



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de la especialidad sináptica en el sistema visual de *Drosophila melanogaster*

Alejandra Fernández Pineda

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





Departamento de Genética, Microbiología y Estadística

Programa de Doctorado en Genética (HDK05)

Facultad de Biología

Universidad de Barcelona

**Estudio de la especificidad sináptica  
en el sistema visual de *Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por

**Alejandra Fernández Pineda**

Para optar al grado de

**Doctora**

por la Universidad de Barcelona



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de la Dra. Marta Morey Ramonell.

Realizada en el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de  
Biología de la Universidad de Barcelona.

La directora:

La tutora:

La autora:

Dra.Marta Morey Ramonell

Dra.Montserrat Corominas Guiu

Alejandra Fernández Pineda

Barcelona, Septiembre 2017





## Explicación de la portada y contraportada

Immunofluorescencia en el cerebro adulto de *Drosophila melanogaster*. Se observan los fotorreceptores R7 (verde) y R8 (rojo) en el neuropilo de la *medulla*.



# Agradecimientos

Aún no puedo creerme que este día haya llegado...he terminado de escribir la tesis!!! Parece que fue ayer aquel día 10 de Noviembre que llegué a Barcelona ilusionada pero también triste por todo lo que dejaba atrás en Madrid. Aunque han sido 4 años de mucho trabajo y sacrificio, jamás olvidaré los momentos tan especiales y divertidos que he pasado.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi directora Marta por haberme dado la oportunidad de tener esta experiencia que me ha hecho aprender tanto a nivel científico pero también a nivel personal. Gracias por dedicarme tu tiempo y por la paciencia que has tenido conmigo.

No tengo palabras para agradecer a mis compañeros/amigos del laboratorio por hacer que estos 4 años hayan merecido la pena. Sin vosotros nunca hubiera sido lo mismo! Gracias por esas fiestas improvisadas entre semana que empezaban en el 100 montaditos y nos echaban con villancicos, por las infinitas "cerves" que hemos "hecho" los jueves, por las charlas filosóficas, las risas infinitas que nos hemos echados juntos y por supuesto por ayudarme en mis numerosas mudanzas. Gracias a mis "umpa-lumpa": Paula, Elena, Haritz y Qi, nunca olvidaré esas tardes a partir de las 8 (o a veces incluso antes...). Cuántos buenos momentos he pasado en la *fly room*: las canciones a dúo con Paula de "Ella baila sola", sus canciones sorianas, sus "meca" y sus "tasca", la alegría de Elena con sus saltitos y sus "elenas" varios, los chistes malos de Haritz, sus lecciones de euskera y sus despedidas retardadas, los cánticos de Qi y sus "hoy me voy pronto". Paula y Elena, mis "Hot fly girls", cuánto voy a echar de menos nuestras sesiones de cine, los conciertos varios y vuestros ánimos en el gimnasio. Haritz, parece que fue ayer aquel día que me enseñaste a diseccionar cerebros... gracias infinitas por tus clases magistrales de *Illustrator* y resolver todas mis dudas genéticas. Qi, gracias por haberme hecho partícipe de tu rejuvenecimiento, cuánto me alegro de haberte conocido Qitina! Tampoco me puedo olvidar de Paula M y Mireia, hicisteis que los primeros años fueran geniales, gracias por todos los momentos que hemos compartido! Gracias a "las Irenes", Marc y Álex por haber creado el mejor de los ambientes en el lab. Gracias también a Marina por ser la mejor Yoda con tu gran sabiduría. Gracias a Carlos, José y Giacomo, y a Martí por ser el mejor *padawan*. Gracias a los "planarios" por haber organizado esas inolvidables calçotadas y cenas de Navidad, en especial a Nidia, Jose y Miquel por vuestra alegría y por haberme ayudado a lo largo de la tesis.

Gracias a mi catalana/morileña Marta por todos los buenos momentos que hemos pasado en estos 4 años. Ha sido genial haber compartido contigo esta experiencia!

Gracias a mis compañeras de piso Laura y Elena, por haberme hecho sentir como en casa. Voy a echaros mucho de menos! No tengo ninguna duda de que vais a llegar muy lejos las dos!

Gracias a Alba, Almudena y Gema por regalarme momentos llenos de risas en vuestras visitas, con vosotras la amistad no entiende de distancias.

Gracias a mis padres y a mis hermanos, sin los cuales no hubiera podido llegar hasta aquí. Gracias por vuestra paciencia, vuestros ánimos en los momentos más duros, vuestros sabios consejos y vuestro apoyo incondicional. No puedo sentirme más orgullosa de mi familia! Os quiero mucho! Y por último gracias a ti Chacón, no puedo creer que nuestras "cuentas atrás" se acaben para siempre. Aunque esto no ha sido fácil, has estado apoyándome en cada momento, sacándome una sonrisa como solo tú sabes hacerlo en los peores momentos, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí en estos 4 años. Y ahora sí, comienza lo mejor! Te quiero!



# Resumen

El establecimiento de conexiones sinápticas específicas entre neuronas es esencial para la formación de los circuitos neuronales. En muchos sistemas esto requiere de una extensión hacia una capa sináptica concreta y la selección de la neurona específica con la que realizar la sinapsis, entre todas las células que ocupan la capa. Sin embargo, los mecanismos que dirigen el establecimiento de conexiones entre neuronas continúan siendo una incógnita en cualquier organismo. Nuestra hipótesis se basa en que las diferencias moleculares entre subtipos neuronales, con origen y función similar, contribuyen a su distinta conectividad.

Para ello, decidimos estudiar la diferente selección de capa de dos fotorreceptores estrechamente relacionados del sistema visual de *Drosophila melanogaster*: R7 y R8. Durante el desarrollo de la pupa, el conjunto de células R7 y R8 que forman el ojo compuesto (750 R7s y 750 R8s) se dirigen de forma sincrónica hacia su capa final sináptica. Gracias a esta precisa coordinación, estudios previos obtuvieron el transcriptoma de R7 y R8 durante el proceso de la selección de capa. A través de herramientas bioinformáticas se han identificado genes diferencialmente expresados entre R7 y R8. Para esclarecer una función de estos genes en la selección de capa de R8 nos centramos en el estudio de 229 genes enriquecidos en R8 mediante un *screen* con RNAi.

De este análisis se han obtenido 43 genes candidatos con defectos en la selección de capa de R8, de un total de 175 genes estudiados. Para verificar el fenotipo obtenido en el *screen* con RNAi, se procedió a la validación mediante líneas mutantes o inserciones. De 16 genes viables, se consiguieron validar 5 de ellos, de los cuales nos centramos en dos genes: *GstE11* y *esn*. *GstE11* podría mostrar una función específica en la guía axonal de R8, la cual sería independiente a su papel protector frente al estrés oxidativo. Esta hipótesis se corroboraría ya que un miembro de la misma familia de GSTs mostró defectos en el R8 en el *screen* con RNAi. En referencia a *Esn*, hemos demostrado que tiene una función en la selección de capa de R8, que podría estar mediada por *Fmi*, que es una molécula de superficie involucrada en la guía axonal de R8. Dado que *Fmi* y *Gogo* actúan de forma conjunta en la selección de capa de R8, se sugiere que *Esn* podría colaborar con ambos en el cono de crecimiento de R8.



## Abstract

A fundamental requirement in the assembly of neural circuits is that neurons establish synaptic connections with their appropriate partners. In many systems, this involves extension into a particular synaptic layer and selection of the appropriate partner among all the cells in the layer. Virtually nothing is known about the mechanisms governing the establishment of specific connections in any system. Our hypothesis is that the molecular differences that exist between neuronal subtypes, with similar developmental origin and function, contributes to their distinct connectivity.

To address our hypothesis, we study the differential layer selection of the closely related *Drosophila* R7 and R8 photoreceptors. Each eye contains 750 R7 and 750 R8 cells, and the entire population of each subtype proceeds synchronously to their respective final synaptic layer during pupal development. Taking advantage of such precise coordination, previous studies of RNA-seq profiled the R7 and R8 transcriptomes during the process of final extension. Our bioinformatics analysis identified differentially expressed genes between the R7 and the R8. In order to gain insight into a role of these genes in R8 layer selection, we focused on 229 R8 enriched genes and performed an RNAi screen.

Following this approach, we have identified 43 candidate genes showing layer selection defects, out of 175 genes analyzed. To verify the observed RNAi phenotype, we validated them by mutant lines or insertions and found that in 5 out of 16 viable genes tested, the phenotype in R8 was successfully confirmed. Among the 5 validated genes, we focused on *GstE11* and *esn*. We found that *GstE11* might have a specific role in layer selection independently of its protective role from oxidative stress. This hypothesis could be supported by the fact that another member of the same family of GSTs also showed targeting defects in the RNAi screen. Besides, we demonstrated that *Esn* has a function in R8 layer selection, which may be mediated through its interaction with *Fmi*, which is already described to function in R8 axon guidance. Since *Fmi* and *Gogo* work together in R8 targeting, we suggest that *Esn* could be collaborating with them in the R8 axon growth cone.





# Tabla de contenidos

<b>Lista de figuras</b>	1
<b>Lista de tablas</b>	3
<b>Lista de abreviaturas</b>	5
<b>I. Introducción</b>	
1. Estructura y formación del entramado neuronal	11
2. <i>Drosophila melanogaster</i> como animal modelo para el estudio de la conectividad específica neuronal	15
2.1 El sistema nervioso de <i>Drosophila</i>	16
2.2 El sistema visual de <i>Drosophila</i>	17
2.3 Similitudes entre el sistema visual de <i>Drosophila</i> y de vertebrados	19
2.4 Grandes avances en la conectividad de los circuitos neuronales gracias a <i>Drosophila</i>	21
3. Desarrollo del sistema visual de <i>Drosophila</i>	23
3.1 Diferenciación de los fotorreceptores. Formación del mapa retinotópico	23
3.2 Desarrollo de la <i>lamina</i> : Superposición neural	25
3.3 Desarrollo de la <i>medulla</i>	26
3.4 Sinapsis	27
4. R7 y R8	29
4.1 Similitudes	29
4.2 Diferente selección de capa en la <i>medulla</i> y diferentes dianas postsinápticas	30
5. Las moléculas de superficie celular y el ensamblaje de redes neurales	33
6. Moléculas de superficie celular implicadas en la selección de capa en R8 y R7	35
6.1 Selección de capa de R8	35
6.2 Selección de capa de R7	36
<b>II. Objetivos</b>	43
<b>III. Materiales y métodos</b>	
1. Cepas de <i>Drosophila</i>	47
2. Oligonucleótidos	49
3. Anticuerpos	49
4. <i>Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM)</i>	50
5. Diseño del <i>screen</i> de los genes enriquecidos en R8 mediante RNA de interferencia (RNAi)	51
6. Estrategias para el <i>screen</i> de los genes enriquecidos en R8	51
6.1 Sistema <i>STaR (Synaptic tagging with recombination) GMR-Gal4</i>	51
6.2 Sistema <i>Rh6 GMR-Gal4</i>	52

7. Estrategia para la validación de los fenotipos mediante mutaciones génicas_____	53
8. Técnicas de análisis de DNA_____	53
8.1 Extracción de DNA genómico_____	53
8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)_____	54
9. Técnicas de análisis de RNA_____	54
9.1 Extracción de RNA en discos imaginales de ala_____	54
9.2 RT-PCR (Real-time PCR)_____	54
10. Cuantificación del fenotipo_____	55
11. Inmunofluorescencia en cerebro de adulto y pupa_____	56
12. <i>Imaging</i> _____	56

