas de neuropilo que recorren el ganglio en dirección antero-posterior. Estas bandas de neuropilo se encuentran a ambos lados de dos columnas de neuronas que en posición medial recorren el embrión de nuevo en el eje antero-posterior (flechas en figura 20g). En los mutantes *Gai⁻*, las dos filas de neuronas mediales no se pueden discriminar, pues las células que las constituyen están totalmente desorganizadas y se entremezclan las células de una columna con las de la otra. Por otro lado, el cortex torácico-abdominal de los mutantes *Gai⁻* está formado por una capa de células mucho más delgada que en el caso de los ganglios silvestres (cabezas de flecha en figura 20 g y h).

Análisis celular de alteraciones en el sistema nervioso de mutantes *Gai⁻*

El fenotipo de falta de condensación del ganglio ventral ha sido el objeto prioritario de estudio desde el momento de su aparición. En los siguientes apartados desarrollaremos el estudio en los mutantes *Gai⁻* de procesos relacionados con la condensación del ganglio ventral, intentando averiguar si alguno de ellos es el responsable de esta falta de condensación que observamos.

La disminución de actividad neuronal en los mutantes *Gai⁻* no es la principal responsable de la falta de condensación del ganglio ventral.

El inicio de la condensación coincide con el comienzo de la actividad sináptica. En trabajos anteriores, realizados por el grupo de Olofsson, demostraron que al bloquear completamente la actividad sináptica en embriones, expresando la toxina tetánica de forma pan-neural con *elav-Gal4*, el ganglio ventral no se condensa correctamente (Olofsson and Page, 2005). Sin embargo, este no es el factor determinante, porque la elongación respecto al silvestre no supera el 7.2% cuando se bloquea totalmente la actividad sináptica.

En nuestro caso, puesto que alguno de los mutantes *Gai*⁻ llega a adulto, por definición, el SNC tiene que tener actividad. Es probable que, debido a los defectos que tienen en la barrera hematoencefálica los mutantes *Gai*⁻ (Schwabe y cols., 2005), la actividad sináptica esté disminuida, lo que explicaría la escasa actividad locomotora de estos individuos. Sin embargo, esta disminución en la actividad neuronal contribuiría en un pequeñísimo porcentaje a la elongación observada. Podemos concluir que la disminución de actividad neuronal no parece ser la principal responsable de la falta de condensación del ganglio ventral de los mutantes *Gai*⁻.

La migración de los hemocitos no está interrumpida en los mutantes *Gai*⁻.

Los hemocitos de *Drosophila* son células sanguíneas fagocíticas móviles, que sintetizan varios componentes de la matriz extracelular. Estudios anteriores demuestran que en mutantes donde no se produce la migración de los hemocitos, la condensación del ganglio ventral está inhibida, llegando a ser el ganglio ventral embrionario mutante un 23% más largo que su versión silvestre (Olofsson and Page, 2005).

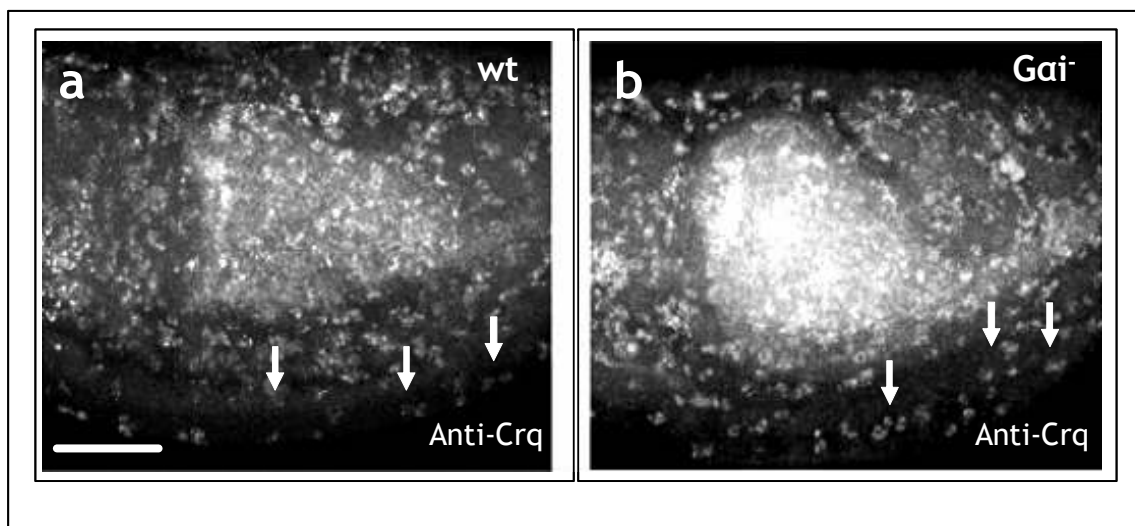


Fig.21. La migración de los hemocitos no está interrumpida en los mutantes *Gai*⁻. La condensación del ganglio ventral embrionario depende, entre otros factores, de la matriz extracelular depositada por los hemocitos. Nosotros hemos visualizado los hemocitos con el anticuerpo anti-Crq en embriones del estadio 15 en a) silvestre y b) mutante *Gai*⁻. Podemos ver señal anti-Crq a lo largo de todo el ganglio ventral, lo que indica que existe migración de los hemocitos en los individuos mutantes *Gai*⁻. Anterior es a la izquierda, dorsal es arriba. Barra de referencia 25 μ m.

Para estudiar la migración de los hemocitos embrionarios hemos usado un anticuerpo específico para estas células, que reconoce un receptor de la vía fagocítica llamado Croquemort (Crq). Estos estudios los hemos realizado con el alelo *Gai*^{Δ3} en los estadios embrionarios 14-15, en los que los hemocitos se encuentran en plena migración a lo largo de la cuerda ventral, depositando componentes de la matriz extracelular (Wood y cols., 2006). Como podemos comprobar en la figura 21, se observa señal del anticuerpo anti-Crq a lo largo de la cuerda nerviosa tanto en los individuos silvestres como en los mutantes *Gai*⁻, lo que indica que su migración no está interrumpida en los mutantes. Por lo tanto, podemos concluir que la falta de migración de los hemocitos no es el motivo de la falta de condensación del ganglio ventral, ya que los hemocitos sí viajan a lo largo de la cuerda nerviosa embrionaria.

Tanto el patrón neuronal como el neuropilo están levemente desorganizados en los mutantes *Gai*⁻

Trabajos anteriores estudiaron el efecto de la desestabilización del citoesqueleto neuronal sobre el proceso de condensación del ganglio ventral. Para ello, bloquearon la función de Rac1 (proteína imprescindible para la organización del citoesqueleto) expresando formas negativas de Rac1 mediante el sistema Gal4-UAS con elav-Gal4, desorganizando por tanto el patrón neuronal y el neuropilo (por una incorrecta migración por parte de las neuronas y sus procesos). Como consecuencia se inhibía la condensación del ganglio, siendo el ganglio ventral embrionario un 7.4% más largo que el silvestre (Olofsson and Page, 2005).

El grupo de William Chia había visto la implicación de *Gai* en la división asimétrica de neuroblastos (Yu y cols., 2003) y nosotros hemos descrito la expresión de *Gai* en neuronas, lo que sugería posibles defectos neuronales en los mutantes *Gai*⁻. Por todo ello estudiamos en los mutantes *Gai*⁻ el patrón neuronal, así como la fasciculación del neuropilo. El estudio embrionario, a menos que se indique lo contrario, lo hemos realizado en embriones del estadio 16 con el alelo *Gai*^{Δ3}, porque es un estadio en el que el grado de diferenciación es muy avanzado, se pueden observar anomalías acontecidas a lo largo de la diferenciación y el desarrollo y además está muy bien caracterizado en la bibliografía.

Estudio de la red neuronal

Para estudiar el número, la morfología y la disposición de las neuronas hemos usado el anticuerpo anti-Elav, que reconoce la proteína pan-neural Elav. En una vista ventral de embriones teñidos con este anticuerpo se observa el ganglio ventral con toda claridad gracias a que las neuronas son, con mucho, las células mayoritarias de esta estructura. Una gruesa capa de neuronas forma el cortex de la cuerda nerviosa ventral, en el que todavía se pueden distinguir a lo largo del eje antero-posterior los distintos neurómeros (división segmental del sistema nervioso) que componen la cuerda nerviosa (figura 22). El perímetro del cortex rodea al neuropilo, formado por dos conectivos longitudinales que recorren el embrión en dirección anteroposterior.

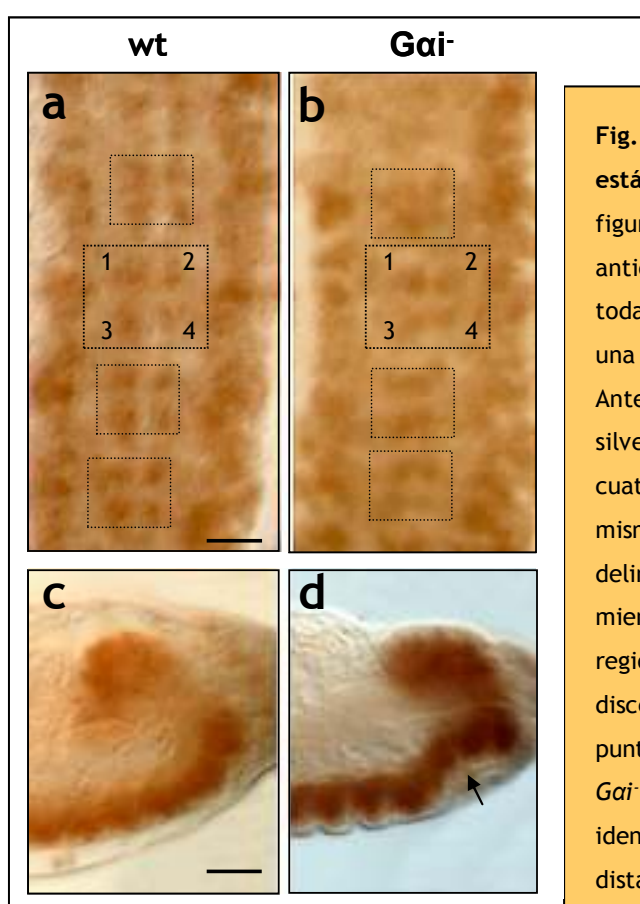


Fig. 22. En los mutantes *Gai*⁻, el patrón neuronal está levemente desorganizado. En todas las figuras, las muestras están teñidas con el anticuerpo anti-Elav, que marca los núcleos de todas las neuronas. En a) y b) podemos observar una vista ventral de embriones del estadio 16. Anterior está arriba. En a) observamos al individuo silvestre, en donde el área recuadrada muestra cuatro grupos de neuronas pertenecientes a un mismo neurómero; el conjunto 1 y 2 nos ayuda a delimitar la región anterior del neurómero mientras que el conjunto 3 y 4 nos delimitan la región posterior. Las 4 células son perfectamente discernibles en todos los neuroméros (recuadros punteados). En b) tenemos un individuo mutante *Gai*⁻, donde los neurómeros son más difíciles de identificar que en los individuos silvestres, y la distancia que los separa no es siempre constante como ocurre en los embriones silvestres (Barra de referencia 50 μm). En c) y d) se muestran vistas laterales de embriones del estadio 16. Anterior está a la derecha. c) es silvestre y d) es mutante *Gai*⁻. Podemos observar en el mutante la existencia de un pliegue ectópico en los primeros segmentos torácicos (flecha negra)(barra de referencia 25 μm).

Estos dos conectivos de neuropilo son fácilmente localizados gracias a la ausencia de señal nuclear anti-Elav, se disponen a ambos lados de unas columnas de neuronas, que en posición medial recorren el embrión a lo largo del eje antero-posterior (figura 22). En los embriones mutantes, los neurómeros del cortex son más difíciles de identificar que en los individuos silvestres, y la distancia que los separa no es siempre constante como ocurre en los embriones silvestres (figura 22). En los individuos mutantes *Gai⁻*, tanto la separación como el grosor de estos neurómeros es irregular. Este fenotipo aparece en el 83.3% (n=12 embriones del estadio 16).

El estudio de la vista lateral de los mutantes nos muestra la existencia de un pliegue ectópico en los primeros segmentos torácicos (flecha negra de de la figura 22c y d). La penetrancia y expresividad de este fenotipo es muy alta (93.7% de los 32 embriones estudiados), se inicia en el estadio 12 y se mantiene durante toda la vida embrionaria.

A nivel embrionario, de este estudio concluimos que existe una ligera desorganización del patrón neuronal en los mutantes *Gai⁻*.

Estudio del neuropilo

Para estudiar el neuropilo que acompaña la red neuronal estudiada con Elav, ver si presenta alguna anomalía en su estructura y para conocer el estado de la fasciculación axonal en los mutantes *Gai⁻* hemos utilizado los anticuerpos BP102 y anti-Fasll.

El anticuerpo BP102 nos permite visualizar el neuropilo entero. Como podemos ver en la figura 23, el andamio axonal del ganglio ventral embrionario silvestre consta de dos pares de conectivos longitudinales, y cada neurómero consta de una comisura anterior y una comisura posterior. En los mutantes *Gai⁻*, como se muestra en la figura 23c y d, los conectivos longitudinales muestran discontinuidades entre distintos neurómeros (cabeza de flecha). La distancia entre la comisura anterior y posterior no es constante, y en algunos casos prácticamente se llegan a juntar (flecha negra). Estos fenotipos aparecen en el 90% de los embriones mutantes (n=10 embriones del estadio 16).

El anticuerpo anti-Fasciclina II reconoce una glicoproteína que se expresa en tres fascículos axonales pertenecientes a los conectivos longitudinales. Tal y como podemos ver en la figura 23a y b, los fascículos longitudinales de los mutantes *Gai⁻* no siguen trayectorias rectas en la dirección anterior-posterior (como ocurre en

silvestre), sino que su camino muestra irregularidades (flechas negras). Además, en ocasiones se producen interrupciones en el trayecto de alguno de los fascículos axonales (flecha azul). Por otro lado, los axones motores que salen del ganglio ventral hacia los músculos del embrión tienen un grosor mayor que los silvestres y tienen alterado el patrón de ramificación (flechas rojas de la figura 23b).