#### IV. Resultados

Capítulo 1: Contexto del proyecto y trabajo previo	
1.1 Descripción del transcriptoma de R7 y R8_____	63
1.2 Análisis de sitios de unión para Sens y Pros_____	64
1.3 Clasificación de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP_____	65
Capítulo 2: Estudio del factor de transcripción <i>Ken and Barbie</i> (Ken) en la selección de capa de R8_____	71
2.1 Pérdida de función de <i>ken</i> en R8_____	72
2.2 Ganancia de función de <i>ken</i> en R7_____	73
Capítulo 3: Estudio de los genes enriquecidos en R8 durante todo el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP) y antes de su inicio (40h DFP) mediante RNAi	
3.1 Puesta a punto del <i>screen</i> mediante RNAi: control positivo y comprobación del <i>driver GMR-Gal4</i> _____	79
3.2 Tipos de fenotipos observados en R8_____	80
3.3 Comparación de las técnicas empleadas: <i>STaR GMR-Gal4</i> y <i>Rh6 GMRGal4</i> _____	81
3.4 <i>Screen</i> de los genes enriquecidos en R8 procedentes del enfoque no sesgado mediante RNAi_____	83
3.5 Listado final de genes candidatos_____	86
Capítulo 4: Validación de los fenotipos RNAi	
4.1 Búsqueda bibliográfica de líneas mutantes e inserciones_____	93
4.2 Validación del fenotipo RNAi_____	96
4.3 Interacción genética con Sens_____	97
Capítulo 5: Estudio de la función de GstE11 en la selección de capa de R8	
5.1 Origen de las GSTs y su relación con el SN_____	103
5.2 Validación del fenotipo RNAi mediante la inserción <i>GstE11<sup>d06699</sup></i> _____	104
5.3 Validación de la especificidad del RNAi contra <i>GstE11</i> _____	106
Capítulo 6: Estudio de la función de Esn en la selección de capa de R8	
6.1 Esn funciona en las dendritas de la larva_____	113
6.2 Patrón de expresión de <i>esn</i> en R7 y R8_____	114
6.3 La pérdida de función de <i>esn</i> produce defectos en la selección de capa de R8_____	114
6.4 Interacción genética Esn-Fmi en R8_____	116

<b>V. Discusión</b>	
1. Utilización del RNAi en el <i>screen</i> genético	125
2. Resultados del <i>screen</i> mediante RNAi	127
2.1 Efectos <i>off-targets</i>	127
2.2 Variabilidad en la cualidad fenotípica observada	128
2.3 Fenotipos leves en la selección de capa de R8	128
3. Estudio de los genes candidatos	133
3.1 <i>ken</i>	133
3.2 <i>GstE11</i>	135
3.3 <i>esn (espinas)</i>	137
<b>VI. Futuros experimentos</b>	143
<b>VII. Conclusiones</b>	151
<b>VIII. Bibliografía</b>	155
<b>IX. Anexos</b>	183



# Lista de figuras

## Introducción

- Figura 1: Similitudes entre el sistema visual de moscas y vertebrados observadas por Cajal.  
Figura 2: El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.  
Figura 3: El sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*.  
Figura 4: El ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*.  
Figura 5: Organización sináptica del sistema visual adulto.  
Figura 6: Estructura del sistema visual de vertebrados y *Drosophila*.  
Figura 7: Transmisión similar de la información visual en vertebrados y moscas, durante las primeras etapas.  
Figura 8: Desarrollo del sistema visual en la etapa larvaria L3.  
Figura 9: Grupo de equivalencia R8.  
Figura 10: Superposición neural en la *lamina*.  
Figura 11: R7, R8 y las neuronas de la *lamina* proyectan de forma secuencial en la *medulla* durante la primera etapa de la selección de capa.  
Figura 12: Tipos de omatidios según la expresión de opsinas.  
Figura 13: Selección de capa de R7 y R8.  
Figura 14: Programas transcripcionales necesarios para la selección de capa de R8 y R7.

## Materiales y métodos

- Figura 15: Técnica *MARCM*.  
Figura 16: Marcaje celular específico mediante *STaR*.  
Figura 17: Estrategia para la validación del fenotipo RNAi mediante líneas mutantes e inserciones.  
Figura 18: Cuantificación de R8s con fenotipo en la selección de capa.

## Resultados

### Capítulo 1: Contexto del proyecto y trabajo previo.

- Figura 19: Genes enriquecidos en R7 y R8 en cada tiempo analizado (40h, 50h y 60h DFP).  
Figura 20: Sitios putativos de unión para Sens y/o Pros.  
Figura 21: Clasificación de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP según la categoría biológica (enfoque sesgado).  
Figura 22: Clasificación de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP según el patrón de expresión (enfoque no sesgado).

### Capítulo 2: Análisis de factores de transcripción enriquecidos en R8: Ken and Barbie (Ken).

- Figura 23: Patrón de expresión de *ken* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).  
Figura 24: Animales con pérdida de función de *ken*.  
Figura 25: Clones mutantes *ken*<sup>11035</sup> en R8.  
Figura 26: Sobreexpresión de *ken* en fotorreceptores a 88h DFP.

### Capítulo 3: Estudio de los genes enriquecidos en R8 a 40h,50h y 60h; y a 40h DFP mediante RNAi.

- Figura 27: Comprobación de la expresión del *driver GMR-Gal4*.

Figura 28: Establecimiento del control negativo del *screen* mediante RNAi.  
Figura 29: Tipos de fenotipos observados en R8.  
Figura 30: Control de temperatura del sistema *STaR GMR-Gal4*.  
Figura 31: Comparación entre el sistema *STaR GMR-Gal4* y el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.

#### **Capítulo 4: Validación de fenotipos RNAi.**

Figura 32: Clasificación funcional de los genes candidatos.  
Figura 33: Validación fenotípica de los genes candidatos mediante líneas mutantes e inserciones.  
Figura 34: Genes candidatos validados con líneas mutantes.  
Figura 35: Interacción genética de los genes candidatos con Sens.  
Figura 36: Interacción genética entre *CG14397* y Sens.

#### **Capítulo 5: Estudio de la función de *GstE11* en la selección de capa de R8.**

Figura 37: Patrón de expresión de *GstE11* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).  
Figura 38: Inserción *GstE11<sup>d06699</sup>*  
Figura 39: La inserción *GstE11<sup>d06699</sup>* afecta a *GstE11*.  
Figura 40: Validación del fenotipo RNAi de *GstE11*.  
Figura 41: Solapamiento entre la secuencia diana del RNAi de *GstE11* y la inserción *GstE11<sup>d06699</sup>*.  
Figura 42: El solapamiento entre la secuencia diana del RNAi de *GstE11* y la inserción *GstE11<sup>d06699</sup>* sería suficiente para que el RNAi degrade el RNA.  
Figura 43: El solapamiento entre la secuencia diana del RNAi de *GstE11* y la inserción *GstE11<sup>d06699</sup>* no sería suficiente para que el RNAi degrade el RNA.  
Figura 44: Especificidad del RNAi contra *GstE11*.

#### **Capítulo 6: Estudio de la función de *esn* en R8.**

Figura 45: Identificación de la unión del dominio PET-LIM de *Esn* y el tallo C de *Fmi*.  
Figura 46: Patrón de expresión de *esn* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).  
Figura 47: La pérdida de *esn* produce defectos en la selección de capa de R8.  
Figura 48: La expresión de *esn* rescata el fenotipo producido por la pérdida de *esn*.  
Figura 49: Interacción genética entre *Esn* y *Fmi* (Opción 1).  
Figura 50: Interacción genética entre *Esn* y *Fmi* (Opción 2).

### **Futuros experimentos**

Figura 51: Patrón de expresión de *Cyp31a1* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).  
Figura 52: Ruta de *Tor*.  
Figura 53: Patrón de expresión de *Thor* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

# Lista de tablas

## Materiales y métodos

Tabla 1: Líneas de *Drosophila* utilizadas.

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados.

Tabla 4: Reactivos y ciclos de una *PCR* estándar.

Tabla 5: Soluciones para inmunofluorescencia.

## Resultados

### Capítulo 3: Estudio de los genes enriquecidos en R8 a 40h,50h y 60h; y a 40h DFP mediante RNAi.

Tabla 6: Genes candidatos para repetir su estudio con el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.

Tabla 7: Conservación fenotípica en el *re-screen* mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.

Tabla 8: Genes candidatos para su validación fenotípica con mutaciones génicas.

### Capítulo 4: Validación de fenotipos RNAi.

Tabla 9: Genes candidatos con líneas mutantes viables y letales.

## Discusión

Tabla 10: Patrón de expresión de otras familias de GSTs en R7 y R8 en la selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

## Anexo

### Anexo 1: Resultados del *screen* mediante RNAi de una parte de los genes enriquecidos en R8.

Tabla 11: *Screen* mediante RNAi de los genes enriquecidos en R8 a 40h, 50h y 60h DFP.

Tabla 12: *Screen* mediante RNAi del grupo R8.

Tabla 13: *Screen* mediante RNAi del grupo específico de R8.

Tabla 14: *Screen* mediante RNAi de los genes no agrupados.

Tabla 15: *Re-screen* mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.

Tabla 16: *Re-screen* mediante el sistema *ey3.5-Gal4 + GMR-Gal4*.

### Anexo 2: Genes candidatos con función desconocida o sin líneas mutantes disponibles.

Tabla 17: Genes candidatos del *screen* mediante RNAi, con función desconocida o sin líneas mutantes disponibles.

### Anexo 3: Validación del fenotipo con líneas mutantes viables.

Tabla 18: Validación fenotípica de los genes candidatos mediante mutantes viables.

### Anexo 4: Interacción genética con Sens.

Tabla 19: Interacción genética con Sens y los genes validados.

### Anexo 5: Interacción genética Esn-Fmi Opción 2.

Tabla 20: Interacción genética entre Esn y Fmi.





# Lista de abreviaturas

- **ap**: *apterous*
- **Ato**: Atonal
- **BRP**: *Bruchpilot*
- **CA**: Célula amacrina
- **Caps**: Capricious
- **CB**: Célula bipolar
- **CCG**: Capa celular ganglionar
- **cDNA**: DNA complementario
- **Células R**: Fotorreceptores
- **CEN**: Capa externa nuclear
- **CEP**: Capa externa plexiforme
- **CIN**: Capa interna nuclear
- **CIP**: Capa interna plexiforme
- **CH**: Célula horizontal
- **ChIP**: *Chromatin immunoprecipitation*
- **CRG**: Célula retinal ganglionar
- **CRISPR**: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- **Dcr2**: Dicer2
- **Df**: Deficiencia
- **DFP**: Después de la formación de la pupa
- **DIP**: *Dpr interacting protein*
- **Dm**: Neurona intrínseca de la *medulla*
- **dNTPs**: nucleótidos
- **Dpr**: *Defective proboscis extension response*
- **DRA**: *Dorsal Rim Area*
- **dsRNA**: *double strand DNA (DNA de cadena doble)*
- **EDTA**: *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- **Esn**: espinas
- **ey**: *eyeless*
- **FLP**: Flipasa
- **Fmi**: Flamingo
- **Fc**: *Fold change*
- **Fra**: Frazzled
- **FRT**: *Flipase recombination target*
- **FT**: Factor de transcripción
- **Gal4**: *Galactose-induced gene 4*
- **GFP**: *Green fluorescence protein*
- **GMR**: *Glass multimer reporter*
- **Gogo**: *Goldel Goal*
- **GST**: Glutación S-transferasa
- **h**: horas
- **HCl**: Cloruro de hidrógeno
- **Ig**: Inmunoglobulina
- **InR**: *Insulin receptor*
- **JAK/STAT**: *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*
- **JM**: Yuxtamembrana
- **Kb**: Kilobase
- **Ken**: *Ken and Barbie*