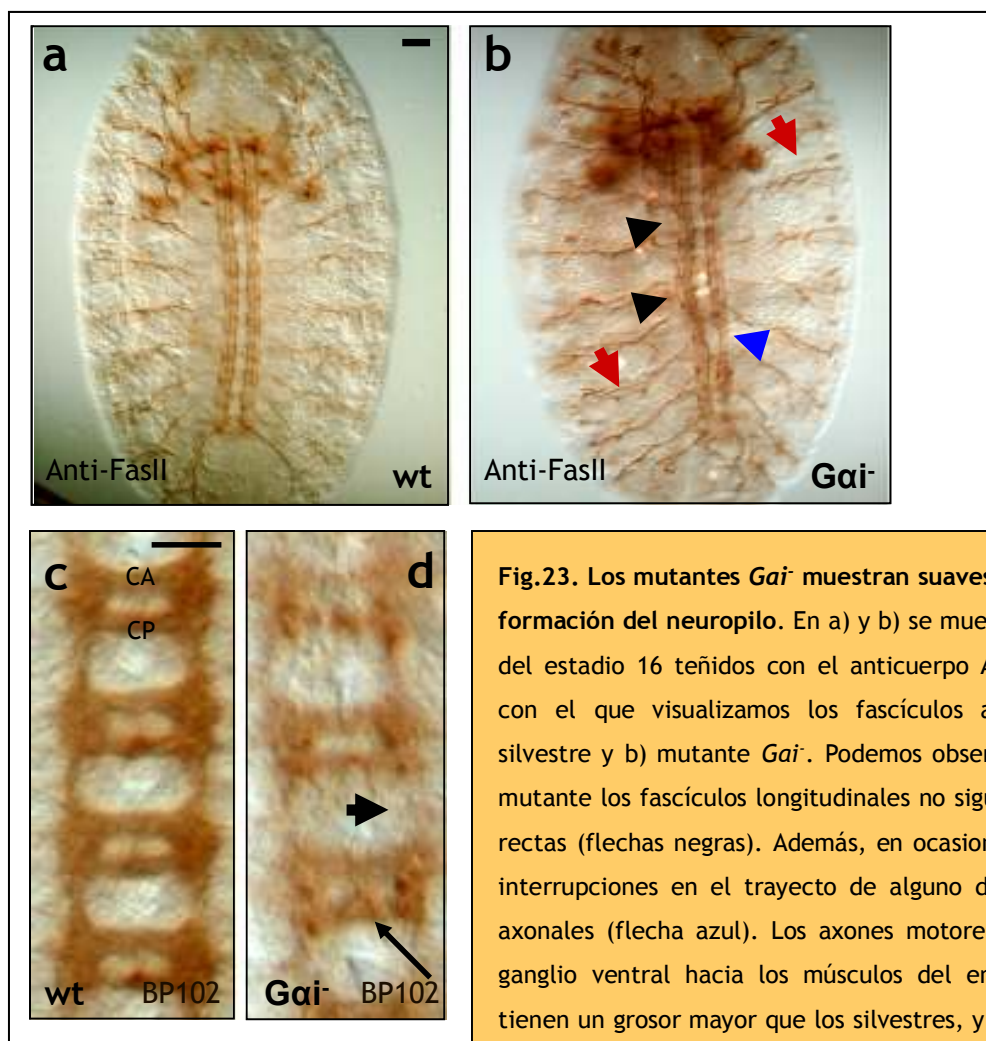


Fig.23. Los mutantes *Gai*⁻ muestran suaves defectos en la formación del neuropilo. En a) y b) se muestran embriones del estadio 16 teñidos con el anticuerpo Anti-Fasciclinall, con el que visualizamos los fascículos axonales. a) es silvestre y b) mutante *Gai*⁻. Podemos observar como en el mutante los fascículos longitudinales no siguen trayectorias rectas (flechas negras). Además, en ocasiones se producen interrupciones en el trayecto de alguno de los fascículos axonales (flecha azul). Los axones motores que salen del ganglio ventral hacia los músculos del embrión mutante tienen un grosor mayor que los silvestres, y tienen alterado el patrón de ramificación (flechas rojas)(barra de referencia 20 μ m). c) y d) muestran embriones del estadio 15 teñidos con el anticuerpo BP102, que nos permite visualizar todo el neuropilo. c) es silvestre y d) es mutante *Gai*⁻. En el mutante podemos observar como los conectivos longitudinales muestran discontinuidades (cabeza de flecha) y la distancia entre la comisura anterior y posterior (CA y CP respectivamente) no es constante, y en algunos casos prácticamente se llegan a juntar (flecha negra).(barra de referencia 10 μ m). En todas las imágenes anterior es arriba.

Podemos inferir a través de estos defectos en el patrón axonal, que los mutantes *Gai* presentan defectos leves de fasciculación axonal.

Estos pequeños defectos tanto del patrón neuronal como en el neuropilo podrían contribuir, aunque no parecen ser los responsables últimos, a la falta de condensación del ganglio ventral de los mutantes *Gai*. Podemos deducir esto en base a los resultados obtenidos por el grupo de Olofsson, en los que tras la desestabilización del neurocitoesqueleto que desorganiza por completo tanto el patrón neuronal como el neuropilo, observaban que el ganglio ventral no es más que un 7.4% más largo que el silvestre (Olofsson and Page, 2005). Sin embargo en los mutantes *Gai* (en los cuales la desorganización es leve) el ganglio ventral es un 11.5% más largo que el silvestre, luego no es ésta la principal causa de la falta de condensación del ganglio ventral.

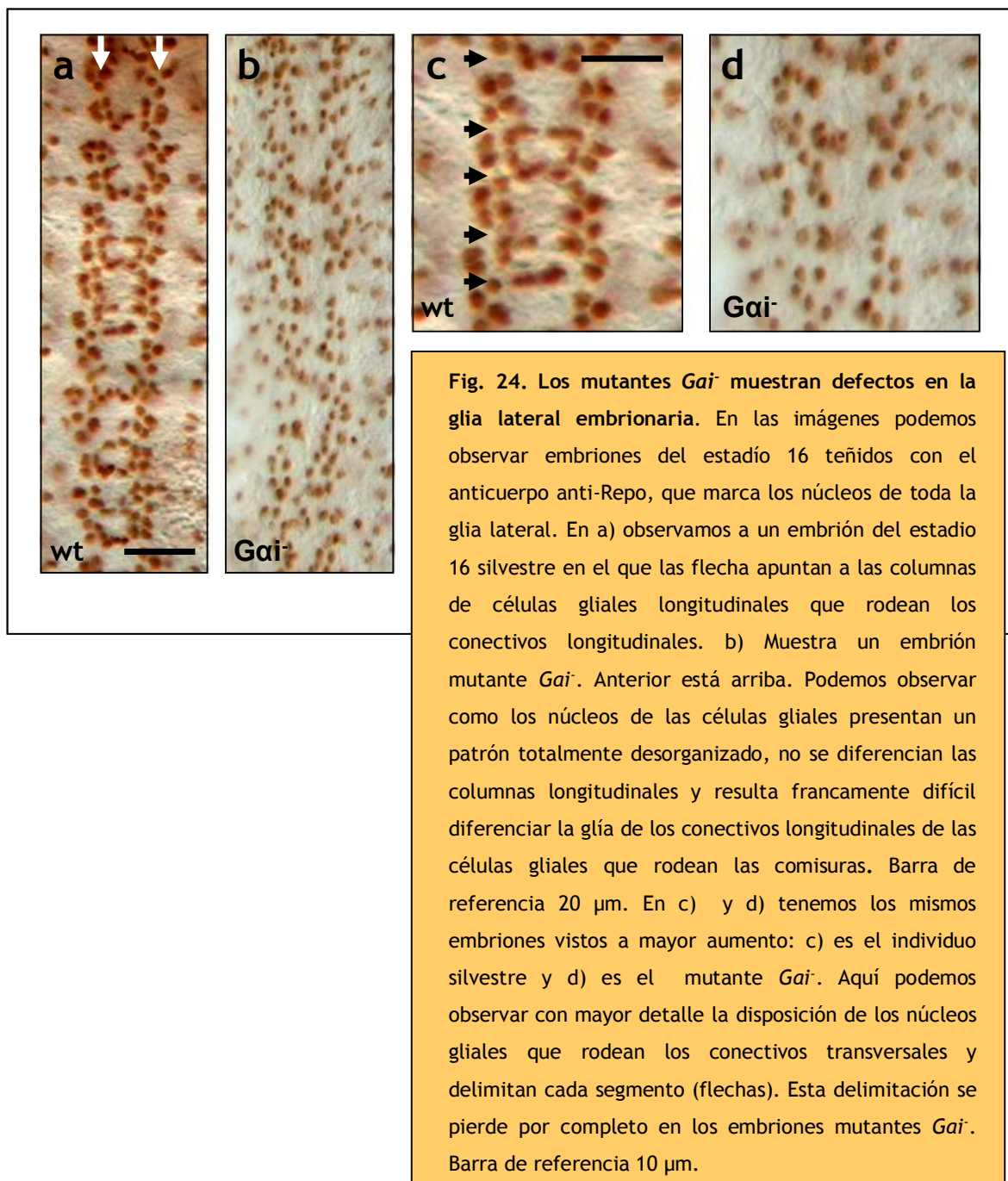
Los mutantes *Gai* presentan problemas en el desarrollo y diferenciación de la glia lateral que podrían contribuir a la falta de condensación del ganglio ventral.

Los estudios de Pipa (Pipa, 1973) postulaban que la glia podría ejercer una fuerza para condensar el SNC. Esta hipótesis ha sido respaldada por la existencia de algunos mutantes gliales que presentan fenotipo de falta de condensación. Olofsson y cols (Olofsson and Page, 2005) realizaron experimentos en los que, al desorganizar el citoesqueleto glial (expresando Rac1 en glia mediante *repo-Gal4*), se impedía la migración de las células gliales y se producía un anormal ensamblamiento entre la glia y los axones, lo que derivaba en un fenotipo de falta de condensación, incrementando la longitud del ganglio embrionario en un 14.1% respecto a su versión silvestre. Además, nosotros habíamos visto expresión de *Gai* en células gliales (ver patrón de expresión en el sistema nervioso). Es decir, teníamos poderosas razones para analizar en profundidad el estado de la glia en los mutantes *Gai*.

La glia ha sido visualizada con el anticuerpo que reconoce la proteína Repo (ver materiales y métodos) que se expresa en todas las células de la glia lateral (el subtipo glial mayoritario).

a) **Estado embrionario:** La glia embrionaria está muy bien estudiada y caracterizada (ver introducción). Según los marcadores moleculares, se pueden distinguir dos tipos de glia: la glia lateral y la glia de la línea media (ver figura 5 en introducción). Hasta donde se sabe, *Gai* no se expresa en las células de la glia media, y además tampoco se ha relacionado a esta glia con el proceso de la condensación del

SNC. La glia lateral está compuesta por un grupo heterogéneo de células (ver figura 5 en introducción), pero todas ellas expresan la proteína Repo. La glia lateral se ha relacionado con problemas en la condensación del ganglio ventral, y por ello la hemos estudiado con especial interés en los mutantes *Gai*⁻.



La glia lateral embrionaria silvestre dibuja una escalera en el eje antero-posterior, donde cada brazo de la escalera está formado por dos columnas de células de glia longitudinal (flechas en figura 24), que rodean los conectivos nerviosos longitudinales,

y los peldaños corresponden a un grupo heterogéneo de glia que rodea a los axones que componen la comisura anterior y posterior de cada neurómero (figura 24). Podemos observar que este patrón descrito para los embriones silvestres no se reproduce en los mutantes *Gai*⁻ (figura 24 b y d). En embriones mutantes la glia lateral está totalmente desorganizada, no se discriminan las columnas de células gliales longitudinales, e incluso resulta francamente difícil diferenciar la glia de los conectivos longitudinales de las células gliales que rodean las comisuras. En estos embriones no se pueden delimitar los neurómeros en base al patrón de Repo. Los alelos empleados en estos experimentos han sido *Gai*^{UASΔ4} y *Ga*^{iΔ3}.

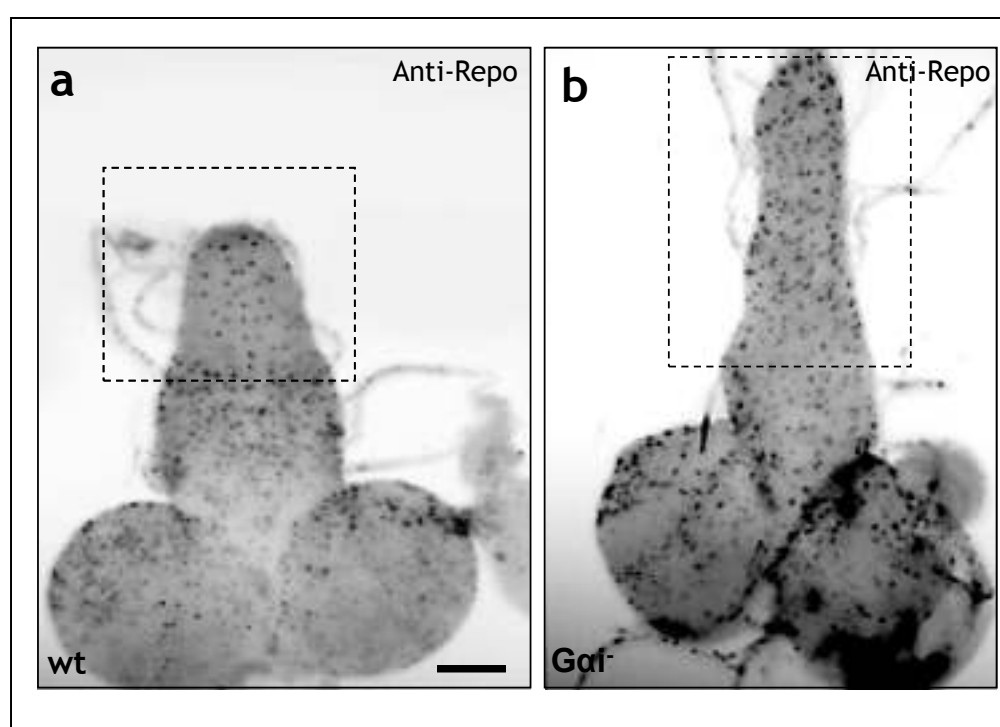


Fig. 25. Los mutantes *Gai*⁻ muestran defectos en la migración de la glia lateral larvaria. En la figura podemos observar el SNC de dos individuos del tercer estadio larvario teñidos con el anticuerpo anti-Repo , que marca toda la glia lateral. Las imágenes son proyecciones de distintos planos focales con el objetivo de visualizar en un mismo plano todas las células larvarias de la glia lateral. Anterior está abajo. En a) observamos el SNC silvestre donde el patrón de expresión de Repo se divide en dos territorios bien delimitados: la región torácica y la región abdominal. En la región torácica se detectan muchas células gliales laterales distribuidas de manera aparentemente aleatoria. En la región abdominal (recuadro), el número de células gliales es ostensiblemente menor, y las células gliales forman columnas en el eje antero-posterior. En b) se muestra el individuo mutante *Gai*⁻, donde se observa que todas las células que expresan Repo se ven dispersas a lo largo del ganglio torácico abdominal, y en ninguno de los planos se ven columnas de células. Barra de referencia 50 μ m.

b) **Estado larvario:** En el ganglio ventral larvario, el patrón de expresión de Repo

se divide en dos territorios bien delimitados: la región torácica y la región abdominal. En la región torácica (figura 25) vemos muchas células expresando Repo; estas células no muestran un patrón ni simétrico ni organizado. En la región abdominal (figura 25a, región recuadrada), el número de células gliales es ostensiblemente menor, y las células gliales forman columnas en el eje antero-posterior. En los mutantes *Gai*⁻ no vemos esta división del patrón de expresión, todas las células que expresan Repo se ven dispersas a lo largo de todo el ganglio, en ninguno de los planos se ven columnas de células. No se aprecian diferencias significativas en el número de células gliales entre individuos silvestres y mutantes cuando estudiamos el ganglio en su totalidad ($t_{12}=-12.124$; $p<<0.001$). Sin embargo, mientras que la región abdominal de los silvestres el número de células gliales totales es bajo (58,05; n=6), este número aumenta (100,6; n=6) en el ganglio abdominal mutante, a expensas de disminuir el número de células en la región torácica. Estos datos sugieren defectos en la migración de la glia lateral en mutantes *Gai*⁻.

Concluyendo, los defectos severos en el desarrollo y diferenciación de la glia lateral sí podrían ser los responsables de los problemas de condensación que padecen en los mutantes *Gai*⁻ (ver discusión).

Los mutantes *Gai*⁻ muestran defectos en el patrón de expresión de neuropéptidos

Como hemos comentado en la introducción, se ha descrito la implicación de *Gai* en procesos neuroendocrinos (Dhanasekaran N. et al, 1998). Tanto los estudios en *Manduca sexta* como los nuestros demuestran la naturaleza neurosecretora de algunas de las neuronas que expresan *Gai* (ver patrón de expresión larvario). Por ello, estudiamos la expresión de dos neuropéptidos en los mutantes *Gai*⁻: FMRFamida y Leucoquinina, dos neuropéptidos presentes en células que expresan *Gai*. Los alelos empleados en este estudio han sido *Gai*^{UASA4} y *Gai*^{Δ3}.

Defectos en la expresión de la FMRFamida

Como ya hemos comentado en el patrón de expresión, habíamos visto expresión de *Gai* en células que expresan el neuropéptido FMRFamida. La expresión de la FMRFamida en el ganglio ventral, neuropéptido implicado en la motilidad de los músculos viscerales (Nichols, 2006), se restringe a una célula ventral en cada uno de los tres hemisegmentos torácicos, que recibe el nombre de célula Tv (por su

localización torácica y ventral) (figura 26a). Para conocer el patrón de expresión de la FMRFamida en los mutantes *Gai⁻*, utilizamos un anticuerpo que reconoce a este neuropéptido (ver materiales y métodos). Los estudios en silvestres muestran que el 77.8% de los individuos silvestres tienen 6 células Tv por ganglio ventral, y el 22.2% tienen 5 células Tv por ganglio ventral (n=18).

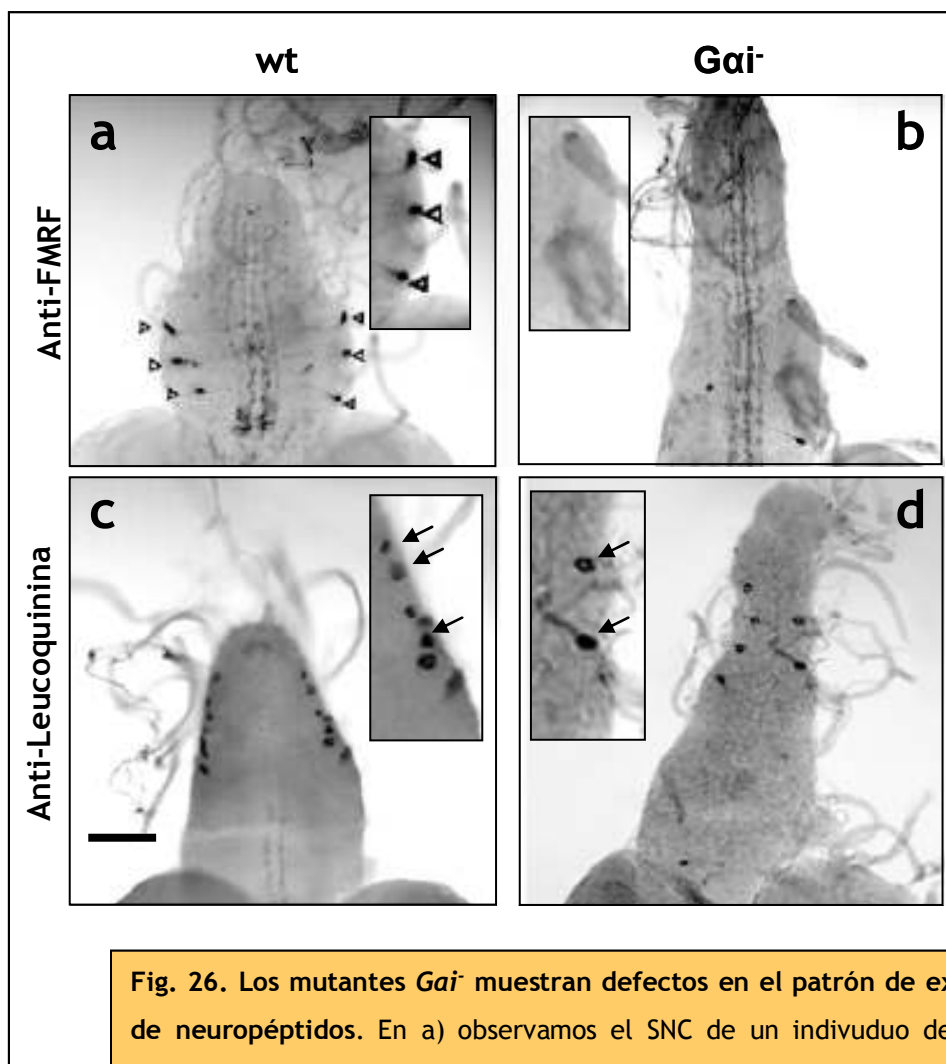


Fig. 26. Los mutantes *Gai⁻* muestran defectos en el patrón de expresión de neuropéptidos. En a) observamos el SNC de un individuo del tercer estadio larvario teñido con un anticuerpo que reconoce al neuropéptido FMRFamida. Las flechas señalan a las células Tv, pudiendo observar una célula por hemisegmento torácico. En b) se muestra el SNC de individuo mutante *Gai⁻*, que en este caso no presenta ninguna célula Tv. En c) podemos observar el SNC de un individuo del tercer estadio larvario teñido con un anticuerpo que reconoce al neuropéptido Leucoquinina, cuya expresión en el ganglio ventral se restringe a una célula en cada uno de los 7 hemisegmentos abdominales más anteriores, denominadas células ABLK (flechas). En d) observamos el SNC de un individuo mutante *Gai⁻*, donde el número de células ABLK está ostensiblemente reducido (flechas). Barra de referencia 50 μm .

Los mutantes *Gai*⁻ muestran defectos en la expresión del neuropéptido FMRFamida en las células Tv, ya que nunca encontramos expresión en las 6 células Tv. En el 80% de los individuos no se observa ninguna célula Tv por ganglio ventral, y en el 20% restante se observa una sola célula Tv por ganglio ventral (n=15). Sin embargo, en los lóbulos cerebrales, el patrón de las células que expresan FMRFamida es igual en larvas mutantes y silvestres (no mostrado).

Defectos en la expresión de la Leucoquinina

También habíamos visto que *Gai* se expresa en neuronas abdominales que expresan el neuropéptido Leucoquinina, péptido implicado en la regulación iónica de los túbulos de malpigio (Chen y cols., 1994). La expresión de este neuropéptido en el ganglio ventral de la larva III se limita a 14 células llamadas ABLK dibujando dos hileras curvas que recorren el tercio inferior del borde del ganglio ventral (figura 26c). En las larvas mutantes *Gai*⁻ el número de esas células ventrales está muy reducido, en ninguno de los casos superan las 10 células (n=7 ganglios). Sin embargo no hemos observado en ningún caso la ausencia total de células leucoquininérgicas. En todos los ganglios estudiados, los segmentos abdominales posteriores eran los que más sufrían la ausencia de las células leucoquininérgicas. Podemos concluir que la diferencia en el número de células que expresan Leucoquinina en ganglios abdominales silvestres y mutantes es significativa ($t_{14}=-10.423; p<<0.001$). La expresión de Leucoquinina en los lóbulos cerebrales se restringe a una célula por lóbulo (llamadas LHKL), que nunca está ausente en los mutantes *Gai*⁻ (no mostrado).

Cabe destacar que con ambos neuropéptidos hemos visto expresión de *Gai* en las mismas células en las que vemos los defectos de expresión. Esto podría ser compatible con un efecto autónomo celular, es decir, que de algún modo *Gai* esté regulando la expresión de estos neuropéptidos. Lo que si que podemos asegurar es que los mutantes *Gai*⁻ tienen defectos en el patrón de expresión de los neuropéptidos FMRFamida y Leucoquinina.

Sobre-expresión y expresión ectópica de transgenes bajo *Gai-Gal4*

Al modificar la expresión y/o las propiedades de una subunidad de una proteína G, no solo se estudia el efecto que produce esta modificación. Debido al mecanismo

por el que actúan las proteínas G (ver introducción), casi siempre al alterar la expresión de una de ellas, o al modificar sus propiedades de unión a las otras subunidades, y/o al ligando, y/o al receptor, y/o sitio de unión a los guanilnucleótidos, se están produciendo efectos colaterales al interferir en el mecanismo de acción de las otras subunidades, incluso modificando la expresión de estas por mecanismos aún desconocidos (Schaefer y cols., 2001). Por tanto, la interpretación de estos experimentos puede llegar a ser muy compleja.

La sobre-expresión de la proteína Gai silvestre no produce defectos fenotípicos aparentes.

Como ya hemos comentado anteriormente, el cambio del elemento P del tipo UAS por uno del tipo Gal4 se realizó principalmente para poder expresar una batería de genes unidos a las secuencias UAS en el dominio de expresión de *Gai-Gal4* (sistema Gal4-UAS, ver materiales y métodos). Entre los genes que queríamos expresar de esta manera se encontraba el que codificaba para la proteína Gai silvestre. De esta manera se puede estudiar las consecuencias funcionales de la sobre-expresión de esta proteína, en las mismas células donde de forma natural se expresa. Teníamos a nuestra disposición dos líneas transgénicas en las que estaba insertado el ADNc que codifica para la proteína Gai detrás de la secuencias UAS (UAS-Gai). A pesar de que las construcciones transgénicas son idénticas, la ubicación citogenética no era la misma, una estaba insertada en el segundo cromosoma y la otra en el tercero. La distinta ubicación citogenética de ambas formas puede implicar que tengan distintos niveles de expresión a pesar de estar bajo el mismo activador transcripcional (por ejemplo por efectos de posición).

La expresión mediante *Gai-Gal4* de la forma UAS-Gai localizada en el cromosoma II (UAS-Gai II) produce una viabilidad del 96% de los esperados (siendo los esperados el 50% de los nacidos; número de moscas nacidas:155) en los individuos que la portan. Cuando expresamos la forma ubicada en el tercer cromosoma (UAS-Gai III) utilizando *Gai-Gal4*, la viabilidad es también del 96% de los esperados (siendo los esperados el 50% de los nacidos; número de moscas nacidas:133).

En ambos casos los individuos que salen son a su vez viables, fértiles y tienen el ganglio ventral perfectamente normal. Es decir, la sobre-expresión de la proteína Gai no parece producir defectos fenotípicos aparentes.

La expresión de formas constitutivamente activas de la proteína Gai produce letalidad al expresarse bajo el *Gai-Gal4*.

También utilizando el sistema Gal4-UAS expresamos formas constitutivamente activas de la proteína Gai bajo el activador transcripcional *Gai-Gal4*. En las formas constitutivamente activas de la proteína Gai se encuentra mutado el dominio GTPasa, de modo que siempre se encuentran unidas a GTP y por tanto se encuentran activas en todo momento (ver introducción). Contábamos de nuevo con dos líneas transgénicas en las que la construcción UAS estaba situada en el cromosoma dos y en el tres (nombradas constitutiva II y constitutiva III de ahora en adelante). Queríamos saber los efectos que podría causar la activación continuada de Gai en el desarrollo de la mosca, pudiendo de esta manera ampliar información sobre su función biológica. Por tanto hicimos dos experimentos distintos, uno para cada transgen.

La expresión mediante *Gai-Gal4* de la forma constitutiva III reducía la viabilidad de forma drástica; tan solo nacían un 13.6% de los esperados (siendo los esperados el 25% de los nacidos; número de moscas nacidas:206). Los individuos que nacían presentaban además importantes defectos en su maduración, mostraban el fenotipo “infanto-juvenil”, en el que las alas permanecen plegadas, y la cutícula es blanquecina, blanda, sin curtir (falta de maduración). Estos caracteres son típicos de un adulto recién eclosionado (en sus dos o tres primeras horas de vida); sin embargo a estos individuos les acompañaba este aspecto durante su reducida vida (vivían menos de dos días). Está descrito que este fenotipo está relacionado con defectos en tráfico vesicular (Torroja et al, 1999), y señalización neuroendocrina (McNabb y cols., 1997).

Con la expresión mediante *Gai-Gal4* de la forma constitutiva II la letalidad es total (0% de los esperados, siendo los esperados el 25% de la progenie, n=). Lo que sí hemos podido observar es la extraña morfología alargada y retorcida que presentaban algunas larvas. Este último experimento también lo hemos realizado a 20°C, de modo que la expresión de la forma constitutiva es más baja, y así hemos podido observar el efecto en dosis menores, con lo que se deberían de reducir los efectos deletéreos de su expresión. Sin embargo los resultados no fueron distintos a los obtenidos a 25°C. En todos los casos el ganglio ventral larvario presentaba una morfología completamente normal.

Este experimento se completó con la expresión de las formas constitutivamente activas utilizando otras líneas Gal4. Una de estas líneas se expresa en neuronas Tv FMRFamidérgicas (*P224-Gal4*), otra en las dos neuronas que producen la hormona de la eclosión (*C21-Gal4*), y la última es un fragmento de la región reguladora del gen *apterous* (*Vga-Gal4*) que se expresa en tres neuronas torácicas y ventrales situadas muy próximas a las células Tv FMRFamidérgicas.

Tan solo obtuvimos letalidad al expresar las formas constitutivamente activas de la proteína Gai con la línea Gal4 que se expresa en las células Tv FMRFamidérgicas. Con la construcción del cromosoma III (la menos letal en los experimentos anteriores) nacen el 67.60% de los esperados, siendo los esperados el 25% de la descendencia total (descendencia estudiada:261). Con la construcción del cromosoma II (la más letal en los experimentos anteriores) nacen el 12.74% de los esperados, siendo los esperados el 50% de la descendencia total (descendencia estudiada:149). Estos individuos también presentan fenotipo infante-juvenil.

La expresión de las mismas formas constitutivamente activas en las células adyacentes a las células Tv, o con la línea *c21-Gal4*, no provoca letalidad, lo que indica que estas formas no provocan letalidad al expresarse en cualquier ambiente. Por tanto, podemos concluir que la expresión de formas constitutivamente activas de la proteína Gai puede afectar al desarrollo y/o fisiología según el entorno en el que se exprese.

Experimentos de rescate

Para entender mejor el efecto materno que presenta tanto el ARNm como la proteína Gai, hicimos experimentos de genética clásica estudiando los individuos descendientes de parentales con distintas combinaciones genotípicas: el padre homocigótico para la mutación Gai y la madre heterocigótica, viceversa, los dos parentales homocigóticos y los dos heterocigóticos. El estudio de la descendencia se basó en el estudio de la viabilidad, morfología del ganglio ventral y en el patrón de expresión de la FMRFamida, dado que estos son tres de los fenotipos que mejor caracterizan a estos mutantes. De este modo concluimos que tan solo los individuos homocigóticos de madres homocigóticas (independientemente de que el padre sea homocigótico o heterocigótico) poseen una viabilidad reducida, el ganglio ventral elongado y muestran defectos de expresión en el neuropéptido FMRFamida.

Además, cabe destacar que los individuos heterocigóticos provenientes de madres homocigóticas y padres heterocigóticos, cuyo único aporte de *Gai* es a través de la expresión cigótica aportada por el padre, poseen el ganglio ventral y el patrón de FMRFamida propios de un individuo silvestre. Esto indica, que la copia del gen aportada por el cromosoma del padre (que ha de tener expresión cigótica) es suficiente para que el desarrollo de los individuos sea el correcto.