- **LC:** Neuronas columnares
- **LT:** Neuronas *tree-like*
- **L:** *Lamina*
- **L1,L2 y L3:** primera, segunda y tercera etapa larvaria
- **LexO:** *LexA operator*
- **MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase*
- **MARCM:** *Mosaic analysis with a repressible cell marker*
- **MB:** Mushroom bodies
- **MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio
- **min.:** minutos
- **MSC:** Molécula de superficie celular
- **Myr-tdTom:** *myristoylated tandem tomato*
- **NaCl:** Cloruro de sodio
- **Ncad:** *N cadherin*
- **Net:** *Netrin*
- **NF-YC:** *Nuclear Factor YC*
- **NGL:** Núcleo lateral geniculado
- **NL:** Neuronas de la *lamina*
- **Otd:** *Orthodenticle*
- **Pb:** pares de bases
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)
- **PET:** *Prickle-Espinas-Testis*
- **PM3:** Post M3
- **PM6:** Post M6
- **Pros:** Prospero
- **REDOX:** Oxidación-Reducción
- **RFP:** *Red fluorescence protein*
- **Rh:** Rodopsina, *Rhodopsin*
- **RNAi:** RNA de interferencia
- **RNAm:** RNA mensajero
- **RNA-seq:** *RNA sequencing*
- **Ro:** *Rough*
- **Rpkm:** *Read per kilobase of a specific mRNA per million reads*
- **RT-PCR:** *Real-time PCR*
- **S6K:** Kinasa S6K
- **SB:** *Squishing buffer*
- **SB:** Solución de bloqueo
- **Seq:** Sequoia
- **Sens:** *Senseless*
- **siRNA:** *small interference RNA* (RNA de interferencia pequeño)
- **SM:** Surco morfogenético
- **SN:** Sistema nervioso
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SNP:** Sistema nervioso periférico
- **SSEM:** *Serial Section Electron Microscopy*
- **STaR:** *Synaptic Tagging with Recombination*
- **SU:** Sitios de union
- **T/C:** Colículo superior o tectum
- **TGF-β:** *Transforming growth factor beta*
- **Tm:** Transmedular
- **TRiP:** *Transgenic RNAi Project*
- **UAS:** *Upstream activation sequences*

- **UTR:** *Untranslated region*
- **VALIUM:** *Vermilion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS*
- **VDRC:** *Vienna Drosophila Resource Center*
- **VPN:** *Neurona ventral periférica*
- **WT:** *Wild type*
- **YFP:** *Yellow fluorescence protein*



# Introducción



El cerebro es el órgano más complejo del cuerpo, encargado de controlar todas las actividades vitales, siendo capaz de interpretar la información proveniente del mundo que nos rodea a través de los sentidos. La evolución del cerebro ha permitido que el ser humano tenga mayores capacidades cognitivas, lingüísticas y sociales marcando así la diferencia con el resto del reino animal, incluso con nuestros ancestros más cercanos, los grandes simios.

La pregunta que ha sido objeto de estudio durante décadas, es conocer cómo las neuronas se conectan entre sí en el cerebro. La formación de los circuitos neuronales tiene lugar durante el desarrollo embrionario y postnatal a través de mecanismos moleculares muy precisos. En estas etapas del desarrollo, los axones forman sinapsis específicas para así generar una red neuronal precisa, estereotipada y funcional que permita procesar la información del medio exterior.

Fallos generados en el establecimiento del circuito neuronal durante el desarrollo, producen graves enfermedades neurológicas con dramáticas consecuencias cognitivas, conductuales, motoras, sensoriales y malformativas. En el caso del autismo o de la esquizofrenia se han conseguido grandes avances a través de experimentos con neuronas derivadas de células madre realizados en animales modelo. Sin embargo, a pesar de conseguir una mejora de la sintomatología de los pacientes mediante esta terapia y otras, no existe una cura capaz de erradicarlas. Por ello, es de gran relevancia conocer los mecanismos implicados en la formación de conexiones neuronales funcionales, con el objetivo de reemplazar la pérdida o defectos en estas.

## 1. Estructura y formación del entramado neuronal

El patrón de organización más común observado en vertebrados e invertebrados es la estructuración en capas cerebrales. Cada capa es un compartimento a lo largo del eje horizontal del cerebro, que contiene una función particular neural y diferente conectividad, facilitando así las relaciones de entrada y salida de información entre capas. Además de las capas, las neuronas también se organizan formando columnas perpendiculares a dichas capas. Las columnas son unidades funcionales para el procesamiento de señales en la ruta neural. Por lo tanto, las neuronas llevan a cabo conexiones verticales y horizontales de forma precisa y rigurosa, facilitando el procesamiento y la propagación de los impulsos nerviosos (Huberman, Clandinin and Baier, 2010).

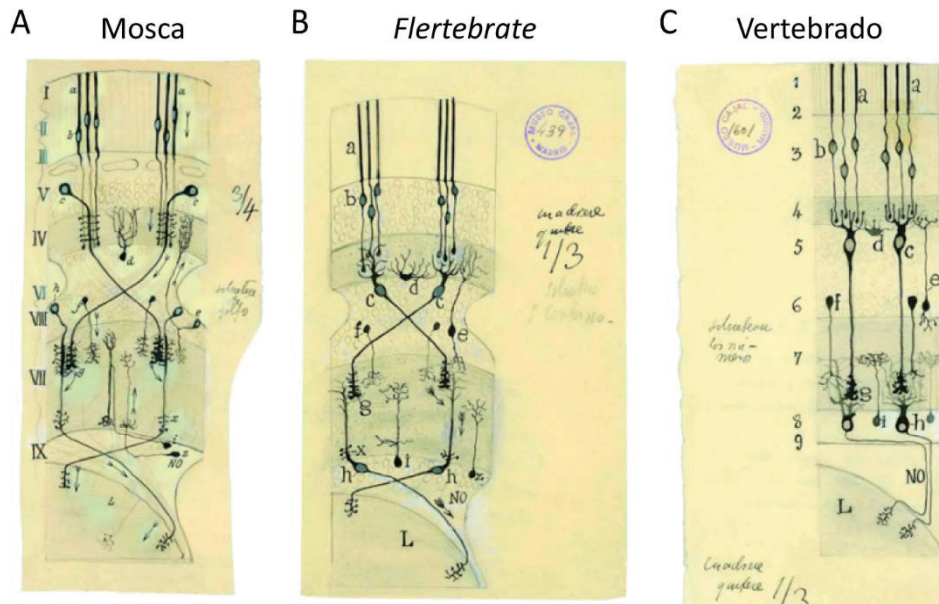
Las conexiones específicas neuronales se producen gracias a una estructura situada en el extremo de la neurita, llamada cono de crecimiento, el cual tiene que dirigirse hacia su diana específica mediante un comportamiento estereotipado. Este movimiento está guiado por señales extrínsecas que tienen la capacidad de dirigir la extensión de los procesos neuronales, pudiendo ser quimio-atractivas o quimio-repulsivas (O'Donnell, Chance and Bashaw, 2009; Chédotal and Richards, 2010; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). Otras señales de guía axonal se producen mediante receptores de superficie celular del cono de crecimiento para dirigirlo a su diana apropiada. Además, la región diana en la cual el axón presináptico conectará con el postsináptico, proporciona señales para especificar dichas conexiones (Sanes and Yamagata, 2009; Williams, de Wit and Ghosh, 2010).

La formación de las redes neuronales complejas se produce en diferentes pasos: 1) búsqueda de la trayectoria hacia la región diana, 2) llegada a un área en concreto de la región diana, 3)



4) formación de la sinapsis (sinaptogénesis). Los mecanismos que regulan la selección de las neuronas específicas por parte del cono de crecimiento para formar conexiones sinápticas son poco conocidos. Sin embargo, se conoce que inicialmente se forma un patrón de conectividad preciso y específico gracias a una regulación genética (Omar Trujillo-Cenóz, 1966; Braitenberg, 1967; Lin *et al.*, 2000). Probablemente, en la mayoría de los sistemas, las interacciones entre moléculas de superficie que median dichas conexiones están determinadas a través de programas genéticos (Clandinin and Zipursky, 2002). Además, se postula que, el entramado neuronal se refina posteriormente mediante actividad neural (Katz and Shatz, 1996).

El sistema visual de *Drosophila* ha contribuido a la identificación de mecanismos moleculares que regulan el cableado específico neuronal (Sanes and Zipursky, 2010). Fue el científico Ramón y Cajal el que inicialmente identificó las similitudes entre las retinas de vertebrados (Cajal, 1893) y posteriormente, descubrió dichas semejanzas en la organización y morfología entre el sistema visual de los insectos y la retina de vertebrados (Cajal and Sanchez, 1915) (Figura 1). Además, posteriormente se demostró que el sistema visual de *Drosophila* tenía el mismo nivel de complejidad que los dípteros superiores (Fischbach and Dittrich, 1989).



**Figura 1. Similitudes entre el sistema visual de moscas y vertebrados observadas por Cajal.** A) Partes del sistema visual de moscas: Retina (I-III), lamina (IV y VIII) y lobula (L). Los somas se localizan en su posición original. a y b, fotorreceptores; c, neurona monopolar de la lamina; h, neurona transmedular. B) En este esquema del sistema visual de insecto, Cajal colocó los núcleos celulares en las correspondientes posiciones de vertebrados, llamando a esta organización: *Flertebrate*. c, las neuronas monopolares de la lamina que son similares a las neuronas bipolares (c, en la imagen derecha); d, las células amacrinas son similares a las células horizontales (d en la imagen derecha); h, las células transmedulares que son similares a las células retinales ganglionares (b en la imagen derecha). C) Dibujo que representa los principales tipos celulares de la retina de vertebrados y sus conexiones. Cajal observó que los números arábigos se corresponden a los números romanos de A). De Cajal y Sánchez, 1915; adaptado por Meinertzhagen, 1993.

Los estudios funcionales y estructurales durante el desarrollo de *Drosophila* en las últimas décadas, han apoyado el punto de vista de Cajal (Sanes and Zipursky, 2010; Kolodkin and

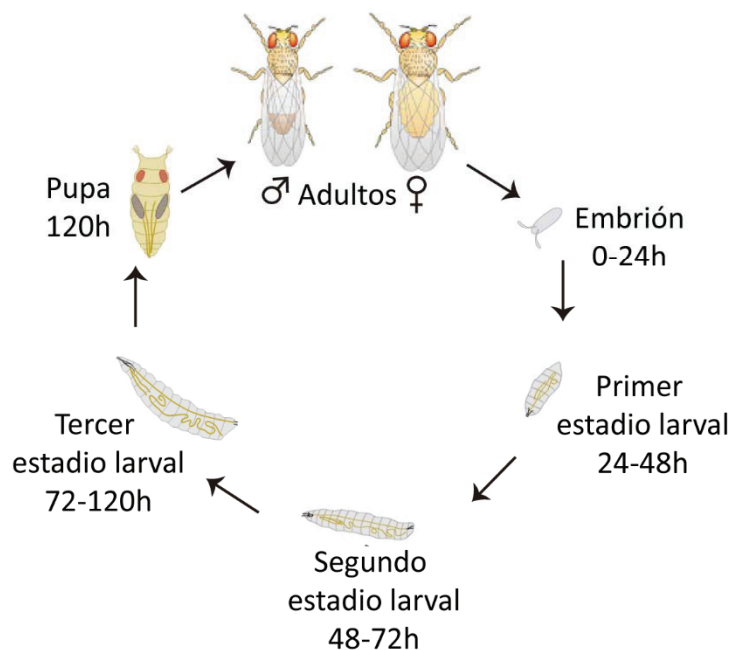
Hiesinger, 2017). Por lo que las características conservadas entre especies diferentes son, probablemente, fundamentales para así aumentar el conocimiento de un organismo a través de otros.



## 2. *Drosophila melanogaster* como animal modelo para el estudio de la conectividad específica neuronal

*Drosophila*, un organismo más simple que vertebrados, presenta una baja redundancia genética al disponer un número más reducido de genes parálogos comparado con vertebrados. Esto ha permitido a los científicos identificar fácilmente los genes principales de diferentes rutas de señalización y sus funciones. Debido a la secuenciación completa del genoma de *Drosophila* en el año 2000 (Adams *et al.*, 2000), se pudo demostrar que, sobre el 75% de genes implicados en enfermedades humanas poseían ortólogos en este organismo (Reiter *et al.*, 2001). Por lo que, *Drosophila* constituye un modelo animal altamente valioso en el campo de la investigación biomédica para el estudio de un amplio rango de procesos biológicos incluyendo la herencia genética, el desarrollo embrionario, el aprendizaje, el comportamiento y el envejecimiento (Jennings, 2011).