Llegados a este punto, nos planteamos dos experimentos de rescate, en los que mediante transgenes del tipo Gal4 y UAS-*Gai* expresamos *Gai* en distintos fondos genéticos.

La expresión de *Gai* mediante la línea de expresión cigótica *Gai-Gal4* no rescata el fenotipo en individuos carentes de los productos maternos y cigóticos de *Gai*.

Nos preguntamos si podríamos rescatar la viabilidad de individuos mutantes homocigóticos para el gen *Gai* (procedentes de madres homocigóticas y padres heterocigóticos), expresando en estos individuos, a través del activador transcripcional *Gai-Gal4*, la proteína silvestre *Gai*. Este experimento sería una situación parecida a la de estudiar individuos heterocigóticos nacidos de madres homocigóticas, donde la copia del gen para *Gai* viene aportada por el padre.

El cruce lo diseñamos con marcadores larvarios y puparios para poder seguir el desarrollo larvario-pupario de estos individuos, y consistió en cruzar machos y $w;Gai^{P(w+)Gal4\Delta4}/Gai^{\Delta3}$ con hembras $w;UAS-Gai\ Gai^{\Delta3}/TM3, Sb$, y estudiar la descendencia de genotipo y $w/w;Gai^{P(w+)Gal4\Delta4}/UAS-Gai\ Gai^{\Delta3}$. En estos experimentos utilizamos el alelo $Gai^{P(w+)Gal4\Delta4}$, que además de ser mutante para *Gai*, dirige la expresión de Gal4 en el dominio de expresión de *Gai*.

Sin embargo no eclosiona ningún individuo con el genotipo en el que supuestamente se tendría que haber producido el rescate (que poseen a la vez *Gai-Gal4* y *UAS-Gai*) (0% eclosionados de los esperados, siendo los esperados el 25% de la progenie, n=289). Un pequeño porcentaje llegaba a larva III, y de ellos todos presentaban el ganglio ventral elongado (n=20).

Probablemente, con *Gai-Gal4/UAS-Gai* no conseguimos rescatar la viabilidad ni el fenotipo de ganglio elongado porque quizás a estos individuos la expresión de proteína *Gai* cigótica ocurre tardíamente (postembrionaria), cuando la falta de aporte materno ya ha ocasionado importantes defectos en el desarrollo. Sin embargo, hemos visto que la proteína cigótica paterna si consigue paliar de alguna forma la ausencia

de proteína materna. Puede que el patrón temporal de *Gai-Gal4* no reproduzca fidedignamente el patrón espacio-temporal real del gen *Gai*, y comience a expresarse más tarde. También podría ocurrir que las dosis a las que se expresa *Gai* mediante el sistema Gal4/UAS sean diferentes de las necesarias para un correcto desarrollo.

En resumen, la expresión cigótica de *Gai* mediante *Gai-Gal4* no es capaz de rescatar el fenotipo en individuos *Gai⁻* hijos de madres mutantes *Gai⁻* (y por tanto sin producto materno).

La expresión de *Gai* mediante *Gai-Gal4* en una madre mutante para *Gai* no rescata el fenotipo en su descendencia homocigótica para la mutación.

En este experimento la madre es homocigótica para la mutación, pero expresa *Gai* a través del *Gai-Gal4:UAS-Gai*, de modo que presumiblemente debería aportar al hijo (que es homocigótico para la mutación) ARNm y proteína necesaria para el correcto desarrollo. El cruce que se realizó para este experimento de rescate consistió en cruzar hembras y $w;Gai^{P(w+)Gal4\Delta\Delta}/UAS-Gai\ Gai^{\Delta3}$ con machos $w;Gai^{\Delta3}/TM3, Sb$, y estudiar la descendencia de genotipo $w;Gai^{\Delta3}/UAS-Gai\ Gai^{\Delta3}$.

Sin embargo, tampoco de esta manera eclosiona ningún individuo homocigótico para la mutación en *Gai* (0% de los esperados, siendo los esperados el 50% de la progenie total, n=232).

Podría ocurrir que *Gai-Gal4*, al no expresarse en las células nodriza (ver patrón de expresión en adultos), no pudiese aportar al oocito el ARNm y la proteína necesaria para rescatar el fenotipo. Recordemos, que el grupo de Wolfgang sí ha visto expresión de ARNm de *Gai* en las células nodriza (Wolfgang y cols., 1991).

Por tanto, la expresión en la madre de *Gai* mediante *Gai-Gal4* no es suficiente para rescatar el fenotipo de hijos homocigóticos para la mutación del gen *Gai*.

Discusión

Al inicio de esta tesis doctoral no se conocía ninguna función asociada a la proteína codificada por el gen *Gai* de *Drosophila*, y de hecho no existía ningún mutante para este gen. Aunque posteriormente han aparecido publicaciones en las que se han descubierto implicaciones concretas de esta subunidad *Gai*, tanto en la fisiología como en el desarrollo de este organismo, los procesos en los que *Gai* es el componente de señalización esencial en el desarrollo y fisiología de *Drosophila*, han permanecido ignotos hasta ahora.

En el transcurso de este trabajo hemos analizado minuciosamente la función del gen *Gai* en el desarrollo y fisiología de *Drosophila melanogaster*, y nos hemos centrado especialmente en el sistema nervioso. En esta tesis doctoral hemos detallado el patrón de expresión espacio-temporal del gen que codifica la proteína *Gai*, identificando, en la mayoría de los casos, la naturaleza de las células que lo expresan. A su vez hemos analizado y caracterizado el fenotipo de mutantes generados en nuestro laboratorio de falta de función para el gen *Gai* en *Drosophila*, y este análisis lo hemos realizado a lo largo de todo desarrollo de *Drosophila*, incidiendo de forma especial en el sistema nervioso.

Para completar estos estudios, y entender de una forma holística el papel de *Gai*, hemos analizado las consecuencias en el desarrollo y fisiología que tienen en este insecto la sobre-expresión de formas silvestres de la proteína *Gai*, así como la expresión de formas constitutivamente activas de la misma. De esta manera, hemos obtenido interesantes resultados, que ayudan a comprender la importancia que tiene esta proteína en la biología de este invertebrado. Dado el alto grado de conservación que muestran estas proteínas en estructura y en la mayoría de las funciones caracterizadas hasta ahora, pensamos que nuestros resultados serán válidos, en gran medida, para entender el papel de *Gai* en la biología de los distintos organismos que componen la escala filogenética.

La expresión de *Gai* sugiere su implicación en procesos biológicos muy diversos

Gai está presente a lo largo de, prácticamente, todo el desarrollo de *Drosophila* y es expresada en diferentes tejidos. Esta expresión ubicua está hablando de la importancia que tiene esta proteína en la fisiología y desarrollo de este organismo, y en la diversidad de procesos en los que participa, en los que estaría trabajando con

distintos receptores, distintas dianas e incluso señalizando a través de distintos mecanismos, tales como la activación independiente de receptor que experimenta Gai en la división asimétrica de neuroblastos (Takesono y cols., 1999; Natochin y cols., 2000; Schaefer y cols., 2001). Por tanto, la señalización por parte de la subunidad Gai es muy utilizada durante el ciclo vital en distintos órganos y tejidos, y su modo de acción parece que varía según el contexto donde la estudiemos.

La temprana expresión que presenta Gai, la falta de fenotipos acusados en los mutantes de primera generación, así como los resultados de nuestros experimentos de genética clásica no dejan ninguna duda acerca del fuerte componente materno que presenta este gen, ratificando de esta manera lo ya recogido en la literatura (Provost y cols., 1988; Wolfgang y cols., 1990). Este componente materno podría explicar porque mediante genes marcadores expresados bajo el gobierno de *Gai-Gal4* (línea que recoge la expresión cigótica del gen) no se observa señal alguna en estadios tempranos, en los que el producto materno podría ser la única fuente de este gen.

El patrón de expresión que observamos mediante genes marcadores expresados con *Gai-Gal4* coincide, en líneas generales, con lo descrito anteriormente en *Drosophila*. En esta tesis hemos profundizado más en dicho patrón, identificando en la medida de lo posible la naturaleza de las células que expresan Gai. El hecho de que nosotros no observemos expresión en alguna estructura donde otros grupos describen presencia de proteína Gai, como el cardioblasto, la glándula protorácica o células nodriza del ovario (Wolfgang y cols., 1990; Wolfgang y cols., 1991), puede deberse a que la línea *Gai-Gal4* no recoja de forma íntegra el patrón espacio-temporal del gen que codifica para Gai, circunstancia común en muchas líneas Gal4 (<http://www.flybase.net>). Es importante recalcar que nosotros hemos estudiado el patrón de expresión de Gai a través de la línea *Gai-Gal4*, que como hemos detallado en los resultados, está construida sobre una deficiencia dentro del exón 1, y, aunque no es común que haya zonas activadoras dentro de los intrones o exones, no podemos descartar esta posibilidad, circunstancia que explicaría también la discordancia de expresión entre la señal que nosotros hemos observado mediante el sistema Gal4-UAS y la observada por los otros grupos mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridaciones *in situ*.

Es interesante señalar que la expresión que observamos coincide en gran medida con la publicada en *Manduca sexta* (Copenhaver y cols., 1995), lo que sugiere que su expresión, y por ende su función, parece estar conservada al menos en invertebrados. Como ya hemos visto, existe un alto grado de conservación a nivel de

secuencias en los genes que codifican para las proteínas G a lo largo de la escala filogenética, y los experimentos están constatando, poco a poco, que también la función parece estar muy conservada en las distintas especies donde se estudia (Morris y Malbon, 1999; Alberts y cols., 2002; Wettschureck y Offermanns, 2005). Como ejemplo tenemos que tanto los mecanismos que generan división asimétrica, como la implicación que en ella tienen las proteínas G, están altamente conservados en animales tan dispares como el gusano *C.elegans*, la mosca *Drosophila* e incluso en mamíferos como el ratón (Knoblich, 2001).

En el sistema nervioso, *Gai* se expresa predominantemente en la glia lateral, y en algunas neuronas, algunas de ellas identificadas como neurosecretoras. Estos datos sugieren la implicación de *Gai* en el desarrollo/fisiología de la glia, así como en procesos neuroendocrinos. Nuestros experimentos indican que, efectivamente, *Gai* está implicada en estos dos procesos. A continuación se discuten las posibles implicaciones funcionales de la proteína *Gai* derivadas de los experimentos realizados durante esta tesis doctoral.

***Gai* se requiere para el desarrollo tardío y diferenciación de la glia lateral**

Como ya hemos visto, los estudios del patrón de expresión revelan una predominancia de señal en el SNC. Análisis más detallados utilizando marcadores específicos de la glia lateral demuestran que el 85% de las células que expresan *Gai* colocalizan con el marcador de la glia lateral Repo. Estos datos sugieren una implicación por parte de *Gai* en el desarrollo y/o fisiología de la glia de *Drosophila*. De hecho, publicaciones muy recientes así lo constatan, identificando a *Gai* como un componente necesario para la formación y estabilización de la barrera hematoencefálica (formada por la glia de superficie), y por tanto también necesario para el correcto funcionamiento fisiológico de esta estructura glial (Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005). Nuestros datos recogidos en los análisis de mutantes de falta de función para *Gai* apoyan un papel más general que la implicación de *Gai* en la barrera hematoencefálica. El análisis de nuestros resultados sugiere que *Gai* está también implicada en el desarrollo tardío de toda la glia lateral, no solo de la glia de superficie, teniendo un papel de alto protagonismo en la diferenciación final y migración de estas células.

La falta de Gai genera defectos en la posición (migración) de la glia lateral

Los mutantes de falta de función de *Gai* (*Gai^{-/-}*), donde no hay expresión ni cigótica ni materna, muestran un claro fenotipo en la glia lateral. Sin embargo, las células gliales llegan a adquirir correctamente su identidad glial, ya que no cambia el número de células que expresan tanto Repo como *gcm*. A diferencia de lo que ocurre, por ejemplo, en mutantes para el gen *gcm*, donde las células que deberían poseer destino glial adoptan destino neuronal, y por tanto expresan marcadores neuronales, la falta de función de *Gai* no impide que las células adquieran identidad glial. Esto sugiere que la subunidad Gai no es necesaria para el proceso inicial de determinación del destino glial ni para el desarrollo temprano de la glia. Sin embargo, en ausencia de Gai el patrón espacial de las células de la glia no se establece correctamente, lo que sugiere que Gai participa en el desarrollo tardío de la glia, así como en su correcta migración y/o diferenciación.

loco se aisló en una búsqueda de genes críticos para el desarrollo tardío de la glia lateral. La proteína Loco posee un dominio Go-Loco, con actividad GDI, y un dominio RGS, con actividad GAP. Loco se une in vivo a Gao y Gai, pero no a otras subunidades Gα, y está implicado en el desarrollo tardío y diferenciación de la glia lateral, concretamente está muy estudiado su papel en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica.

La similitud de fenotipo glial entre los mutantes en *Gai* y los mutantes *loco* es relativa. En los mutantes de falta de función para el gen *loco* no se observan defectos groseros ni en el número ni en la posición de las células que expresan la proteína marcadora de la glia lateral Repo (Granderath y cols., 1999). Sin embargo, sí observan diferencias respecto al silvestre cuando analizan la glia con la línea lacZ M84, que marca un subtipo de glia lateral y permite un análisis más detallado. De esta manera, se observa que la señal es ligeramente más débil en las células gliales A y B en los mutantes *loco*, y que la posición de los núcleos gliales parece ser más variable que en los individuos silvestres (Granderath y cols., 1999). Se detectan diferencias más aparentes en los mutantes *loco* al realizar estudios de microscopía electrónica, que ponen de manifiesto que las células de la glia lateral no envuelven, y por tanto no aíslan, correctamente a los axones del tracto longitudinal (Granderath y cols., 1999; Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005).

Nosotros, por el contrario, sí observamos diferencias al analizar la expresión del anticuerpo anti-Repo en los mutantes *Gai⁻*, y observamos exactamente las mismas diferencias al analizar la glia con la línea *gcm-lacz*, que expresa la enzima β -galactosidasa en las células que expresan el gen maestro de glia *gcm* (datos no mostrados). En los embriones mutantes *Gai⁻*, los núcleos de las células gliales laterales varían notablemente de posición respecto a los embriones silvestres. De hecho, varían tanto de posición que no se pueden distinguir los subtipos de glia, y por ejemplo, no es posible diferenciar las células A y B de las células de la glia longitudinal. Podemos concluir por tanto que los defectos observados en la glia lateral del neuropilo son más acusados en los mutantes *Gai⁻* que en los mutantes *loco*.