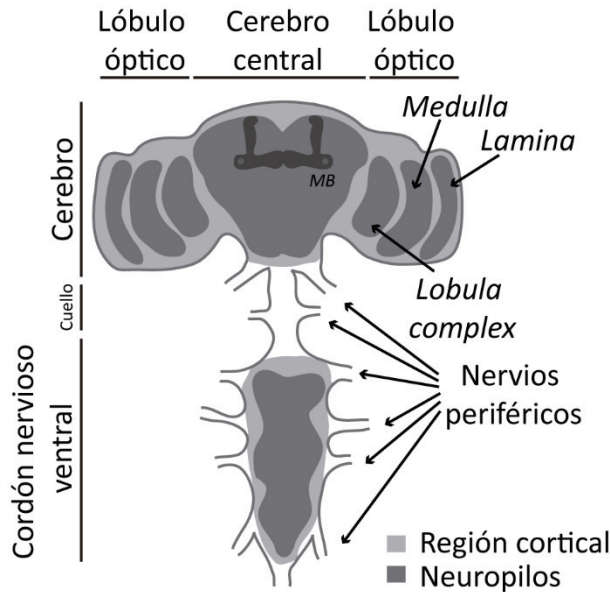
El sistema nervioso (SN) de *Drosophila*, en particular el sistema visual, se basa en patrones de conexiones complejas y considerablemente precisas, las cuales han sido descritas a nivel de neuronas individuales. Gracias a la elevada disponibilidad de herramientas genéticas para este organismo, se ha conseguido aumentar el conocimiento sobre cómo se lleva a cabo dicha conectividad neural específica en el sistema visual (Hadjieconomou, Timofeev and Salecker, 2011). Además, debido a la rapidez de su ciclo vital (Figura 2), al bajo coste económico y a su fácil manipulación, *Drosophila* representa un modelo clave que permite contestar preguntas como: ¿Cómo son capaces las neuronas de reconocer a su neurona compañera específica entre cientos de ellas? ¿Qué mecanismos moleculares son necesarios para dirigir a los axones neuronales hacia una región específica en el cerebro?



**Figura 2. El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Durante las primeras 24h comienza la embriogénesis, donde la polaridad del embrión se determina. A continuación, durante cuatro días se produce el desarrollo de la larva (L1, L2 y L3), siendo en esta etapa donde el animal crece más. Después, se da la etapa de pupa, que dura cinco días. En este estadio ocurre la metamorfosis, donde los tejidos imaginales larvarios se diferencian dando lugar a las estructuras adultas. Al final de la etapa de pupa, los adultos emergen completándose así el ciclo, comprendiendo unos diez días a 25°C.

## 2.1 El sistema nervioso de *Drosophila*

El sistema nervioso de *Drosophila* está compuesto por el sistema nervioso central (SNC): cerebro y el cordón nervioso ventral, encargados de procesar la información del exterior y controlar el movimiento de las alas, patas y abdomen. Por otra parte, el sistema nervioso periférico (SNP) lo forman neuronas sensoriales, cuya función es conectar el SNC con los diferentes órganos del animal (Figura 3).



**Figura 3. El SNC de *Drosophila melanogaster*.** El cerebro está formado por dos lóbulos ópticos y el cerebro central. Las regiones corticales (gris claro) están formadas por los núcleos de las neuronas y de las células gliales. Los axones se localizan en los neuropilos (gris oscuro): *lamina*, *medulla* y *lobula complex*. Los *mushroom bodies* (MB) se encuentran en el cerebro central. Del cerebro y del cordón nervioso ventral se proyectan nervios periféricos sensoriales para conectar con los órganos del animal. (Adaptada de Kremer *et al.*, 2017)

El SNC se desarrolla a partir del neuroectodermo bilateral, que se encuentra a ambos lados de una franja estrecha de células de la línea media ventral. Las células del neuroectodermo comienzan a delaminarse de la superficie del epitelio siguiendo un patrón fijo y se moverán hacia el interior del embrión para formar células precursoras neuronales llamadas neuroblastos. Cada neuroblasto expresará una combinación de genes que dará lugar a las familias de neuronas y células gliales.

En el SNC, los núcleos de las neuronas se localizan en regiones corticales, mientras que las conexiones sinápticas se producen en los neuropilos, estructuras que contienen un conjunto de terminales axónicas, dendritas y células gliales. Dichos neuropilos están conectados mediante extensiones axonales (Strausfeld, 1976; Meinertzhagen and Hansen, 1993) (Figura 3).

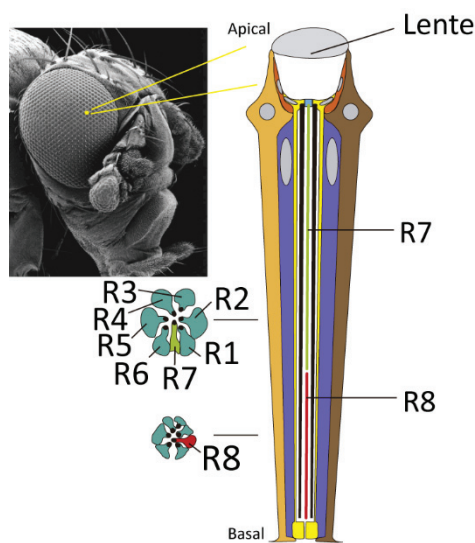
El neuropilo encargado del aprendizaje y la memoria se denomina *mushroom bodies*, situado en el cerebro central y compuesto por diferentes tipos de neuronas, principalmente encargadas del aprendizaje olfativo (Figura 3) (Gregg Roman *et al.*, 2001; Waddell and Quinn, 2001). Los nervios periféricos conectan los órganos sensoriales y la musculatura con el SNC.

## 2.2 El sistema visual de *Drosophila*

El sistema visual está formado alrededor de 150.000 neuronas y células gliales (Chiang *et al.*, 2011), encargadas de que la información visual detectada por la retina se procese en los lóbulos ópticos del cerebro (Figura 2). Los lóbulos ópticos son los principales centros de procesamiento y se encargan de extraer importantes características del mundo visual como la forma, el color, el movimiento y la luz polarizada. Esta información se transmite al cerebro central.

### 2.2.1 El ojo compuesto

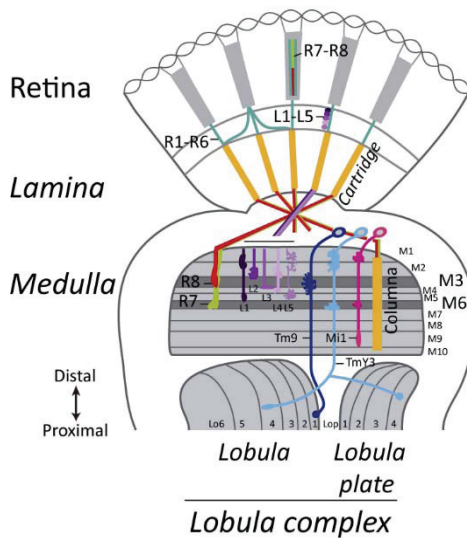
El ojo compuesto de *Drosophila* está formado por, aproximadamente, 750 unidades llamadas omatidios formando un perfecto entramado (Figura 4).



**Figura 4.** El ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*. En la imagen izquierda se observa el ojo adulto de *Drosophila*, formado por 750 unidades llamadas omatidios (amarillo). La imagen derecha ilustra la estructura apico-basal de un omatidio. Este está formado por una lente en la parte más apical y por un conjunto de células, entre ellas los fotorreceptores (células R): R1-R8. R1-R6, azul; R7, verde y R8, rojo.

Cada omatidio está compuesto por 8 fotorreceptores o células R (R1-R8), los cuales se dividen en tres tipos: R1-R6, expresan la rodopsina *Rh1* y están implicados en detectar el movimiento; R7 expresa las rodopsinas sensibles a la luz ultravioleta, *Rh3* y *Rh4*; y R8 que expresa las rodopsinas sensibles a la luz azul, *Rh5*, y luz verde, *Rh6* (Morante, Desplan and Celik, 2007).

Las células R presentan sus somas en la retina, mientras que los axones se proyectan hacia diferentes neuropilos del lóbulo óptico. Los neuropilos en los que se divide el cerebro son: *lamina*, *medulla*, *lobula* y *lobula plate* (Figura 5).



**Figura 5. Organización sináptica del sistema visual adulto.** La imagen ilustra los circuitos neuronales necesarios para la transmisión de la información desde la retina hasta el cerebro. El sistema visual está formado por la retina (ojo compuesto) y tres neuropilos: *lamina*, *medulla* y *lobula complex* (*lobula* y *lobula plate*). Las células R externas R1-R6 proyectan sus axones desde la retina hasta la *lamina*, donde conectan con neuronas de la *lamina* en los *cartridges*. Las células R internas R7 y R8 se proyectan hacia la *lamina* para alcanzar las capas M6 y M3 de la *medulla*, respectivamente. Ambas células conectan con R1-R6 y neuronas de la *lamina* L3-L5 en las columnas de la *medulla*. Las neuronas de la *lamina* L1-L5 forman arborizaciones en M1-M5. La *medulla* es enervada por las neuronas transmedulares (Tm) que conectan la *medulla* y la *lobula*, y por neuronas TmY, que conectan la *medulla* con las capas Lo1-6 en la *lobula* y con Lop1-4 en la *lobula plate*. Las neuronas intrínsecas de la *medulla* (Mi) conectan la *medulla* distal y proximal. (Adaptada de Hadjieconomou, Timofeev and Salecker, 2011).

La *lobula* y la *lobula plate* forman el *lobula complex*, donde la información visual ya procesada, se transmitirá a los centros superiores cerebrales a través de diferentes rutas (Mu, Ito, Bacon, & Strausfeld, 2012; Otsuna & Kei, 2006; Otsuna, Shinomiya, & Ito, 2014; Panser et al., 2016; Wu et al., 2016).

### 2.2.2 Lamina

Los fotorreceptores R1-R6 detectan el movimiento e inicialmente se proyectan hacia la *lamina* donde enervan diferentes columnas llamadas *cartridges* de forma precisa, junto con neuronas de la *lamina* monopolares L1-L5 e interneuronas (Meinertzhagen and Sorra, 2001). Las neuronas monopolares L1-L5, además de contactar en los *cartridges*, se proyectan hacia la *medulla* para mantener el mapa retinotópico. Otro tipo de neuronas de la *lamina* son las células amacrinas, encargadas de conectar varios *cartridges* entre sí (Fischbach and Dittrich, 1989; Hofbauer and Campos-Ortega, 1990; Tuthill et al., 2013). Cada *cartridge* recoge la información visual de un punto en el espacio, por lo que el conjunto de estos están organizados para recrear la representación topográfica del espacio visual (Braitenberg, 1967; Kirschfeld, 1967).

### 2.2.3 Medulla

A continuación de la *lamina* se encuentra la *medulla*, la cual está dividida en 10 capas paralelas, que son M1-M10, y en columnas perpendiculares a las capas (Fischbach and Dittrich, 1989). La *medulla* es el componente principal del lóbulo óptico, en el cual se procesan diferentes tipos de información visual, como el movimiento, la forma y el color.

La *medulla* distal se extiende de la capa M1 a la M6 y recibe la información de R7 (M6) y R8 (M3) (Fischbach and Dittrich, 1989; Morante and Desplan, 2008), mientras que la *medulla* proximal, comprendiendo desde la M7 a la capa M10, recibe información de la *medulla* distal y además computa información visual adicional.

R8 y R7, encargados de detectar el color, proyectan sus axones a las capas M3 y M6, respectivamente. Cada columna es enervada por las neuronas de la *lamina* L1-L5, 35 neuronas de la *medulla* y numerosas neuronas superiores ascendentes, formando ramificaciones en cada capa o en varias de ellas, siguiendo un patrón determinado (Fischbach and Dittrich, 1989; Morante and Desplan, 2008). Este neuropilo también alberga neuronas interneuronas y



tangenciales. Las conexiones entre interneuronas se limitan en la *medulla*, siendo necesarias para el procesamiento de la información en cada capa y entre ellas. Por otra parte, las dos clases de neuronas tangenciales proyectan sus axones al *lobula complex*: Tm hacia la *lobula* y TmY hacia la *lobula* y *lobula plate*. La tinción de Golgi reveló la existencia de 12, 26 y 13 tipos diferentes de neuronas intrínsecas de la *medulla*, neuronas Tm y TmY, respectivamente (Fischbach and Dittrich, 1989). Sin embargo, posteriormente se logró identificar un mayor número de tipos de celulares (Morante and Desplan, 2008).