Además de su implicación en el desarrollo de la glia lateral del neuropilo, *loco*, y la señalización mediada por las proteínas G heterotriméricas *Gai* y *Gao*, está implicado en la formación de la barrera hematoencefálica. Lo que ya sabemos por la bibliografía es que *Gai* participa en el desarrollo y mantenimiento de la barrera hematoencefálica junto con *Loco*, *Moody*, la subunidad *Gao* y *GB13F-G γ 1*, y por tanto participa en el aislamiento eléctrico del SNC (Granderath y cols., 1999; Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005). En estos trabajos observan como en los mutantes *Gai⁻* se encuentra interrumpida dicha barrera, de manera que estos mutantes tienen comprometida la conductancia axonal, al permitir el paso de iones de K^+ de la hemolinfa a través de la barrera defectuosa, produciendo un fenotipo de mala movilidad. Este fenotipo podría recordar al de los mutantes *loco* (Granderath y cols., 1999; Daneman y Barres, 2005; Schwabe y cols., 2005), pero es más débil en mutantes *Gai⁻* que en mutantes *loco*. Es importante resaltar que junto con *Loco*, el heterodímero *G β γ* y la subunidad *Gao*, *Gai* también participa en otros contextos como la división asimétrica de neuroblastos y precursores de órganos sensoriales (Fuse y cols., 2003; Yu y cols., 2003; Katanaev y Tomlinson, 2006). El fenotipo de los mutantes de falta de función *Gao*, *loco* y *G β γ* , tanto en la barrera hematoencefálica como en la división asimétrica es más severo que el que presentan los mutantes de falta de función para la subunidad *Gai*, indicando que el papel de *Gai* en estos procesos es menos relevante que el de los otros tres componentes.

Que el fenotipo glial de los mutantes *Gai⁻* sea más severo que el de los mutantes *loco* sugiere que el papel que cumple *Gai* en el desarrollo tardío, diferenciación y migración de la glia lateral es, probablemente, más relevante que el que cumple la proteína *Loco*. Es importante notar la diferencia respecto a lo que ocurre en la

barrera hematoencefálica y en la división asimétrica, donde tanto *Loco* como *Gao* tienen más protagonismo que *Gai*. En estos dos últimos procesos parece que *Loco*, además de regular a *Gai*, también está regulando a *Gao*, y por ello el fenotipo que presentan los mutantes *loco* en estos procesos es más severo que el de los mutantes *Gai*. Estos datos, y las alteraciones severas en la división asimétrica y el establecimiento de la barrera hematoencefálica causadas por la expresión de formas silvestres y mutantes de *Gao*, sugieren que *Gai* tiene un papel secundario en estos procesos. La expresión de *Gao* en el sistema nervioso es muy ubicua, está presente, como hemos visto en la glia de superficie, pero no se ha estudiado su presencia en otras células gliales. Sin embargo, aun en el caso de que se exprese, el hecho de que el fenotipo glial que muestra *Gai* sea más severo que el de *loco* parece indicar que *Gao* probablemente tenga un papel más secundario que *Gai* en la migración y diferenciación de la glia.

Nuestros resultados sugieren que la subunidad *Gai* está implicada en la regulación de la migración glial. En embriones mutantes la posición de las células de la glia lateral está alterada, pero podemos observar un fenotipo más acusado en las larvas mutantes *Gai* del tercer estadio. Como hemos comentado en resultados, en el ganglio ventral larvario de individuos silvestres, las células de la glia lateral, visualizadas con el anticuerpo anti-Repo, muestran un patrón posicional en el que se delimitan dos territorios bien definidos. En la región torácica las células de la glia lateral son abundantes y aparecen dispersas, sin un orden aparente. Sin embargo, en la región abdominal el número de células gliales es mucho menor, y su distribución parece seguir un patrón de columnas en el eje antero-posterior. Mediante el estudio de la expresión del marcador glial Repo observamos que en los individuos mutantes para *Gai*, la distribución de células gliales en el ganglio ventral larvario dista mucho de la descrita para los individuos silvestres. En el ganglio ventral de los mutantes *Gai* no existen dos ambientes de distribución de células gliales bien definidos, sino que las células aparecen homogéneamente dispersas en la totalidad del ganglio ventral. Sin embargo, no se producen diferencias significativas en el número de células gliales, lo que sugiere defectos de migración glial. Esta no sería la primera vez que se relaciona a *Gai* con procesos de migración, puesto que, como ya hemos comentado en la introducción, estudios *in vitro* de células de mamíferos sugieren que *Gai* participa en la migración de linfocitos (Spangrude y cols., 1985; Bacon y Camp, 1990). También son muy interesantes los datos obtenidos a través de cultivos celulares de células de glioma humanas, en los que se ha visto que el aumento en la adhesión y la migración

de estas células está asociada a la sobre-expresión de las proteínas humanas homólogas a Loco, probablemente a través de la regulación de la actina del citoesqueleto. Estos datos evidencian, una vez más, la implicación de la señalización mediada por proteínas G en procesos de migración, esta vez con el incentivo de tratarse de células gliales (Tatenhorst y cols., 2004).

Como en la barrera hematoencefálica *Gai* también regula el correcto posicionamiento de las células que la componen a través del control de la actina cortical, es tentador sugerir que probablemente también sea mediante la regulación de componentes del citoesqueleto, en respuesta a señales externas (como hormonas o moléculas provenientes de los axones), como *Gai* participa en los procesos de migración del resto de la glia lateral.

El defecto de condensación del ganglio ventral en los mutantes *Gai⁻* se debe principalmente a defectos en la glia lateral

El fenotipo que más llama la atención de los mutantes *Gai⁻* es la falta de condensación que presentan en el ganglio ventral nervioso. Como hemos comentado en los resultados, el proceso de condensación sigue siendo misterioso y desconocido, pero se sabe que existen cuatro procesos que parecen contribuir de una u otra manera en el mecanismo de condensación del ganglio ventral (Olofsson y Page, 2005). Ordenados de mayor a menor en función de su contribución tenemos:

1. La deposición de componentes de la matriz extracelular por parte de los hemocitos en migración.
2. El correcto desarrollo y diferenciación de las células de la glia.
3. El correcto desarrollo y diferenciación de la red neuronal y neuropilo.
4. El inicio de la actividad del sistema nervioso central.

No existen defectos aparentes en la migración de los hemocitos en mutantes *Gai⁻*

Hemos comprobado como la migración de los hemocitos en los mutantes *Gai⁻* es correcta, por lo que no es la falta de deposición de componentes de la matriz extracelular lo que produce la falta de condensación en los mutantes *Gai⁻*. Este hecho es acorde con el porcentaje de elongación que observamos nosotros (un 11.5% más

largo que el salvaje), mucho más corto que el que observa el grupo de Olofsson en mutantes en los que la migración de los hemocitos está interrumpida, donde el ganglio ventral es un 23% más largo que los embriones salvajes (Olofsson y Page, 2005).

La falta de actividad neural no parece contribuir a los defectos de elongación observado en los mutantes *Gai*⁻

Los mutantes *Gai*⁻ tampoco tienen una falta total de actividad neuronal, porque si fuese así no llegaría ningún individuo a larva, y mucho menos a adulto. Puede ocurrir que los defectos en la barrera hematoencefálica, al producir una disminución de la conductancia axonal, mermen la actividad neural de los individuos mutantes *Gai*⁻, pero no de manera muy acusada dado que los defectos que presentan en la barrera hematoencefálica los mutantes *Gai* son muy débiles (Schwabe y cols., 2005). Además, en el supuesto caso que la actividad neuronal fuese nula (aunque sabemos con certeza que esto no es cierto), la elongación resultante sería menor que la que observamos, ya que interrupción total de la actividad neuronal mediante la expresión pan neural de la toxina tetánica produce un ganglio un 7.2% más largo que los ganglios silvestres, y la elongación que vemos en los mutantes *Gai*⁻ es un 11.5% mayor que los ganglios silvestres, por lo que el porcentaje restante de elongación (4.3%) tendría que ser debido a otra causa.

Los defectos en el neuropilo podrían contribuir a los defectos de condensación, aunque no parecen ser los responsables últimos

En los embriones *Gai*⁻ observamos un ligero defecto en el patrón neuronal así como en el neuropilo que acompaña a estas neuronas. Este fenotipo neural podría ser secundario, consecuencia del mismo defecto glial, ya que entre neuronas y glia se mantiene un intenso y continuo diálogo durante el desarrollo de ambas partes, de manera que en cuanto una de las dos partes interrumpe o distorsiona este diálogo, la otra parte no puede desarrollarse de forma correcta (Griffiths e Hidalgo, 2004). Sospechamos que este defecto tampoco es el responsable último de la falta de condensación que observamos en los mutantes *Gai*⁻, porque una desestabilización del neurocitoesqueleto por la expresión pan-neural de una forma dominante negativa de la proteína Rac1, que desorganiza por completo tanto el patrón neuronal como el

neuropilo, da lugar a un ganglio ventral un 7.4% más largo que el ganglio ventral silvestre (Olofsson y Page, 2005), un 4.1% más corto que el de los mutantes *Gai*^{-/-}.

Los defectos en la glia lateral parecen ser los responsables de los defectos de condensación observados en los mutantes *Gai*^{-/-}

Como también hemos comentado anteriormente, los mutantes *Gai*^{-/-} presentan defectos en la diferenciación y migración de la glia lateral. El grupo de Olofsson estudió la condensación del ganglio ventral en mutantes para el gen *heartless*, el cual presenta defectos en la glia lateral, y tras desestabilizar el citoesqueleto de toda la glia lateral expresando una forma dominante negativa de la proteína Rac1 (Olofsson y Page, 2005). En ambos casos, al alterar el patrón y las características de esta glia, se produce una importante falta de condensación (18.6% en el primero de los casos y un 14.1% en el segundo). Todo ello nos hace pensar que los defectos que nosotros observamos en la glia lateral son la causa, en gran medida, de la falta de condensación que observamos, y además podrían contribuir por efectos secundarios sobre la arquitectura del neuropilo y la actividad neural. Estos hechos, junto con la existencia de algunos mutantes gliales que presentan también el fenotipo de falta de condensación, como el mutante de falta de función para el gen *repo* (Campbell y cols 1994; Halter y cols 1995) refuerzan la hipótesis planteada hace tiempo por Pipa de que la glia podría ejercer algún tipo de fuerza que condense el SNC (Pipa, 1973).

***Gai* está implicada en procesos neuroendocrinos.**

En mamíferos es conocido el papel que tiene *Gai* en procesos endocrinos, parece ser que mediante la regulación de los niveles de AMPc intracelular. Se ha comprobado que *Gai* está implicada en la regulación tanto de la tolerancia a la glucosa, como en la regulación de los niveles de este glúcido en sangre, probablemente a través de la regulación de la insulina (Chen y cols., 1997; Moxham y Malbon, 1996). Por otro lado es conocida la formación de tumores endocrinos al expresar formas constitutivamente activas de esta proteína (Dhanasekaran N. y cols., 1998) así como que mutaciones somáticas en *Gai* humano están relacionadas, de nuevo, con tumores endocrinos (Lyons y cols., 1990; Dhanasekaran N. y cols., 1998; Lerman y cols., 1998).

Nuestros datos, tanto de expresión como de fenotipo, también sugieren la implicación de *Gai* en distintos procesos endocrinos de *Drosophila*.

Los mutantes *Gai*⁻ presentan defectos en la expresión de neuropéptidos ¿Defectos en la identidad celular o problemas de regulación de la expresión?

Es evidente que en los mutantes *Gai*⁻ se reduce drásticamente el número de células inmunoreactivas para los anticuerpos que reconocen a los neuropéptidos FMRFamida y Lecoquinina. Sin embargo, no hemos podido determinar si las células que deberían expresar estos neuropéptidos están presentes pero sin expresar los neuropéptidos, o de lo contrario las células neuropeptidérgicas no existen. Por tanto, la ausencia de inmunoreactividad puede deberse a defectos en procesos radicalmente diferentes, bien a problemas de identidad neural, o bien a defectos en la expresión de los neuropéptidos.

Por un lado podría ocurrir que *Gai* participe en procesos de identidad celular, bien actuando como determinante de destino celular (otorgando a una célula concreta un destino celular determinado), bien participando en la segregación de dichos determinantes. Este último papel es bien conocido en neuroblastos, células que precisamente son los progenitores de las neuronas que posteriormente secretarán estos neuropéptidos, donde *Gai* forma parte de un complejo proteico que controla la correcta segregación de los determinantes de destino celular, que son los que en última instancia otorgan (según su presencia o ausencia) una identidad celular determinada (Schaefer y cols., 2001; Fuse y cols., 2003; Yu y cols., 2003; Yu y cols., 2005). Por otro lado podría ocurrir que *Gai* esté implicada en la regulación de la expresión del neuropéptido, participando de alguna manera en la cascada de señalización que ha de producirse para que el neuropéptido se exprese en esa célula.

Si *Gai* participase en procesos de identidad neuronal, bien como determinante o bien como segregador de los determinantes, una célula a la que le debería corresponder un destino neuronal determinado (en el caso que nos ocupa: destino neurosecretor, por ejemplo expresando FMRFamida) adquiriría, por ausencia del determinante de destino, un destino celular erróneo, y por tanto no veríamos en esa célula expresión del neuropéptido en cuestión. Sin embargo, las alteraciones observadas en la división asimétrica de mutantes *Gai*⁻ sugieren que este proceso no es la causa principal del fenotipo de reducción en la expresión de neuropéptidos. Primero, los mutantes *Gai*⁻ presentan defectos de división asimétrica en tan solo el

21% de los neuroblastos (Yu y cols., 2003), mientras que el porcentaje de pérdida de inmunoreactividad contra FMRFamida y Leucoquinina es mucho mayor (95% en el caso de la FMRFamida y 65% en el caso de la Leucoquinina). Segundo, en mutantes de falta de función para *Gai*, el porcentaje de errores en la adquisición del destino celular correcto de una determinada motoneurona (concretamente la RP2) es tan solo del 10%, en los que se producen ausencia o duplicación de esta motoneurona (Yu y cols., 2003). En el caso de las células que expresan FMRFamida o Leucoquinina, nunca hemos observado duplicación de alguna de estas células (situación que deberíamos observar con una frecuencia cercana al 5 % en el caso de que fuese un defecto de adquisición de destino neural), y por otro lado el número de ausencia de inmunotinción supera con creces el 5%. Por tanto, los defectos en identidad neural contribuirían, en todo caso, en muy bajo porcentaje a la ausencia de células neuropeptidérgicas observada en los mutantes *Gai*.

Por otro lado, el otro proceso en el que podría estar implicada *Gai* es en la regulación de la expresión del neuropéptido. Es decir, la célula tendría la identidad neurosecretora correcta, pero *Gai* participaría en la ruta necesaria para la expresión del neuropéptido. Este hecho se ve respaldado por la expresión de *Gai* en estas células. Podría haber una señal extrínseca que indujera y/o mantuviera la expresión del neuropéptido, por ejemplo un ligando que se una a un receptor asociado a proteínas G.

Aunque no hemos podido determinar si las células neurosecretoras afectadas están presentes (hecho que evidenciaría que lo que es defectuoso es la expresión del neuropéptido), pensamos que el proceso en el que está participando *Gai* es en la expresión del neuropéptido, porque por un lado *Gai* se expresa precisamente en estas neuronas peptidérgicas ya diferenciadas (hecho que también ocurre en la polilla *Manduca sexta*, al menos con la FMRFamida), y, por otro lado, el bajo porcentaje de defectos en la adquisición de destino celular debidos a la división asimétrica vistos en *Gai* no explica el alto porcentaje de ausencias de células peptidérgicas que observamos nosotros ni la ausencia de duplicaciones en estas células. Por tanto, proponemos que, en determinados tipos celulares, *Gai* actuaría en la cascada de señalización que conduce a la regulación de la expresión de neuropéptidos en respuesta a estímulos neuroendocrinos. En este sentido, es conocida la acción de numerosas señales neuroendocrinas como moduladores de la liberación y/o expresión de otros neuropéptidos u hormonas. En *Drosophila*, el neuropéptido Corazonina regula la liberación de la hormona ETH en las células INKA durante la ecdisis (Kim y cols.,

2004), y a su vez ETH conduce a la activación de las neuronas FMRFamidérgicas (Ewer, 2005; Kim y cols., 2006) (ver siguiente apartado para una explicación más detallada). Los defectos en ecdisis de los mutantes *Gai*⁻ y la expresión de *Gai* en células FMRFamidérgicas, y probablemente en células INKA, apoyarían la implicación de *Gai* como regulador de la expresión de neuropéptidos en respuesta a señales endocrinas.