Las columnas de la *medulla* están asociadas a los *cartridges* de la *lamina*, transmitiéndose así la información proveniente de cada punto en el espacio, cubriendo todo el campo visual debido a su organización repetitiva de los 750 *cartridges* (*lamina*) y columnas (*medulla*).

#### 2.2.4 *Lobula complex: Lobula plate y lobula*

La *lobula* está dividida en 6 capas perpendiculares a las columnas resultantes de la información proveniente de la *medulla* (Fischbach and Dittrich, 1989). Las neuronas que forman este neuropilo tienen sus somas entre el cerebro central y la *lobula*, mientras que sus proyecciones convergen en el cuello de la *lobula* formando una única fibra que conecta el cerebro central con la *lobula* (Otsuna and Kei, 2006). Las neuronas de la *lobula* pueden ser de dos tipos: neuronas columnares (LC), que reciben la información visual de 8 a 9 omatidios (Douglass and Strausfeld, 2003; Otsuna and Kei, 2006; Mu *et al.*, 2012), y neuronas tangenciales y *tree-like* (LT), que reciben la información de campos visuales amplios, similares a las neuronas tangenciales de la *medulla* (Otsuna and Kei, 2006).

La *lobula plate* se encarga de procesar el movimiento y está formado por 4 capas que contienen dendritas extremadamente sensibles al movimiento a lo largo de una de las direcciones cardinales (Fischbach and Dittrich, 1989; Maisak *et al.*, 2013). Los dos tipos de interneuronas de la *lobula plate*, T4 y T5, se subdividen en 4 clases formando dendritas en una de las 4 capas.

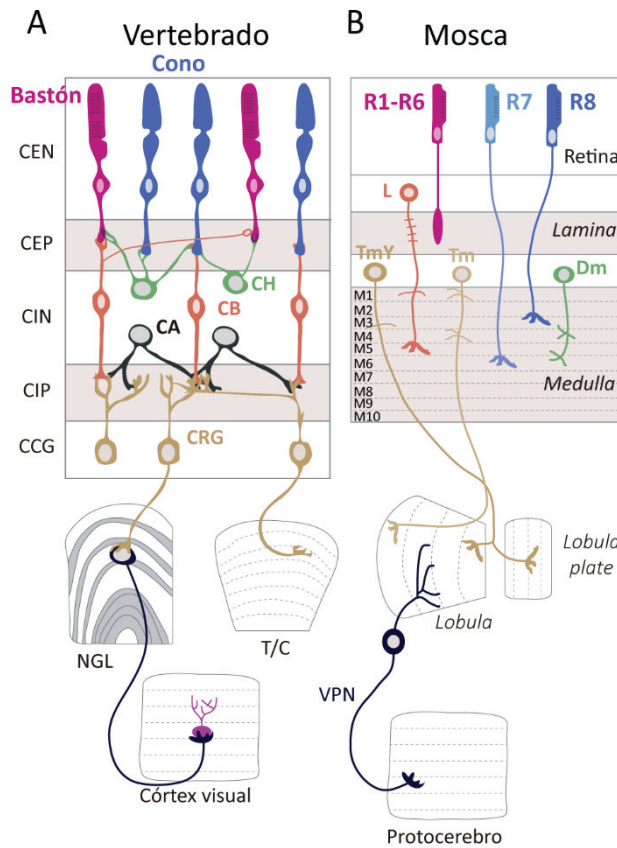
Las neuronas tangenciales de este neuropilo reciben la información de las neuronas T4 y T5, y transmiten la información visual de cada dirección al cerebro central (Borst and Haag, 2002; Silies *et al.*, 2013; Behnia and Desplan, 2015).

### 2.3 Similitudes entre el sistema visual de *Drosophila* y de vertebrados

La organización en capas del sistema visual de *Drosophila* está presente en la corteza cerebral de vertebrados. Este hecho hace posible que haya una gran cantidad de neuronas distribuidas a lo largo de varias capas replegadas sobre sí mismas, lo que aporta grandes ventajas para el rendimiento mental. Por lo que la conservación estructural desde organismos simples a superiores presenta un gran sentido evolutivo.

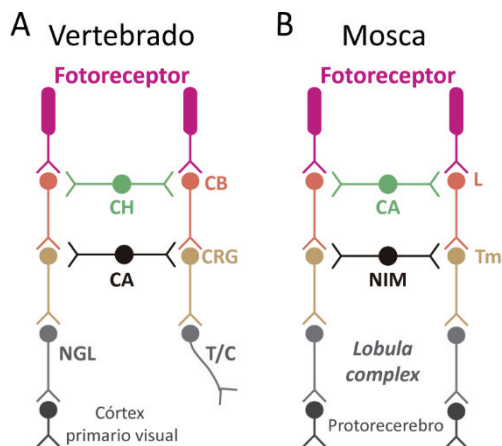
En cuanto a la organización precisa y estereotipada necesaria para la formación del mapa retinotópico, también se encuentra conservada en la retina de vertebrados. En ambos organismos, las primeras capas del sistema visual son compactas y físicamente accesibles, haciendo posible la identificación de los distintos tipos celulares según su posición (Figura 6).





**Figura 6. Estructura del sistema visual de vertebrados y *Drosophila*.** A) El sistema visual de mamíferos está compuesto por la retina, cuyas capas son: capa externa nuclear (CEN), capa externa plexiforme (CEP), capa interna nuclear (CIN), capa interna plexiforme (CIP) y capa celular ganglionar (CCG). Además, también lo componen el núcleo lateral geniculado (NGL), el colículo superior o tectum (T/C) y el córtex visual primario. Células: cono, bastón, célula horizontal (CH), célula bipolar (CB), célula amacrina (CA) y célula retinal ganglionar (CRG). B) El sistema visual de *Drosophila* está formado por la retina, lamina, medulla, lobula complex (lobula y lobula plate) y el protocerebro. Células: R1-R6, R7, R8, neurona de la lamina (L), neuronas trans-medulares (TmY y Tm), neurona intrínseca de la medulla (Dm) y neurona ventral periférica (VPN). (Adaptada de Sanes and Zipursky, 2010).

Tanto en vertebrados como en *Drosophila*, las neuronas se ordenan y se conectan en capas paralelas, presentando un espaciado regular dentro de cada capa. Además, en la retina de vertebrados se establecen conexiones radiales perpendiculares a las capas. La transmisión de la información visual en etapas tempranas, se produce de forma similar en los dos sistemas (Figura 7).



**Figura 7. Transmisión similar de la información visual en vertebrados y moscas durante las primeras etapas.** A) Células y partes implicadas en la transmisión de la información visual en vertebrados: fotorreceptor, célula horizontal (CH), célula bipolar (CB), célula amacrina (CA), célula retinal ganglionar (CRG), núcleo lateral geniculado (NGL), el colículo superior o tectum (T/C) y el córtex visual primario. A) En *Drosophila* la información visual se transmite a través de: fotorreceptores, neuronas de la lamina (L), células amacrinas (CA), neuronas trans-medulares (Tm), neurona intrínseca de la medulla (NIM), lobula complex y el protocerebro. (Adaptada de Sanes and Zipursky, 2010).

En ambos organismos cada parte del mundo visual se procesa de múltiples maneras, recopilando así la información del color, forma y movimiento de los objetos observados a través de la visión. Este procesamiento se repite para cada porción del campo visual. La interpretación global del campo visual se logra gracias a la organización neuronal en capas y a las conexiones radiales. Es por esta razón, por la que este tipo de estructura se ha conservado durante millones de años.

Debido a la similitud estructural y funcional observada entre la retina de vertebrados y el sistema visual de *Drosophila*, se podría especular que, del mismo modo, compartirían las estrategias necesarias para el ensamblaje de este circuito neuronal. De hecho, estudios recientes han demostrado que no solo comparten estrategias, sino que también presentan moléculas similares implicadas en el desarrollo del sistema visual (Pichaud and Desplan, 2002; Harada, T.; Harada, Parada, 2007; Ohsawa and Kageyama, 2008).

Las similitudes observadas entre el sistema visual de vertebrados y de *Drosophila* se resumen en (Sanes and Zipursky, 2010):

- Número pequeño de tipos neurales: 5 en la retina de vertebrados y 6 en la retina, *lamina* y *medulla* de *Drosophila*. Estas células se dividen en numerosos subtipos de neuronas.
- Un único terminal sináptico conecta con múltiples neuronas postsinápticas.
- Organización en capas celulares con una distribución regular de neuronas en cada capa.
- Organización de neuronas de forma ordenada en cada nivel con las del siguiente nivel.
- La formación de sinapsis se produce en capas exclusivamente ocupadas por los axones presinápticos y postsinápticos (capas plexiformes interna y externa, y *medulla*).

Gracias a las características estructurales y funcionales compartidas, y a la gran disponibilidad de herramientas genéticas y genómicas que presenta *Drosophila*, es posible aumentar el conocimiento de un sistema a través de otro.

## 2.4 Grandes avances en la conectividad de los circuitos neuronales gracias a *Drosophila*

*Drosophila* cuenta con una gran cantidad de recursos genéticos que proporcionan un mayor entendimiento de los circuitos neuronales. El conectoma de *Drosophila* se define como todas las conexiones existentes entre los diferentes tipos celulares del SNC. A baja resolución, se refiere a la conexión entre los diferentes neuropilos definida por rutas neuronales específicas, mientras que a alta resolución se entiende como conectoma, a todas las conexiones sinápticas existentes a nivel de cada neurona.

A partir del 2013 se describió el conectoma en el cerebro de *Drosophila* a nivel de las conexiones entre los diferentes neuropilos (Shih and Chiang, 2011). Sin embargo, a nivel del conectoma celular se logró construir, de forma parcial, en los *cartridges* de la *lamina* (Meinertzhagen and O'Neil, 1991; Rivera-Alba *et al.*, 2011) y en las columnas de la *medulla* (Takemura *et al.*, 2013). Aunque el conectoma celular se ha construido parcialmente, *Drosophila* constituye un modelo clave gracias al cual se han conseguido grandes avances en la computación de las funciones neuronales, desvelando así, el entramado neuronal del cerebro.

*Janelia Research Campus* ha contribuido a grandes avances en el campo de la neurobiología al proporcionar colecciones de *drivers* de Gal4 específicos de diferentes tipos celulares, haciendo posible la caracterización de la morfología neuronal mediante estudios de marcaje estocásticos (Pfeiffer *et al.*, 2008; Jenett *et al.*, 2012). Esta técnica ha ayudado a desvelar nuevas conexiones neuronales contribuyendo a la construcción final del conectoma celular.

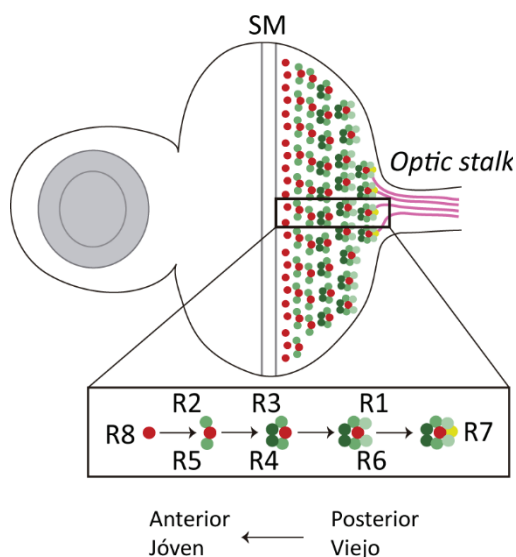
(Pfeiffer *et al.*, 2008; Jenett *et al.*, 2012). Esta técnica ha ayudado a desvelar nuevas conexiones neuronales contribuyendo a la construcción final del conectoma celular.

Por todo ello, *Drosophila* es un buen modelo animal para desvelar los mecanismos mediante los cuales se establecen las conexiones neuronales específicas, necesarias para el ensamblaje de las redes neuronales en el cerebro de vertebrados.