La señalización mediada por *Gai* regula el proceso de la ecdisis

No hay duda de que las larvas mutantes *Gai*⁻ presentan defectos en la muda, que se manifiestan en dificultades para deshacerse del exoesqueleto (cutícula y mandíbula) que corresponde al estadio anterior. Está descrito que este tipo de fenotipos son debidos a problemas en la síntesis o secreción de la 20-hidroxi-ecdisona, o bien a problemas en la ruta de señalización que desencadena dicha hormona, llevada a cabo por un grupo de neuropéptidos que describiremos a continuación (Park y cols., 2002).

Los insectos tienen un exoesqueleto con una elasticidad muy limitada, y para poder crecer deben, por tanto, reemplazar periódicamente este exoesqueleto. El proceso por el cual el exoesqueleto es reemplazado se conoce como muda, y termina cuando el animal se deshace del viejo exoesqueleto, a través de un comportamiento muy estereotipado llamado ecdisis. El proceso de la muda es controlado por una hormona esteroidea llamada 20-hidroxi-ecdisona (20E), de manera que la muda se inicia tras un aumento de los niveles de 20E, y termina cuando se produce una caída de los niveles de dicha hormona. Una vez que los niveles de 20E alcanzan un valor umbral, la sincronización y la ejecución de la ecdisis es controlada por complejas, y todavía no bien entendidas, interacciones entre distintos neuropéptidos. Los neuropéptidos identificados en este proceso son: la hormona de la eclosión (EH) (liberada por dos pares de neuronas en el cerebro), la hormona desencadenante de la ecdisis (ETH) (liberada por unas células neurosecretoras asociadas a la tráquea llamadas células INKA), el péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP) (liberado por un grupo de neuronas del ganglio ventral) y la Corazonina (neuropéptido expresado en neuronas tanto del cerebro como del ganglio ventral) (Bate y Martínez-Arias, 1993; Park y cols. 2002; Kim y cols., 2004; Ewer, 2005). El modelo mayormente aceptado postula que la Corazonina se libera desde el cerebro a la hemolinfa, y viaja hasta las células INKA, donde se une a receptores de Corazonina (receptores asociados a proteínas G). Parece ser que la activación de estos receptores desencadena la

movilización de Ca^{2+} en las células INKA, que induce la liberación de ETH, el cual activa a sus receptores (también asociados a proteínas G) en un grupo de neuronas cerebrales, desencadenando a su vez la liberación de EH (Kim y cols., 2004; Ewer, 2005). A su vez, la liberación de EH a la hemolinfa hace que aumenten los niveles de GMPc en las células INKA, lo que inicia una retroalimentación positiva entre EH y ETH, y produce la liberación de CCAP en un grupo de neuronas del ganglio ventral, el cual interrumpe el estado de pre-ecdisis para iniciar la ecdisis (Luo y cols., 2005; Mendive y cols., 2005).

Como hemos comentado anteriormente, está descrito en la literatura que los fenotipos de doble mandíbula y doble cutícula, como los que podemos observar en los mutantes *Gai⁻*, suelen corresponder a problemas en la síntesis o secreción de 20E, o bien a problemas en la ruta de señalización que desencadena dicha hormona, llevada a cabo por los neuropéptidos anteriormente descritos (Park y cols. 2002). Se sabe que el receptor de la Corazonina, situado en las células INKA, es un receptor asociado a proteínas G. Sin embargo, no se sabe que subtipo de proteína G está asociada este receptor. Sabiendo que cuando la Corazonina activa este receptor se desencadena la liberación de ETH (que recordemos que es un neuropéptido esencial en la señalización mediada por 20E), y dado que los fenotipos que observamos en los mutantes *Gai⁻* coinciden con los defectos que se observan al suprimir la señalización de la 20E, y como además hemos observado expresión de *Gai* en las células que por su posición podrían ser células INKA, es tentador pensar que *Gai* podría ser quien transporte la información proveniente del receptor de la Corazonina, para desencadenar la producción de hormona peptídica ETH e iniciar el comportamiento de la ecdisis.

Por otro lado, el receptor de ETH también está asociado a proteínas G, y tampoco se sabe cual es el subtipo de proteína G implicada. Dado que, una vez que han aumentado los niveles de 20E, ETH desencadena la ecdisis a través de la unión a su receptor, y dado que la interrupción de esa señalización (Kim y cols., 2004) produce los mismos fenotipos que observamos nosotros en los mutantes *Gai⁻*, no es descomedido pensar que *Gai* sea el subtipo de proteína G asociado también al receptor de ETH, lo que no confronta con la hipótesis que postulábamos posteriormente, en la que decíamos que también podría estar asociado al receptor de la Corazonina. Más aún, recientemente se ha identificado un subgrupo de neuronas que expresan el receptor de ETH como las neuronas Tv FMRFamidérgicas, y, mediante modernas técnicas de imagen, basadas en el movimiento del Ca^{2+} intracelular, se ha visto que este tipo de neuronas que expresan tanto el receptor de ETH como la FMRFamida

se activan cuando se inicia la pre-ecdisis (Kim y cols., 2006). Dado que *Gai* se expresa en las células Tv, la subunidad *Gai* podría ser el nexo de unión entre dicho receptor y el neuropéptido FMRFamida, aunque, por el momento, la implicación de este neuropéptido en el fenómeno de la ecdisis es desconocida. En este sentido es interesante resaltar que hemos observado que la línea P224-Gal4, utilizada para expresar *Gai* en células FMRFamidérgicas mediante el sistema Gal4/UAS, es una inserción letal P(w+)Gal4 en la región del gen *FMRFa* que en larvas mutantes homocigóticas presenta un alto porcentaje de fenotipos de doble mandíbula.

Además, pudiera ser que *Gai* actuara en otros puntos de esta ruta endocrina, ya que en el patrón de expresión publicado por el grupo de Wolfgang, describen presencia proteica de *Gai* en la glándula protorácica, órgano endocrino donde se sintetiza la 20E (Wolfgang y cols., 1990). En mamíferos, *Gai* actúa en la señalización mediada por hormonas tan diversas como la hormona luteinizante (Kuhn y Gudermann, 1999), somatostatina (Gramada et al., 2001), o ACTH (Martini et al., 2004), entre otras. Por tanto, la implicación de *Gai* en procesos endocrinos parece ser una función conservada a lo largo de la escala filogenética.

Por otro lado se sabe que en este proceso de muda participan de forma determinante los músculos de la pared del cuerpo larvario, que mediante movimientos de contracción se deshacen de estas viejas estructuras (Park y cols. 2002). Como ya hemos visto, en los mutantes *Gai⁻* los músculos de la pared del cuerpo presentan fusiones y duplicaciones, que podrían dificultar estos movimientos contráctiles, los cuales requieren de mucha coordinación y simetría de fuerzas, simetría que se ve reflejada en el patrón que presentan. Además, los defectos en actividad neuronal derivados de la alteración de la barrera hematoencefálica también podrían dificultar el proceso de ecdisis. Estos datos sugieren, que aunque los problemas de muda que observamos en los mutantes *Gai⁻* probablemente tienen un origen endocrino, pueden ser agravados por estos defectos musculares y/o de actividad neuronal. Una posible manera de discriminar entre uno u otro origen sería expresar *Gai* en las células INKA u otras neuronas neuroendocrinas implicadas en ecdisis, para rescatar la señalización neuroendocrina y por tanto el fenotipo de ecdisis.

Alteraciones en la señalización de *Gai* producen defectos en la maduración de la cutícula y en la extensión de las alas

Nuestros resultados demuestran que de aquellos individuos en los que se expresa una forma constitutivamente activa de Gai tan solo nacen el 13.6% de los individuos esperados, y todos los adultos que eclosionan muestran un fenotipo de falta de maduración cuticular y falta de expansión de las alas. Este fenotipo, denominado fenotipo juvenil, se caracteriza por presentar una falta de melanización y esclerotización en la cutícula, de tal modo que una cutícula blanquecina acompaña a estos individuos durante su corta vida, que nunca excede los dos días. Este fenotipo está asociado a la falta del neuropéptido bursicón, o bien a defectos en la señalización de éste (Mendive y cols., 2005). El bursicón es un heterodímero formado por dos péptidos, que son codificados por los genes *burs* y *pburs*, y su unión al receptor DLGR2, que está asociado a proteínas G, activa la señalización por AMPc que desemboca en la melanización y esclerotización de la cutícula (lo que se denomina el curtido de la cutícula), así como la expansión de las alas al final de la metamorfosis del insecto. Se piensa que el bursicón actúa por debajo de todos los péptidos implicados en la ecdisis (ETH, CCAP...) (Luo y cols., 2005; Mendive y cols., 2005).

Estudios muy recientes han demostrado que el bursicón se expresa en un subgrupo de neuronas que expresan el CCAP, denominadas NCCAP. El subgrupo de neuronas NCCAP que no expresa bursicón parece regular la expresión de éste mediante rutas que requieren transmisión sináptica y en las que está implicada la Proteína Quinasa de tipo A (PKA). Bloqueos de la transmisión sináptica producidos mediante la expresión ectópica de canales de Na⁺, tanto en el grupo NCCAP regulador del bursicón como en el grupo de NCCAP que expresa el bursicón, producen fenotipos de falta de curtido cuticular y falta de la expansión de las alas, lo que se denomina fenotipo juvenil (Luan y cols., 2006).

El fenotipo juvenil que observamos al expresar formas constitutivamente activas de Gai es idéntico al que muestran aquellos individuos a los que o bien les falta bursicón, o bien la señalización de este neuropéptido es defectuosa (Luo y cols., 2005; Mendive y cols., 2005). En contextos como la división asimétrica o la formación de la barrera hematoencefálica se ha visto que el balance Gai-GDP/ Gai-GTP es necesario para la correcta señalización de las proteínas G (Yu y cols., 2003; Schwabe y cols., 2005). Como hemos comentado anteriormente, Gai podría estar asociado al receptor de la Corazonina, al receptor de ETH o a ambos a la vez. Por tanto, una ruptura del balance Gai-GDP/Gai-GTP causada por la expresión de Gai constitutivamente activa, podría dar al traste con la señalización a través de Gai de

estos neuropéptidos. Dado que el bursicón parece estar situado jerárquicamente por debajo tanto de la Corazonina como de ETH-EH, una señalización incorrecta de estos neuropéptidos podría alterar o bloquear la liberación de bursicón, desencadenando un defecto en el curtido de la cutícula.

Existe otra una posibilidad que explica el fenotipo juvenil que observamos en los individuos en los que se expresa la forma constitutivamente activa. En otros muchos contextos se ha visto que Gai es un inhibidor de la adenilato ciclasa (AC) (Makranz y cols., 2006), la cual, mediante un incremento de los niveles de AMPc, activa a la PKA, necesaria para la liberación de bursicón. Por tanto, al expresar formas constitutivamente activas de Gai, Gai estará inhibiendo a la PKA, y por tanto bloqueando la liberación de bursicón.

Implicación de Gai en procesos de división asimétrica en distintos tipos celulares

Recientemente se ha publicado la implicación de las proteínas G en procesos de división asimétrica, tanto en *Drosophila* como en otros organismos como el gusano *C.elegans*, la levadura *S.cerevisiae* o en ratón (Knoblich, 2001; Huttner y Kosodo, 2005). En *Drosophila* los estudios se han centrado principalmente en neuroblastos y precursores de los órganos sensoriales (SOPs). Se ha visto que tanto Gai, como Gao y G $\beta\gamma$ están implicadas en los procesos de división asimétrica. Gai pertenece a un complejo proteico con cierta redundancia funcional, denominado complejo apical. Este complejo controla tanto la segregación de determinantes como la asimetría del huso, siendo éstas, dos importantes características de la división asimétrica. En mutantes *Gai⁻*, tan solo el 21% de las divisiones de neuroblastos ocurre de manera anómala. Este bajo porcentaje de divisiones aberrantes parece ser debido al papel redundante, y predominante, de Gao como subunidad alfa del complejo G heterotrimérico, que a su vez tendría un papel más secundario que G $\beta\gamma$ en el mecanismo de división asimétrica.

Nosotros hemos comprobado en nuestros mutantes *Gai⁻* estos defectos de división asimétrica en neuroblastos (experimentos realizados con el alelo *Gai^{Δ3}*, datos no mostrados). Además, nuestros datos sugieren defectos en la división asimétrica de precursores musculares.

Defectos en la pared muscular en *Gai*: implicación de *Gai*

Como hemos visto, los mutantes *Gai*⁻ presentan fusiones y duplicaciones en algunos de los músculos que conforman la pared muscular larvaria. Los músculos de la pared larvaria están compuestos por fibras musculares individuales que presentan un patrón repetido de forma segmental. Estas fibras musculares individuales provienen del mesodermo. Cada fibra es el resultado de un complejo proceso iniciado en la embriogénesis temprana, mediante el cual las células del mesodermo se diferencian, migran y adquieren identidad de progenitores musculares. Una vez los progenitores se han especificado, sufren divisiones asimétricas para producir diferentes células fundadoras de músculo, proveyendo al embrión un lote completo de precursores para cada uno de los músculos somáticos individuales. La elección entre dos destinos, por ejemplo entre el músculo 7 y el músculo 8, es el resultado final de estas divisiones asimétricas (Paululat y cols., 1999).

El mecanismo por el cual se producen estas divisiones asimétricas, aunque no está del todo comprendido, parece ser bastante similar al que acontece en neuroblastos. La elección de destino se produce por segregación diferencial de determinantes de destino celular (entre las que se sabe que también se encuentra *Numb*) que está controlada por un complejo apical. Los componentes identificados hasta el momento que forman este complejo apical son las proteínas *Par* e *Inscuteable*, que también aparecen, como hemos visto, en el complejo apical tanto de neuroblastos como de precursores de órganos sensoriales (Ruiz-Gómez y Bate, 1997; Carmena y cols., 1998; Knoblich, 2001).

Mutaciones en *inscuteable* producen un fenotipo de fusiones y duplicaciones musculares similar al que observamos en los mutantes *Gai*⁻ (Burchard y cols., 1995; Knirr y cols., 1997; Paululat y cols., 1999). La presencia de *Gai* no ha sido descrita en el complejo apical que controla las divisiones asimétricas de los precursores musculares, pero es sugerente pensar que *Gai* esté participando también en este proceso. Por un lado, porque está implicada en la división asimétrica en otros contextos y otros organismos, y por otro lado porque su falta de función produce un fenotipo similar al de mutantes para el gen *inscuteable*, el cual participa en la división asimétrica de los precursores musculares de *Drosophila*, y realiza esta misma función en precursores neuronales en un complejo apical en el que también se encuentra *Gai*. Por tanto es tentador pensar que *Gai* e *Inscuteable* vuelven a formar

parte de un complejo que controla la división asimétrica de los precursores musculares. Este hecho apoyaría la idea de que la maquinaria de división asimétrica no parece variar de un contexto a otro, sino que los elementos que participan en ella son esencialmente los mismos en distintos contextos y en distintos organismos (Knoblich, 2001).