### 3. Desarrollo del sistema visual de *Drosophila*

#### 3.1 Diferenciación de los fotorreceptores. Formación del mapa retinotópico

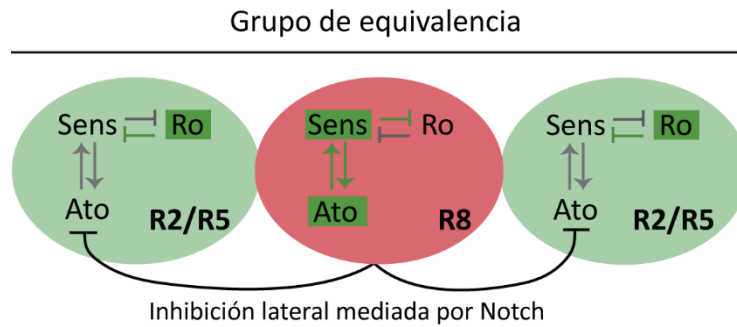
El establecimiento del mapa retinotópico del sistema visual ocurre en la etapa larvaria durante el desarrollo del disco imaginal de ojo, estructura que dará lugar al ojo adulto. Los fotorreceptores se diferencian en esta estructura larvaria y enervarán el lóbulo óptico del cerebro larvario siguiendo un patrón definido temporal y espacial (Petrovic and Hummel, 2008; Roignant and Treisman, 2009; Kulkarni *et al.*, 2016). Esto se consigue gracias al reclutamiento secuencial de las filas individuales de omatidios mediante una honda de diferenciación, producida por la formación del surco morfogenético (SM), cuyo comienzo es la parte posterior del disco imaginal de ojo. Como consecuencia, los fotorreceptores del mismo omatidio extienden sus axones en fascículos individuales de forma secuencial según el orden de diferenciación (Figura 8).



**Figura 8. Desarrollo del sistema visual en la etapa larvaria L3.**

Los fotorreceptores comienzan a diferenciarse de forma secuencial con el paso del SM en el disco imaginal de ojo, desplazándose de posterior a anterior. El SM produce la diferenciación de la primera fila de fotorreceptores, donde el R8 es el primero en hacerlo. A continuación, este recluta al resto de fotorreceptores secuencialmente. Primeramente recluta al par R2/R5, después al par R3/R5, al R1/R6 y por último al R7. Conforme las células R se van diferenciando, proyectan sus axones hacia el cerebro larvario a través del *optic stalk*.

La formación del SM está dirigida por la actividad de Decapentaplegic y Hedgehog, mientras que la progresión depende de Hedgehog (Pignoni and Zipursky, 1997; Curtiss and Mlodzik, 2000). Hedgehog, además, activa la expresión del gen proneural *atonal* (*ato*) en todas las células por donde pasa el SM (Domínguez and Hafen, 1997). A continuación, la interacción Delta-Notch regula un proceso de inhibición lateral limitando la expresión de Atonal (Ato) a un grupo de tres células (grupo de equivalencia) (Figura 9) (Baker, Yu and Han, 1996). En este conjunto de células Ato induce la expresión de Senseless (Sens), el cual es un factor de transcripción (FT) implicado en la diferenciación del R8 (Xie *et al.*, 2007). Sin embargo, solo una de las tres células del grupo de equivalencia será un R8, lo que se consigue gracias a la expresión en las otras dos células de Rough (Ro), que inhibe a Sens impidiendo la determinación a R8 (Pepple *et al.*, 2008). La célula restante sí expresará Sens, por lo tanto, quedará determinada como precursor de R8, el primer fotorreceptor en diferenciarse (Jarman *et al.*, 1994, 1995; Hsiung and Moses, 2002).



**Figura 9. Grupo de equivalencia R8.** Los elementos clave en la elección de la diferenciación hacia R2 o R5, o hacia R8 dependen de una retroalimentación positiva de: una activación mutua de Sens y Ato, y un antagonismo mutuo entre Sens y Ro. La expresión de Ato se refina a una única célula del grupo de equivalencia a través de la inhibición lateral por Notch.

R8 actúa como célula fundadora marcando el inicio de la diferenciación del resto de fotorreceptores, a través de la activación reiterada de la vía Ras/MAPK (Freeman, 1996, 1997; Kumar *et al.*, 1998). El R8 induce la activación de la vía Ras1 en el par de células indeterminadas de su grupo de equivalencia, especificando así, los fotorreceptores R2/R5. Después, se especifican el par R3/R4 y, tras una nueva entrada en mitosis de células indeterminadas, el par R1/R6. Finalmente, se especifica el R7, las células cono y las células pigmentarias. Por lo tanto, el R8 tiene un papel muy importante en la retinotopia, ya que es el primer fotorreceptor en enervar el lóbulo óptico y actúa como guía para el resto de fotorreceptores en el omatidio.

Conforme el proceso de diferenciación avanza, los axones de cada omatidio se proyectan hacia el lóbulo óptico del cerebro larvario a través del *optic stalk*. A medida que los axones llegan al lóbulo óptico deben preservar su información posicional original para distribuirse de forma uniforme y reconocer a sus dianas a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral. Importantes estudios genéticos, han hecho posible la identificación de moléculas necesarias para el crecimiento del cono axonal, la búsqueda de dianas específicas y para el posicionamiento topográfico de los fotorreceptores en la *lamina* y la *medulla* (Mast *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2008). Un ejemplo son la cadherina no clásica Flamingo (Fmi) (K. Senti *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003) y la proteína transmembrana *Golden Goal* (Gogo) (Tomasi *et al.*, 2008), que se encargan de mediar interacciones entre los axones de R8 conforme abandonan el *optic stalk*. En este proceso, los R8s se van separando para dirigirse hacia la *lamina* y posteriormente hacia la *medulla* manteniendo la organización.

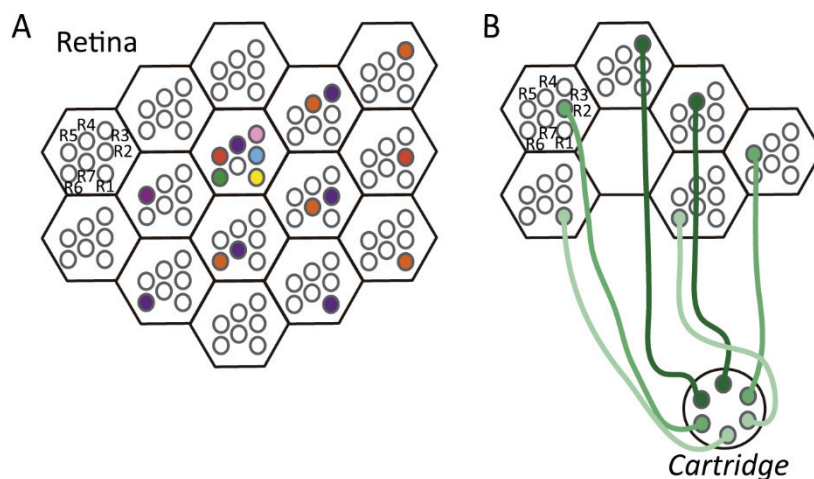
La enervación de R1-R6 en la *lamina* ocurre gracias a interacciones con células de la glía. Esto indica que dichas células juegan un papel crucial en regular la trayectoria de R1-R6 actuando como dianas intermedias y proporcionando señales de parada aún desconocidas (Poeck *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 2002; Chotard, Leung and Salecker, 2005), esenciales para la formación de los *cartridges* en la *lamina*. Además, la glía establece la formación de fronteras entre los ganglios precursores y está implicada en la guía axonal de los fotorreceptores y de otras neuronas en la *medulla* (Tayler, 2004; Fan *et al.*, 2005; Pappu *et al.*, 2011).

Aunque estudios recientes han desvelado cómo ocurre la neurogénesis y la diferenciación neural en el lóbulo óptico (Suzuki and Sato, 2014; Neriec and Desplan, 2016), poco se conoce sobre los mecanismos necesarios para el ensamblaje de las columnas de la *medulla* con R7 y R8, y la extensión axonal de las neuronas de la *lamina* hacia la *medulla*. La organización extremadamente determinada y ordenada de los fotorreceptores, *cartridges* y columnas, hace que la representación topográfica de la información exterior se mantenga en el lóbulo óptico.

### 3.2 Desarrollo de la *lamina*: Superposición neural

A medida que los fotorreceptores llegan al lóbulo óptico se produce la diferenciación de las neuronas de la *lamina*, contribuyendo a la formación de este neuropilo. Este proceso ocurre a través de la secreción, por parte de los fotorreceptores, de Hedgehog y Spitz (Huang and Kunes, 1996; Huang *et al.*, 1998; Chotard, Leung and Salecker, 2005; Umetsu, 2006) junto con una ruta transcripcional específica (Pineiro, Lopes and Casares, 2014). Las neuronas de la *lamina*, ya diferenciadas, se asociarán con R1-R6 para formar así, los *cartridges* por medio de receptores de adhesión celular (Umetsu, 2006; Sugie *et al.*, 2010).

Debido a la curvatura del ojo de *Drosophila*, los fotorreceptores tienen diferentes ejes ópticos que crean un patrón de conectividad complejo en el interior de la *lamina*. Como consecuencia, seis omatidios colindantes contendrán un tipo de fotorreceptor que compartirá la misma orientación “viendo” el mismo punto en el espacio (Kirschfeld, 1967; Clandinin and Zipursky, 2000) (Figura 10A). R7 y R8 comparten el mismo eje, ya que se encuentran posicionados uno encima del otro en el omatidio transmitiendo la información visual del mismo punto en el espacio. Sin embargo, en el caso de R1-R6, sus ejes ópticos difieren, no “viendo” el mismo punto en el espacio.



**Figura 10. Superposición neural en la *lamina*.** A) Seis fotorreceptores distintos de diferentes omatidios ‘ven’ el mismo punto en el espacio. Esta imagen representa un esquema de una sección tangencial de la superficie de la retina adulta. Cada pentágono indica un omatidio, donde, por ejemplo, los tipos de fotorreceptores naranja y morado de cada omatidio ‘ven’ el mismo punto en el espacio. Los fotorreceptores R1-R7 están representados en cada omatidio, R8 se localiza justo debajo de R7. R1-R6 y R7-R8 del mismo omatidio detectan diferentes puntos en el espacio y conectan con diferentes dianas en el cerebro. Las células R que ‘ven’ el mismo punto en el espacio se distribuyen en la retina y convergen en dianas comunes. (Adaptada de Clandinin and Zipursky, 2002). B) Superposición neural de R1-R6. Los fotorreceptores externos R1-R6 provenientes de diferentes omatidios recogen la información visual del mismo punto en el espacio y proyectan sus axones en el mismo *cartridge* en la *lamina*. (Adaptada de Wernet and Desplan, 2015).

Durante el comienzo del desarrollo de la pupa, R1-R6 de diferentes omatidios se concentran en el mismo *cartridge* al proyectarse lateralmente desde su posición original (Figura 10B),



conectando con neuronas de la *lamina*. Este proceso se conoce como superposición neural, el cual asegura la transmisión de la misma información visual a las mismas neuronas diana en cada *cartridge* en la fase adulta.

Estudios previos han deducido que, posiblemente, son mecanismos simples durante el desarrollo los que controlan la organización de los axones en la superposición neural (Meinertzhagen, 1972; Meinertzhagen and Hansen, 1993; Clandinin and Zipursky, 2000). Sin embargo, recientemente, un estudio basado en la observación mediante *time-lapse* a alta resolución de R1-R6 ha mostrado la existencia de una serie de normas que especifican la selección de sus neuronas diana (Langen *et al.*, 2015). De esta manera, estas normas ayudan al establecimiento de los mecanismos moleculares previamente descritos, por ejemplo instruyendo la extensión de R1-R6 en la *lamina* a través de interacciones mediadas por cadherinas (Chen and Clandinin, 2008; Schwabe, Neuert and Clandinin, 2013; Schwabe *et al.*, 2014).

La conectividad entre los *cartridges* es esencial para la transmisión de la información de todo el campo visual. Son las neuronas de la lámina L4 las que regulan dicha conexión cubriendo toda la retina, siendo únicas entre el resto de neuronas de la *lamina* L1-L5. En el caso de L1-L3, conectan directamente con R1-R6, y en concreto L2 establece contactos sinápticos con L4, conectando así indirectamente con R1-R6.