Importancia del balance y dosis de Gai-GDP/Gai-GTP y Gβγ en la señalización mediada por proteínas G

Como hemos podido ver en la introducción, la regulación de la señalización a través de proteínas G es exquisita. En esta regulación, es de suma importancia el estado en el que se encuentre la subunidad Gα. Es decir, el nucleótido de guanina que tenga asociado (GDP o GTP) en un momento dado dictaminará el transcurso de la señalización. Si el balance entre las formas Gai-GDP/ Gai-GTP es defectuoso en un momento crítico del desarrollo, el daño causado puede ser irreversible, a pesar de que la regulación posterior ocurra de manera correcta. Nuestros resultados referentes a la sobreexpresión o expresión ectópica de Gai silvestre y Gai constitutivamente activa, y los experimentos de rescate de *Gai* son consistentes con esta idea.

Los experimentos en los que se expresan formas de Gai mediante el sistema UAS-Gal4 probablemente desplacen este equilibrio hacia uno de los dos sentidos, alterando la señalización mediada por Gai, debido a que los niveles de expresión mediante algunas líneas Gal4 puede llegar a ser 5 veces superior a la expresión endógena (Yu y cols., 2003). Además, la sobre-expresión de Gai puede secuestrar a Gβγ, y así alterar la señalización de otras proteínas Gα, o los efectos mediados por el heterodímero Gβγ, como ocurre en la división asimétrica de neuroblastos o la formación de la barrera hematoencefálica (Fuse y cols., 2003; Yu y cols., 2003). Si este desequilibrio se produce después de que los patrones de desarrollo se han establecido de manera correcta, los efectos deletéreos pueden ser inapreciables, como así vemos en nuestros experimentos. Por el contrario, si este desequilibrio se produce cuando estos patrones se están estableciendo, se producirá un fenotipo debido a la alteración de la señalización de las proteínas G heterotriméricas.

Esta situación explicaría la diferencia de fenotipo que se observa al expresar *Gai*(UAS-*Gai*) con *Repo-Gal4* (Schwabe y cols 2005) o con *Gai-Gal4* (esta tesis). Se ha visto que la sobre-expresión de formas silvestres de *Gai* mediante *Repo-Gal4* (línea que se expresa en toda la glia lateral incluyendo por tanto a la glia de superficie) produce defectos en la barrera hematoencefálica, que se torna incapaz de envolver y aislar de forma correcta al neuropilo (Schwabe y cols 2005). Sin embargo, cuando nosotros sobreexpresamos *Gai* silvestre mediante *Gai-Gal4*, con expresión dominante en la glia postembrionaria, no observamos defectos fenotípicos aparentes. Probablemente esto sea debido a la temporalidad de expresión que tiene *Gai-Gal4*, con el cual no hemos registrado expresión ninguna hasta estadios larvarios (ver patrón de expresión en resultados), por lo que el secuestro del heterodímero $\text{G}\beta\gamma$ no se produce durante la formación, embrionaria, de la barrera hematoencefálica.

La falta de rescate del fenotipo de Gai^- mediante la expresión de *Gai* por el sistema UAS-*Gal4* también podría explicarse en base a la necesidad de un equilibrio controlado y de una estequiometría fija entre los distintos componentes y estados de la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas. Sin embargo, en la falta de rescate cigótico también podría contribuir la expresión tardía (postembrionaria) de *Gai-Gal4*, que impediría, al menos, la correcta división de los neuroblastos y la formación de la barrera hematoencefálica durante el desarrollo embrionario. En cuanto la falta de rescate materno con *Gai-Gal4*, el hecho de que esta línea *Gal4* no se exprese en las células nodriza, que suplen de material materno a los oocitos, nos impide hablar de “rescate materno” real. Experimentos con líneas *Gal4* con expresión en las células nodriza podrían contribuir a aclarar este punto.

Por otro lado, el balance entre $\text{Gai-GDP}/\text{Gai-GDP}$ también puede alterarse por la expresión de formas *Gai* constitutivamente activas, que mimetizan el estado Gai-GTP . La sobre-expresión de formas constitutivamente activas de la subunidad *Gai* es letal cuando son expresadas con *Gai-Gal4*. Estudios previos han demostrado que la sobre-expresión embrionaria de estas formas (mediante *Sca-Gal4* y *Repo-Gal4*) no alteraban la división asimétrica embrionaria (Yu y cols., 2003) ni tampoco la barrera hematoencefálica embrionaria (Schwabe y cols 2005), ya que estas formas constitutivamente activas no secuestran al heterodímero $\text{G}\beta\gamma$, que es finalmente el que tiene mayor peso en la correcta ejecución de esos procesos. Sin embargo, desconocemos si la expresión en estos casos, tanto con *sca-Gal4* como con *repo-Gal4*, producen letalidad. La letalidad que nosotros observamos debida a la sobre-expresión de estas formas constitutivamente activas de la subunidad *Gai* no parece deberse,

según los datos ya publicados (y por la expresión tardía de *Gai-Gal4*), a defectos en división asimétrica de neuroblastos ni a problemas en la formación de la barrera hematoencefálica, sino probablemente a que la incesante actividad de la proteína Gai (que de esta manera nunca se silencia) produce múltiples disfunciones (endocrinas entre otras) cuya suma resulta en las fatales consecuencias observadas. En estos casos, la expresión de Gai-GTP pondría de manifiesto procesos en los que Gai está actuando directamente sobre sus efectores.

Efectos de la pleiotropía en la viabilidad de los mutantes *Gai*

La ubicuidad de *Gai*, la muy temprana aparición en el desarrollo (debida a la fuerte contribución materna, contribución reservada a un selecto grupo de genes de vital importancia para el desarrollo temprano del animal), y la importancia de los procesos en los que está implicada esta subunidad, sugieren que su falta produce fatales consecuencias para el desarrollo del organismo. Sin embargo, a pesar de que la ausencia de los productos maternos y cigóticos de *Gai* reducen de forma dramática la viabilidad de los individuos, de vez en cuando alguno de estos individuos llega a estados larvarios, incluso alguno traspasa la etapa puparia para llegar a desarrollarse como un individuo adulto, y además es fértil. Esta aparente contradicción se resuelve por la demostrada redundancia, en al menos ciertas funciones, entre diversas subunidades *alpha* de proteínas G. En divisiones asimétricas, tanto de neuroblastos como de precursores de órganos sensoriales, se ha visto que Gao y Gai cooperan controlando el estado de activación-inactivación del heterodímero $\beta\gamma$, de tal modo que la falta de una de las subunidades se ve compensada, en cierta manera, con la presencia de la otra (Katanaev y Tomlinson, 2006).

Aún así, la falta de la subunidad Gai produce múltiples efectos deletéreos en el desarrollo y en la fisiología del organismo (pleiotropía). Dada el alto grado de conservación que se observa tanto en la estructura como en los procesos en los que participa Gai (hemos visto que está implicada en fenómenos de división asimétrica en organismos que van desde la levadura al ratón), es sugerente pensar que la subunidad Gai en *Drosophila* está también implicada en procesos idénticos o similares que sus homólogas en otros organismos. Además de la conservación que hemos visto en la división asimétrica, nuestros datos indican que Gai está implicada en la migración de células gliales en *Drosophila*, similar a su función en la migración de células del sistema inmune en mamíferos (Spangrude y cols., 1985; Bacon y Camp, 1990), o a la

regulación de la motilidad de células de glioma en mamíferos (Tatenhorst y cols., 2004). También hay conservación en la implicación de Gai en señalización endocrina, desde las conclusiones obtenidas por nuestros estudios, hasta los datos publicados en mamíferos (Lyons y cols., 1990; Dhanasekaran N. y cols., 1998; Lerman y cols., 1998). En base a las funciones conocidas de Gai en mamíferos, sugerimos otros procesos en los que podría participar Gai de *Drosophila*, y que por tanto podrían estar afectados en mutantes de falta de función para *Gai*, como: la activación de la NADPH oxidasa (complejo enzimático fundamental en la destrucción de agentes invasores a través de la respuesta inmune innata) (Marty y cols., 2006), la exocitosis (Ahnert- Hilger y cols., 1994), la migración de células inmunes (Spangrude y cols., 1985; Bacon y Camp, 1990), o el control de la proliferación celular (Lyons y cols., 1990; Chen y cols., 1997; Dhanasekaran N. y cols., 1998; Lerman y cols., 1998; Shinohara y cols., 2004). Nuestras observaciones preliminares indican que la migración de los hemocitos (células inmunes de *Drosophila*) podría verse ligeramente afectada por la falta de Gai, y que la sobre-expresión pan-neural de Gai en determinados contextos afecta al tráfico vesicular (ver antecedentes), lo que apoya la conservación funcional de esta proteína a lo largo de la filogenia.

Conclusiones

- 1) El ubicuo patrón de expresión de *Gai* indica que ésta participa en procesos biológicos de naturaleza muy diversa.
- 2) *Gai* se requiere para el desarrollo tardío y diferenciación de la glia lateral, y parece regular la migración de dichas células.
- 3) Los defectos de condensación del ganglio ventral observados en los mutantes *Gai⁻* parecen deberse, principalmente, a los defectos del desarrollo tardío de la glia lateral.
- 4) *Gai* está implicada en procesos endocrinos, ya que se requiere para la correcta ejecución del fenómeno de la ecdisis, y para la expresión de algunos neuropéptidos.
- 5) El fenotipo muscular de mutantes *Gai⁻* sugiere que *Gai* participa en la división asimétrica, además de los neuroblastos y precursores de órganos sensoriales, de los precursores musculares.
- 6) El correcto balance *Gai*-GTP/*Gai*-GDP es esencial para que la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas se desarrolle de la manera adecuada.

Bibliografía

1. Ahnert-Hilger G, Schafer T, Spicher K, Grund C, Schultz G, Wiedenmann B., (1994) Detection of G-proteins heterodimers on large dense core and small synaptic vesicles of neuroendocrine and neuronal cells. *Eur J Cell Biol.* **65** (1) 26-38.
2. Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang HY., (2002) Signalling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP *Science* **298** 2006-20010.
3. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2002) *Molecular biology of the cell.* 4^a edición.
4. Asburner M. (1989). *Drosophila: a laboratory handbook and manual.* Two volumens. *CSHL Press.*
5. Bacon KB, Camp RD. (1990) Interleukin (IL)-8-induced in vitro human lymphocyte migration is inhibited by cholera and pertussis toxins and inhibitors of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* **169**(3):1099-104.
6. Bate, M. y Martínez-Arias (1993). *The Development of Drosophila melanogaster*, vols. I y II. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
7. Betschinger J, Knoblich JA. (2004) Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol.* **14**(16):R674-85. Review.
8. Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. (2003) The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature.* **422**(6929):326-30.
9. Brand A. H. and Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates y generating dominant phenotypes. *Development.* **118**, 401-15.
10. Burchard S, Paululat A, Hinz U, Renkawitz-Pohl R. (1995) The mutant not enough muscles (nem) reveals reduction of the *Drosophila* embryonic muscle pattern. *J Cell Sci.* **108** (Pt 4):1443-54.
11. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni R, Hamm HE (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* **24**(6):765-81. Review.
12. Cai Y, Yu F, Lin S, Chia W, Yang X. (2003) Apical complex genes control mitotic spindle geometry and relative size of daughter cells in *Drosophila* neuroblast and pl asymmetric divisions. *Cell.* **112**(1):51-62.

13. Campbell G, Goring H, Lin T, Spana E, Andersson S, Doe CQ, Tomlinson A. (1994) RK2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. *Development*. **120**(10):2957-66.
14. Carmena A, Murugasu-Oei B, Menon D, Jimenez F, Chia W. (1998) Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev*. **12**(3):304-15. Erratum in: *Genes Dev* 1998 Apr **15**;12(8):1241.
15. Chen Y, Veenstra JA, Hagedorn H, Davis NT. (1994) Leucokinin and diuretic hormone immunoreactivity of neurons in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and co-localization of this immunoreactivity in lateral neurosecretory cells of abdominal ganglia. *Cell Tissue Res*. **278**(3):493-507.
16. Chen JF, Guo JH, Moxham CM, Wang HY, Malbon CC. (1997) Conditional, tissue-specific expression of Q205L alpha i2 in vivo mimics insulin action. *Journal of Molecular medicine* **75**, 283-289.
17. Chiba Y, Misawa M. (2001) Increased expression of G12 and G13 proteins in bronchial smooth muscle of airway hyperresponsive rats. *Inflamm Res*. **50**(6):333-6.
18. Copenhaver PF, Horgan AM, Nichols DC, Rasmussen MA. et al., (1995) Developmental expression of heterotrimeric G proteins in the nervous system of *Manduca sexta*. *Journal of Neurobiology*. **26** (4), 461-484.
19. Crews ST, Thomas JB, Goodman CS. (1988) The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell*. **52**(1):143-51.
20. Daneman R, Barres BA. (2005) The blood-brain barrier lessons from moody flies *Cell*. **123**(1):9-12.
21. Dhanasekaran N, Tsim ST, Dermott JM, Onesime D. et al., (1998) Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene*. **17**, 1383-1394.
22. Elia N, Frechter S, Gedi Y, Minke B, Selinger Z. (2005) Excess of Gbet α over Gq α in vivo prevents dark, spontaneous activity of *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol*. **171**(3):517-26
23. Ewer J. 2005 Behavioral actions of neuropeptides in invertebrates: insights from *Drosophila*. *Horm Behav*. 2005 **48**(4):418-29. Review.
24. Ferris J, Ge H, Liu L, Roman G. (2006) G(o) signaling is required for *Drosophila* associative learning. *Nat Neurosci*. **9**(8):1036-40.

25. Foerster K, Groner F, Matthes J, Koch WJ, Birnbaumer L, Herzig S. (2003) Cardioprotection specific for the G protein Gi2 in chronic adrenergic signaling through beta 2-adrenoceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(24):14475-80.
26. Fremion F, Astier M, Zaffran S, Guillen A, Homburger V, Semeriva M. et al. (1999) The heterotrimeric protein Go is required for the formation of Herat epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol* **145** 1063-1076.
27. Fuse N, Hisata K, Katzen AL, Matsuzaki F. (2003) Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr Biol.* **13**(11):947-54.
28. Giansanti MG, Gatti M, Bonaccorsi S. (2001) The role of centrosomes and astral microtubules during asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts. *Development.* **128**(7):1137-45.
29. Granderath S, Klambt C. (1999) Glia development in the embryonic CNS of *Drosophila* *Curr Opin Neurobiol.* **9**(5):531-6. Review.
30. Greif GJ, Sodickson DL, Bean BP, Neer EJ, Mende U (2000). Altered regulation of potassium and calcium channels by GABA(B) and adenosine receptors in hippocampal neurons from mice lacking Galpha(o). *J Neurophysiol.* **83**(2):1010-8.
31. Griffiths RL, Hidalgo A. (2004) Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons. *EMBO J.* **23**(12):2440-50.
32. Gromada J, Hoy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P. (2001) Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules. *J Physiol.* **535**(Pt 2):519-32.
33. <http://www.flybase.net> o <http://flybase.indiana.edu> Base de datos en internet de *Drosophila melanogaster*.
34. Izumi Y, Ohta N, Itoh-Furuya A, Fuse N, Matsuzaki F. (2004) Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J Cell Biol.* **164**(5):729-38.
35. Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers AA, Technau GM. (1995) The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development.* **121**(2):317-32.

36. Herrero P, Magarinos M, Torroja L, Canal I. (2003) Neurosecretory identity conferred by the apterous gene: lateral horn leucokinin neurons in *Drosophila*. *J Comp Neurol*. **457**(2):123-32.
37. Huttner y Kosovo (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. **17**(6):648-57. Review.
38. Hornquist CE, Lu X, Rogers-Fani PM, Rudolph U, Shappell S, Birnbaumer L, Harriman GR (1997). G(alpha)i2-deficient mice with colitis exhibit a local increase in memory CD4+ T cells and proinflammatory Th1-type cytokines. *J Immunol*. **158**(3):1068-77.
39. Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM. (2001) Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *J Clin Invest*. **108**(3):477-83.
40. Johnson EN, Druey KM. (2002) Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. **109**(4):592-602. Review.
41. Jones BW. (2005) Transcriptional control of glial cell development in *Drosophila*. *Dev Biol*. **278**(2):265-73. Review.
42. Kaltschmidt JA, Davidson CM, Brown NH, Brand AH. (2000) Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol*. **2**(1):7-12.
43. Kaltschmidt JA, Brand AH. (2002) Asymmetric cell division: microtubule dynamics and spindle asymmetry. *J Cell Sci*. **115**(Pt 11):2257-64. Review.
44. Katanaev VL, Ponzielli R, Semeriva M, Tomlinson A. (2005) Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* **120** 111-122.
45. Katanaev VL, Tomlinson A. (2006) Dual roles for the trimeric G protein Go in asymmetric cell division in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(17):6524-9.
46. Kim YJ, Spalovska-Valachova I, Cho KH, Zitnanova I, Park Y, Adams ME, Zitnan D. (2004) Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(17):6704-9.
47. Kim YJ, Zitnan D, Cho KH, Schooley DA, Mizoguchi A, Adams ME. (2006) Central peptidergic ensembles associated with organization of an innate behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(38):14211-6.

48. Kim YJ, Zitnan D, Galizia CG, Cho KH, Adams ME. (2006) A command chemical triggers an innate behavior by sequential activation of multiple peptidergic ensembles. *Curr Biol.* **16**(14):1395-407.
49. Kimple RJ, Kimple ME, Betts L, Sondek J, Siderovski DP. (2002) Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by G α subunits. *Nature.* **416**(6883):878-81.
50. Kinane TB, Komatsuzaki K, Aleixo MD, Sunday ME, Ercolani L. (1999). Regulation of the G protein G α 2 by growth and development in fetal airway epithelium. *Am.J.Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 35-42.
51. Klambt C, Hummel T, Menne T, Sadlowski E, Scholz H, Stollewerk A. (1996) Development and function of embryonic central nervous system glial cells in *Drosophila*. *Dev Genet.* **18**(1):40-9. Review.
52. Knirr S, Breuer S, Paululat A, Renkawitz-Pohl R. (1997) Somatic mesoderm differentiation and the development of a subset of pericardial cells depend on the not enough muscles (nem) locus, which contains the inscuteable gene and the intron located gene, skittles. *Mech Dev.* **67**(1):69-81.
53. Knoblich JA. (2001) Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**(1):11-20. Review.
54. Kofuji P, Newman EA. (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **129**(4):1045-56. Review.
55. Kreft M, Gasman S, Chasserot-Golaz S, Kuster V, Rupnik M, Sikdar SK, Bader M, Zorec R. (1999) The heterotrimeric G α (3) protein acts in slow but not in fast exocytosis of rat melanotrophs. *J Cell Sci.* **112** (Pt 22):4143-50.
56. Kraut R, Chia W, Jan LY, Jan YN, Knoblich JA. (1996) Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature.* **383**(6595):50-5.
57. Kuhn B, Gudermann T. (1999) The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to G α 2. *Biochemistry.* **38**(38):12490-8.
- Lerman BB, Dong B, Stein KM, Markowitz SM, Linden J, Catanzaro DF. (1998). Right ventricular outflow tract tachycardia due to a somatic cell mutation in G protein subunit- α -i2. *J.Clin.Invest.* **101**, 2862-2868.
58. Liebmann C. (2004) G protein-coupled receptors and their signaling pathways: classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts. *Curr Pharm Des.* **10**(16):1937-58. Review.
59. Liu X, Liu T, Slusarski DC, Yang-Snyder J, Malbon CC, Moon RT, Wang H. (1999) Activation of a frizzled-2//beta adrenergic receptor cimera promotes Wnt

- signalling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via G alpha o and g alpha t. *Proc. Nat. Acad.Sci.USA* **96** 14383-14388.
60. Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, Wang Hy, Hallagan S, Moon RT, Malbon CC. (2001) G protein signalling from activated rat frizzled-1 to the Beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* **292**, 1718-1722.
61. Lu B, Jan LY, Jan YN. (1998) Asymmetric cell division: lessons from flies and worms. *Curr Opin Genet Dev.* **8**(4):392-9. Review.
62. Luan H, Lemon WC, Peabody NC, Pohl JB, Zelensky PK, Wang D, Nitabach MN, Holmes TC, White BH. (2006) Functional dissection of a neuronal network required for cuticle tanning and wing expansion in *Drosophila*. *J Neurosci.* **26**(2):573-84.
63. Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger HW, Hsueh AJ. (2005) Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**(8):2820-5.
64. Lyons RM, Moses HL. (1990) Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem.* **14**;187(3):467-73. Review.
65. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY. (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell. Sep* **102**(5):635-46.
66. Makranz C, Cohen G, Reichert F, Kodama T, Rotshenker S. (2006) cAMP cascade (PKA, Epac, adenylyl cyclase, Gi, and phosphodiesterases) regulates myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II in microglia and macrophages. *Glia.* **53**(4):441-8.
67. Malbon (2005) G proteins in development. *Nature reviews molecular cell biology* **6**, 689-701.
68. Marcaggi P, Attwell D. . (2004) Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia* **47**(3):217-25. Review.
69. Marty C, Kozasa T, Quinn MT, Ye RD. (2006) Activation state-dependent interaction between Galphai and p67phox. *Mol Cell Biol.* **26**(13):5190-200.
70. Martini CN, Vaena de Avalos SG, del Carmen Vila M. (2004) ACTH stimulates the release of alkaline phosphatase through Gi-mediated activation of a phospholipase C and the release of inositol-phosphoglycan. *Mol Cell Biochem.* **258**(1-2):191-9.
71. Mendive FM, Van Loy T, Claeysen S, Poels J, Williamson M, Hauser F,

- Grimmelikhuijzen CJ, Vassart G, Vanden Broeck J. (2005) *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *FEBS Lett.* **579**(10):2171-6.
72. Morris AJ, Malbon CC (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* **79**(4):1373-430. Review.
73. Moxham CM, Hod Y, Malbon CC., (1993) Induction of G alpha i2 specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science* **260**, 991-995.
74. Moxham CM, Malbon CC. (1996) Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G ialpha2. *Nature.* **379**(6568):840-4.
75. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR, et al. (1990). Two G proteins oncogenesis in human endocrine tumors. *Science* **249**. 655-659 (1990).
76. Mahajan-Miklos S, Cooley L. (1994) Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Develop. Biol* **165**, 336-351.
77. Natochin M, Lester B, Peterson YK, Bernard ML, Lanier SM, Artemyev NO. (2000) AGS3 inhibits GDP dissociation from galpha subunits of the Gi family and rhodopsin-dependent activation of transducin. *J Biol Chem.* **275**(52):40981-5.
78. Nichols (2006) FMRFamide-related peptides and serotonin regulate *Drosophila melanogaster* heart rate: mechanisms and structure requirements. *Peptides.* **27**(5):1130-7.
79. Olofsson B. and D. Page. (2005). Condensation of the central nervous system in the embryonic *Drosophila* system by blocking hemocyte migration or neural activity. *Developmental Biology.* **279**, 233-243.
80. Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol.* **83**(2):101-30. Review.
81. Park Y, Filippov V, Gill SS, Adams ME. Deletion of the ecdysis-triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency *Development.* **2002** **129**(2):493-503.

82. Paululat A, Breuer S, Renkawitz-Pohl R. (1999) Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **296**(1):151-60. Review.
83. Petronczki M, Knoblich JA. (2001) DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* **3**(1):43-9.
84. Pipa, R.L. (1973). Proliferation, movement, and regression of neurons during postembryonic development of insects. In: Young, D. (Ed.), *Developmental Neurobiology of Arthropods*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. **268**.
85. Preston CR, Engels WR. (1996) P-element-Induced male recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* .**144**, 1611-1622.
86. Preston CR, Sved JA, Engels WR. (1996) Flanking duplications and deletions associated with P-Induced male recombination in *Drosophila*. *Genetics*. **144**,1623-1638.
87. Prieto Villapun JC, Solano Haro RM, Carmena Sierra MJ, Sanchez-Chapado M. (2005) Importance of heterotrimeric G proteins in prostate cancer molecular biology. *Actas Urol Esp.* **29**(10):948-54.
88. Provost NM, Somers DE, Hurley JB.. (1988) A *Drosophila melanogaster* protein alpha subunit is expressed primarily in embryos and pupae. *The Journal of Biological Chemistry* **263** (24), 12070-12076.
89. Ruiz Gomez M, Bate M. (1997) Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development*. **124**(23):4857-66.
90. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Boulay G, Bradley A, Birnbaumer L., (1995) Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G *alpha*(i2)-deficient mice. *Nature Genet.* **10**, 143-150.
91. Schaefer M, Petronczki M, Dorner D, Forte M, Knoblich JA (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell*. **107**(2):183-94.
92. Schwabe T, Bainton RJ, Fetter RD, Heberlein U, Gaul U.(2005) GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila* *Cell*. **123**(1):133-44.

93. Seep y Auld, (1999). Conversion of lacZ trap lines to GAL 4 lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **151**, 1093-1101.
94. Shinohara H, Udagawa J, Morishita R, Ueda H, Otani H, Semba R, Kato K, Asano T.. (2004) Gi2 signaling enhances proliferation of neural progenitor cells in the developing brain. *J. Biol. Chem.* **279**, 41141-41148.
95. Schober M, Schaefer M, Knoblich JA. (1999) Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. **402**(6761):548-51.
96. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT.. (1997) Interaction of Wnt and Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* **390**, 410-413.
97. Spangrude GJ, Sacchi F, Hill HR, Van Epps DE, Daynes RA. (1985) Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol*. **135**(6):4135-43.
98. Speicher S, Garcia-Alonso L, Carmena A, Martin-Bermudo MD, de la Escalera S, Jimenez F.. Neurotactin Functions in Concert with Other Identified CAMs in Growth Cone Guidance in *Drosophila*. *Neuron*. **20**, 221-233.
99. Spradling AC (1993). Germline cyst: communes that work. *Cell*. **72** (5), 649-651.
100. Takesono A, Cismowski MJ, Ribas C, Bernard M, Chung P, Hazard S 3rd, Duzic E, Lanier SM. (1999) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways *J Biol Chem*. **274**(47):33202-5.
101. Tatenhorst L, Senner V, Puttmann S, Paulus W. (2004) Regulators of G-protein signaling 3 and 4 (RGS3, RGS4) are associated with glioma cell motility. *J Neuropathol Exp Neurol*. **63**(3):210-22.
102. Tayler TD, Robichaux MB, Garrity PA. (2004) Compartmentalization of visual centers in the *Drosophila* brain requires Slit and Robo proteins. *Development*. **131**(23):5935-45. Epub 2004 Nov 3.
103. Tolbert LP, Oland LA, Tucker ES, Gibson NJ, Higgins MR, Lipscomb BW. (2004) Bidirectional influences between neurons and glial cells in the developing olfactory system. *Prog Neurobiol*. **73**(2):73-105. Review.

104. Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K. (1999). Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupt axonal transport. *Current Biology*. **9**:489-492.
105. Voronina E, Wessel GM. Et al. (2004) Regulatory contribution of heterotrimeric G-proteins to oocyte maturation in the sea urchin. *Mech. Dev.* **121**, 247-259.
106. Ueno K, Kohatsu S, Clay C, Forte M, Isono K, Kidokoro Y. (2006) G α is involved in sugar perception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* **26**(23):6143-52.
107. Wang H, Chia W. (2005) *Drosophila* neural progenitor polarity and asymmetric division. *Biol Cell*. **97**(1):63-74. Review.
108. Wang HY, Liu T, Malbon CC. (2006) Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal*. **18**(7):934-41.
109. Wettschureck N, Offermanns S (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*. **85**(4):1159-204. Review.
110. Wodarz A, Huttner WB. (2003) Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev*. **120**(11):1297-309. Review.
111. Wolfgang WJ, Quan F, Goldsmith P, Unson C, Spiegel A, Forte M (1990). Immunolocalization of G protein alpha-subunits in the *Drosophila* CNS. *J Neurosci*. **10**(3):1014-24.
112. Wolfgang WJ, Quan F, Thambi N, Forte M. (1991) Restricted spatial and temporal expression of G-Protein alpha subunits during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **113**(2):527-38.
113. Wood W, Faria C, Jacinto A (2006). Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 2006 May 8; **173**(3):405-16.
114. Wolfgang WJ, Quan F, Goldsmith P, Unson C, Spiegel A, Forte M. (1990) (1990) Immunolocalization of G protein alpha-subunits in the *Drosophila* CNS. *The journal of Neuroscience*. **10** (3), 1014-1024.

115. Wolfgang WJ, Quan F, Thambi N, Forte M. (1991) Restricted spatial and temporal expression of G-Protein alpha subunits during *Drosophila* embryogenesis
116. Wolfgang WJ, Forte M. (1995) Posterior localization of the *Drosophila* Gai protein during early embryogenesis requires a subset of the posterior group genes. *Int.J.Dev.Biol.* **39**, 581-586.
117. Wolfgang WJ, Clay C, Parker J, Delgado R, Labarca P, Kidokoro Y, Forte M. (2004) Signaling through Gs alpha is required for the growth and function of neuromuscular synapses in *Drosophila*. *Dev Biol* **268**, 295-311.
118. Xu H, Manivannan A, Liversidge J, Sharp PF, Forrester JV, Crane IJ. (2003) Requirements for passage of T lymphocytes across non-inflamed retinal microvessels. *J Neuroimmunol.* **42**(1-2):47-57.
119. Yong-Chao Ma, Jianyun Huang, Shariq Ali, William Lowry, and Xin-Yun Huang., (2000) Src Tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell.* **102**, 635-646.
120. Yu F, Cai Y, Kaushik R, Yang X, Chia W. (2003) Distinct roles of Galpha and Gbeta13F subunits of the heterotrimeric G protein complex in the mediation of *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions *J Cell Biol.* **162**(4):623-33.
121. Yu F, Wang H, Qian H, Kaushik R, Bownes M, Yang X, Chia W (2005). Locomotion defects, together with Pins, regulates heterotrimeric G-protein signaling during *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Genes Dev.* **19**(11):1341-53.
122. Yu F, Kuo CT, Jan YN. (2006) *Drosophila* neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron.* **51**(1):13-20. Review.