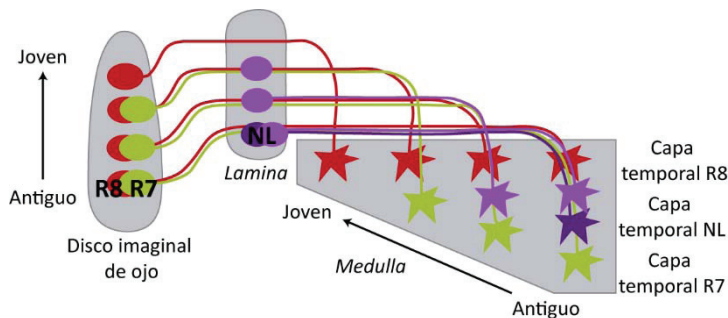
### 3.3 Desarrollo de la *medulla*

En la *medulla* larvaria (primordio de la *medulla*) los neuroblastos situados en la superficie cortical son la fuente principal de las neuronas que la forman. Un único neuroblasto dará lugar a un gran número de neuronas de la *medulla*, que migrarán radial y linealmente hacia el centro de este neuropilo en formación gracias a la expresión de FTs conservados (Suzuki and Sato, 2014). Estos FT determinan las zonas concéntricas de la *medulla* durante la etapa larvaria, produciendo una estructura organizada. Sin embargo, durante la etapa pupal, esta organización se perderá debido a la migración radial de los somas de las neuronas de la *medulla*, donde cada una de ellas tiene un patrón estereotipado migratorio (Suzuki and Sato, 2014).

El estudio de R7, R8 y neuronas de la *lamina* ha proporcionado un mayor conocimiento sobre la formación de las columnas y capas de la *medulla*, ocurriendo en paralelo a los *cartridges* de la *lamina*. La restricción de los procesos neuronales a una única columna constituye un aspecto esencial en la formación de las columnas. Actualmente, los mecanismos que regulan la restricción columnar se basan en la señalización autocrina intrínseca, en la señalización anterógrada, en las interacciones homotípicas entre neuronas del mismo tipo de columnas colindantes, y heterotípicas entre neuronas diferentes de la misma columna. Los axones de R7, a través de la ruta TGF- $\beta$ , evitan invadir las columnas colindantes, probablemente, mediante el bloqueo de la motilidad de los conos de crecimiento (Ting *et al.*, 2007). Además, la existencia de interacciones repulsivas entre R7s vecinos provoca que los R7s permanezcan en su columna (Ferguson *et al.*, 2009). Igualmente, las interacciones de adhesión juegan un papel importante en la restricción de las columnas (Nern, Zhu and Zipursky, 2008).

La señalización anterógrada en las neuronas aferentes también tiene una función importante en la formación de la región diana en la *medulla* (Ting *et al.*, 2014). Además del papel autocrino de la ruta TGF- $\beta$ /*Activin* en R7s para la restricción en las columnas, también posee una función en R8s. *Activin* es secretada por R8s para regular las dendritas de sus neuronas postsinápticas Tm20 limitándolas a una única columna. En R7s esta ruta también moldea las dendritas de las neuronas amacrinas Tm8, las cuales reciben información de algunos R7s.

La formación de las capas ocurre de forma secuencial a medida que los axones enervan la *medulla*, siendo un reflejo del desarrollo del disco imaginal de ojo y de la *lamina*. Durante el 17% de la formación de la pupa hay un gradiente de conos de crecimiento de R7, R8 y L1-L5 a lo largo del eje antero-posterior de la *medulla*, donde los más jóvenes se proyectarán en la región anterior y los más antiguos se habrán extendido totalmente en la región posterior (Figura 11) (C. Y. Ting *et al.*, 2005).



**Figura 11. R7, R8 y las neuronas de la lamina proyectan de forma secuencial en la medulla durante la primera etapa de la selección de capa.** Esquema en el que se representa cómo los axones R7, R8 y las neuronas de la lamina (NL) enervan diferentes capas de la medulla según su orden de diferenciación para alcanzar sus capas temporales. (Adaptada de C. Y. Ting *et al.*, 2005).

Conforme avanza el desarrollo de la pupa, R7 y R8 seleccionan sus capas finales donde conectarán con sus dianas específicas. Este proceso de selección de capa se produce en dos etapas (C. Y. Ting *et al.*, 2005). El control transcripcional juega un papel esencial tanto en la primera etapa de la selección de capa, como en la segunda, controlando la expresión de moléculas de superficie implicadas en el proceso (Morey *et al.*, 2008; Petrovic and Hummel, 2008; Mencarelli and Pichaud, 2015). Actualmente se desconoce cómo los programas transcripcionales producen la regulación de dichas moléculas. Esta parte será explicada en detalle posteriormente.

El desarrollo asíncrono de la *medulla* indica que las interacciones entre neuronas que se producen de forma temprana, se establecen en un entorno más simple que el sugerido en la etapa adulta. Asimismo, la formación secuencial de este neuropilo facilita la formación de la sinapsis entre las neuronas aferentes y sus dianas específicas, al disponer de un número menor de neuronas candidatas con las que establecer dichas conexiones.

## 3.4 Sinapsis

### 3.4.1 Técnicas para visualizar sinapsis

Gracias a estudios mediante *Serial Section Electron Microscopy (SSEM)* se ha conseguido determinar los mapas de conectividad sináptica en el sistema visual adulto (Meinertzhagen and O'Neil, 1991; Takemura, Lu and Meinertzhagen, 2008; Rivera-Alba *et al.*, 2011; Takemura *et al.*, 2013, 2015). De esta manera, se han aumentado los conocimientos de las dianas sinápticas para cada neurona, el número de sinapsis en cada capa, sus posiciones y su direccionalidad. Sin embargo, las limitaciones técnicas que presentaba la *SSEM* incitó el desarrollo de otras técnicas que permitieran la detección de defectos en las conexiones sinápticas.

Debido al elevado número de tipos celulares y a la gran densidad de procesos neuronales en los neuropilos, algunas de las técnicas nuevas se basaron en poder visualizar las sinapsis en grupos



de neuronas. Uno de los métodos empleados consiste en visualizar estructuras pre y postsinápticas gracias al marcaje de proteínas sinápticas. La proteína sináptica *Bruchpilot* (BRP) (Kittel *et al.*, 2006; Wagh *et al.*, 2006; Fouquet *et al.*, 2009) está presente en las zonas presinápticas más activas en el sistema visual de *Drosophila* y en el cerebro central (Yasuyama, Meinertzhagen and Schürmann, 2003; Prokop and Meinertzhagen, 2006; Butcher *et al.*, 2012). Por lo tanto, mediante microscopía confocal, con esta proteína se detecta, a través de un anticuerpo anti-BRP, cada zona activa presináptica (Fouquet *et al.*, 2009; Hamanaka and Meinertzhagen, 2010). Además, su expresión endógena a través de *Synaptic Tagging with Recombination* (STaR) (Chen *et al.*, 2014), también ha hecho posible identificar el mismo número de sinápsis que el observado mediante microscopía electrónica, así como la distribución espacial de los sitios presinápticos, proporcionando un perfil sináptico (Chen *et al.*, 2014; Sugie *et al.*, 2015). Consecuentemente, esta técnica ha permitido aumentar los conocimientos sobre la formación de la sinapsis y los mecanismos moleculares que regulan el ensamblaje y/o la estabilidad de las sinapsis en el sistema visual (Chen *et al.*, 2014; Sugie *et al.*, 2015).

### 3.4.2 Transformación del cono de crecimiento a terminal sináptico

Para que tenga lugar la formación de conexiones sinápticas es necesaria la transformación de los conos de crecimiento en terminales sinápticos. Este proceso conlleva cambios morfológicos mediados por variaciones dinámicas en la expresión de moléculas de superficie celular (MSC) y de genes que codifican para proteínas presinápticas (Zhang *et al.*, 2016). Además, se han identificado proteínas de unión al RNA conocidas por regular la localización y traducción del RNA mensajero (RNAm) en el extremo 3'UTR. Por lo que los mecanismos posttraduccionales podrían jugar un papel crucial en la diferenciación presináptica. Estudios en R7 han desvelado que las MSC tienen un papel clave en determinar los sitios sinápticos de una forma autónoma parcial (Berger-Müller *et al.*, 2013). Este tipo de moléculas eran capaces de instruir programas sinápticos específicos, modificando la identidad del terminal del axón. Por lo que la sinaptogénesis también requiere de la interacción entre los elementos pre y postsinápticos.

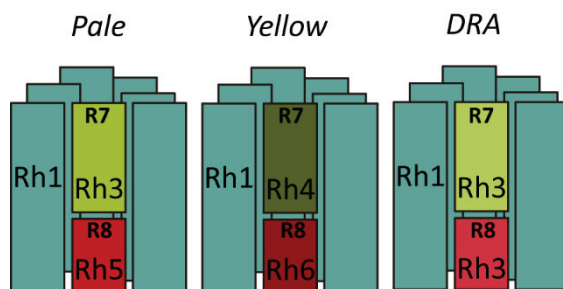
## 4. R7 y R8

R7 y R8 son los fotorreceptores internos ya que proyectan sus axones en la *medulla*, a diferencia de los externos, R1-R6, que terminan en la *lamina*. Aunque R7 y R8 comparten origen durante el desarrollo y tienen una función similar, presentan diferente conectividad sináptica al acabar en diferentes capas de la *medulla*, R8 en M3 y R7 en M6.

### 4.1 Similitudes

R7 y R8 tienen rabdómeros pequeños con posición central (el de R7 se encuentra situado por encima del de R8) y presentan patrones complejos de expresión de opsinas. En la mayoría de los omatidios R7 expresa *Rh3* o *Rh4*, pero no ambos, y de igual manera, R8 expresa *Rh5* o *Rh6* (Chou *et al.*, 1999; Morante, Desplan and Celik, 2007).

La expresión estocástica del FT *Spinless* en R7 controla la elección de la expresividad de las opsinas en R7 y R8 (Wernet *et al.*, 2006), creando tres tipos de omatidios: por una parte, el 30% expresa *Rh3* (sensible a la luz ultravioleta) en R7s y *Rh5* (sensible a la luz azul) en R8s, especializados en la detección de longitudes de onda cortas. Estos omatidios se denominan omatidios *pale*. Por otra parte, el 70% restante expresa *Rh4* (sensible a la luz ultravioleta) en R7s y *Rh6* (sensible a la luz verde) en R8s, estando involucrados en detectar longitudes de onda más largas. A este tipo de omatidios se les denomina *yellow*. Por último, un tercer tipo de omatidios está presente en el borde dorsal del ojo (*dorsal rim area, DRA*), donde tanto R7s como R8s expresan la opsina *Rh3* (Figura 12). Estos omatidios descifran la luz polarizada en los procesos de orientación espacial, aunque la gran mayoría de fotorreceptores internos estén especializados en la visión del color (Wernet *et al.*, 2003, 2012).

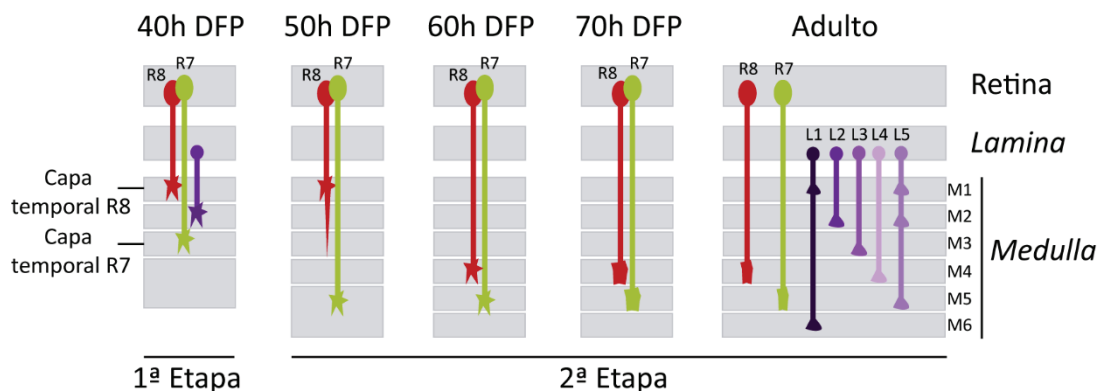


**Figura 12. Tipos de omatidios según la expresión de opsinas.** Sección sagital de los tres tipos de omatidios. Los omatidios *pale* están formados por R1-R6, que expresan la opsina *Rh1*; R7, que expresa *Rh3* y R8, que expresa *Rh5*. Este tipo de omatidios constituye un 30%. Los omatidios *yellow* se diferencian de los omatidios *pale* por su expresión de *Rh4* y *Rh6* en R7 y R8, respectivamente. El 70% de omatidios son *yellow*. En los omatidios que forman el *DRA*, tanto R7 como R8 expresan *Rh3*.

Se ha demostrado una estrecha relación entre los programas transcripcionales que regulan la distinta expresión de opsinas en R7 y R8, así como también su diferente especificidad sináptica. En R8, *Sens* y *Orthodenticle* (*Otd*) son FTs que activan la expresión de las opsinas. Además, *Sens* se encarga de reprimir la expresión de las opsinas de R7 y controla la expresión de MSC que regulan la selección de capa de R8 (Xie *et al.*, 2007; Morey *et al.*, 2008). En el caso de R7, los FTs *NF-YC* y *Prospero* (*Pros*) actúan de forma paralela, reprimiendo la expresión de opsinas de R8 y evitando que los R7s seleccionen como su capa, la de los R8s (Kauffmann *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008; Morey *et al.*, 2008). Por lo que, los mismos FTs determinan la expresión de receptores sensoriales específicos y la diferente selección de capa, proporcionando así un mecanismo simple que asegura la transmisión y procesamiento de la información visual.

## 4.2 Diferente selección de capa en la *medulla* y diferentes dianas postsinápticas

La selección de capa de R7 y R8 se produce en dos etapas debido a la diferenciación secuencial de los fotorreceptores (C. Y. Ting *et al.*, 2005). En la primera etapa, a 17h después de que la formación de la pupa (DFP), los axones de R8s diferenciados alcanzan su capa temporal M0 en el cerebro (zona superficial de la *medulla*), mientras que los axones de R7s se extienden más profundamente en este neuropilo a medida que van proyectando en el cerebro, según su orden de nacimiento. Durante la metamorfosis, en la etapa media de pupa (45h DFP), comienza la segunda etapa de la selección de capa, en la que los R8s y R7s comienzan a desplazarse de forma sincrónica desde su capa temporal hacia su capa final M3 y M6, respectivamente (Figura 13).



**Figura 13. Selección de capa de R7 y R8.** La primera etapa de la selección de capa de R7 y R8 se produce con la llegada de forma gradual de los conos de crecimiento de ambos fotorreceptores a sus capas temporales en la *medulla*. Es en la segunda etapa, aproximadamente a 45h DFP, cuando los axones de R7 y R8 comienzan su extensión para alcanzar sus capas finales M6 y M3, respectivamente. La extensión finaliza aproximadamente a las 70h DFP. Las neuronas L1-L5 se han omitido de las etapas de pupa en esta representación, con el objetivo de una mayor comprensión de la selección de capa. (Adaptada de C. Y. Ting *et al.*, 2005).

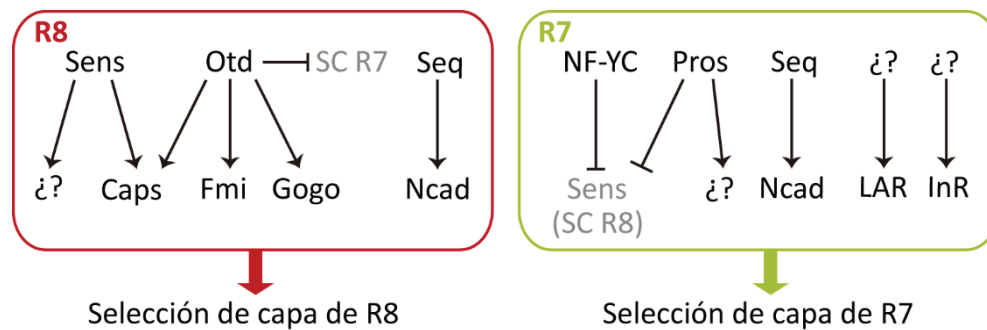
El movimiento de R8 está mediado por la interacción del receptor *Frazzled* (Fra) y su ligando *Netrin* (Net) (C. Y. Ting *et al.*, 2005; Timofeev *et al.*, 2012). Estudios de *live imaging* durante este proceso han proporcionado nuevos conocimientos acerca de las modificaciones morfológicas de los conos de crecimiento. Estas modificaciones incluyen una fase de extensión, seguido de la estabilización hacia sus dianas y una fase de elongación donde los R8s aumentan su longitud, al mismo tiempo que el neuropilo se desarrolla. Al final del proceso de estabilización, solapando con la fase de elongación, el cono de crecimiento se transforma en terminal sináptico (Akin and Lawrence Zipursky, 2016).

Los conos de crecimiento de R7s también conectan con sus dianas postsinápticas de forma temprana, cuando aún están en su capa temporal (Ting *et al.*, 2014). Además, gracias a procesos neuronales de las neuronas de la *lamina* mantienen su posición inicial más interior en la *medulla* durante la fase de elongación (Özel *et al.*, 2015). El distanciamiento pasivo con respecto a R8 se logra mediante patrones dinámicos de filopodios del cono de crecimiento gracias a Ncad, durante la restricción de las columnas, la formación de las capas y la sinaptogénesis (Özel *et al.*, 2015), y por la propia regulación del crecimiento axonal del R7 (Kniss, Holbrook and Herman, 2013; Feoktistov and Herman, 2016). El proceso de selección de capa finaliza aproximadamente,

a 70h DFP, donde R7 y R8 alcanzan su capa final en la *medulla* y asumen las configuraciones de la etapa adulta (C. Y. Ting *et al.*, 2005).

El FT Sequoia (Seq), mediante diferentes niveles de expresión en R7 y R8, regula la segregación de ambos fotorreceptores durante la fase inicial de la selección de capa (Petrovic and Hummel, 2008). Debido a que R7 y R8 difieren en su selección de capa en la *medulla*, también presentan diferentes dianas postsinápticas. La proteína *Activin* juega un papel clave, ya que actúa como guía al ser secretada por R7 y R8 para orientándoles hacia sus respectivas neuronas postsinápticas, Tm20 y Dm8 (Ting *et al.*, 2014).

Como se ha mencionado previamente, R7 y R8 presentan diferentes programas genéticos que determinan la diferente selección de capa en la *medulla*. *Sens* y *Otd* controlan la selección de capa de R8, regulando la expresión de MSC (*Morey et al.*, 2008; Mencarelli and Pichaud, 2015) que se comentarán a continuación. Cabe resaltar que *Otd* podría estar inhibiendo parte del programa de R7 en R8 independientemente de su función en la regulación de la expresión de MSC implicadas en la selección de capa de R8 (Mencarelli and Pichaud, 2015) (Figura 14). En mutantes R8 de *sens* u *otd* se observan diferentes fenotipos consistiendo en R8s detenidos de forma errónea en la capa M1, sobrepasando la capa M3 o dirigiéndose hacia fotorreceptores colindantes en la *medulla* (*Morey et al.*, 2008; Mencarelli and Pichaud, 2015).



**Figura 14. Programas transcripcionales necesarios para la selección de capa de R8 y R7.** En R8, *Sens* y *Otd* son los FTs que actúan de forma independiente en la regulación MSC (*Caps*, *Fmi* y *Gogo*) implicadas en la selección de capa (SC). *Sens* regularía a otras moléculas aún desconocidas implicadas en la selección de capa. Además, *Otd* podría inhibir parte del programa necesario para selección de capa de R7. *Seq* es un FT implicado en las etapas iniciales de la selección de capa, regulando la expresión de *Ncad*, cuyo mecanismo es compartido con R7. En R7, *NF-YC* inhibe a *Sens*, reprimiendo así el programa de selección de capa de R8. *Pros* actuaría de forma paralela a *NF-Y*, probablemente colaborando en dicha represión. Además, *Pros* regularía la expresión de otras moléculas desconocidas implicadas en la selección de capa de R7. *LAR* e *InR* (*Insulin receptor*) son MSC implicadas en la selección de capa de R7, cuya regulación transcripcional es desconocida.

En el caso de R7, el factor más importante es *NF-YC*, ya que inhibe a *Sens* en R7, evitando así la selección de capa en M3, lo que sería similar a la represión mediada, en parte, por *Otd* en R8. En paralelo, *Pros* controla su selección de capa, probablemente al inhibir el programa de R8 (*Morey et al.*, 2008).

El hecho de que R7 y R8 difieran en el mecanismo genético que controla su especificidad sináptica, pone de manifiesto que deben de existir diferencias transcripcionales entre estos dos tipos celulares. Actualmente no hay evidencias que expliquen cómo los diferentes programas genéticos establecen los mecanismos moleculares implicados en la especificidad sináptica. No obstante, se han identificado MSC específicas de tipos celulares similares pero con diferente

## Introducción

conectividad, permitiendo así una mayor comprensión de la especificidad sináptica (Tan *et al.*, 2015). La implicación de dichas MSC podría suponer un posible mecanismo general lógico para lograr dicha especificidad, ya que también han mostrado ser importantes en el sistema olfatorio de *Drosophila* (Hong, Mosca and Luo, 2012; Ward *et al.*, 2015), en la retina de ratón (Krishnaswamy *et al.*, 2015) y en el gusano (Shen and Bargmann, 2003; Shen, Fetter and Bargmann, 2004). Además, se postula que proteínas de superfamilias de Ig (inmunoglobulina) relacionadas podrían controlar las conexiones sinápticas en diferentes capas en neuronas diferentes de la retina de vertebrados (Yamagata and Sanes, 2008, 2012).

## 5. Las moléculas de superficie celular y el ensamblaje de redes neurales

A lo largo de los años se han identificado proteínas de superficie de reconocimiento celular implicadas en la organización de los axones y dendritas, observándose tres estrategias generales moleculares implicadas en la formación de las redes neuronales. Primeramente, se ha demostrado que la guía axonal en diferentes regiones del SN en formación de vertebrados e invertebrados requiere de una cantidad limitada de MSC y moléculas secretadas que estén conservadas (O'Donnell, Chance and Bashaw, 2009). Esto se ha observado en el caso de netrinas, slits, semaforinas, cadherinas y proteínas de la superfamilia de Ig. Por otra parte, los gradientes de proteínas de superficie, como Ephs, Efrinas y Wnts tienen un papel crucial en la formación de los mapas topográficos (Schmitt *et al.*, 2006; Triplett and Feldheim, 2012; Cang and Feldheim, 2013), constituyendo un principio esencial en el cerebro de vertebrados (Cang and Feldheim, 2013). Igualmente, la gran diversidad de las MSC ha hecho que cada neurona tenga una identidad única y medien procesos de repulsión entre neuritas de la misma célula (Lefebvre *et al.*, 2012; Lawrence Zipursky and Grueber, 2013).

Los estudios de comportamiento realizados en *Drosophila* han permitido la identificación de MSC importantes en la conectividad de los fotorreceptores. Tal es el caso de Ncad y de LAR, siendo esenciales para el establecimiento de conexiones en R1-R6 y en R7 (Clandinin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Nern *et al.*, 2005). En el caso de R8 también se han identificado MSC necesarias para la selección de capa de R8: Caps (Shinza-Kameda *et al.*, 2006), Fmi y Gogo (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). Sin embargo, la ausencia de un test de comportamiento necesario para el estudio de R8 ha dificultado la identificación de MSC adicionales.

Gracias a la técnica *RNA-seq* se obtuvo el transcriptoma de varios tipos celulares similares (R7, R8 y cinco neuronas de la *lamina*, L1-L5) pero con distinta especificidad sináptica en diferentes etapas de la selección final de capa: 40h DFP (antes), 50h DFP (durante) y 60h DFP (al finalizar) (Tan *et al.*, 2015; Morey *et al.*, no publicado). Esto permitió descifrar un lenguaje entre MSC específico del tipo neuronal en la etapa previa al comienzo de la selección final de capa (40h DFP), el cual sería necesario para establecer conexiones específicas. Las neuronas L1-L5 expresaban combinaciones específicas de proteínas Dpr de la familia Ig que reconocían sus receptores DIP en las neuronas postsinápticas. Del mismo modo, se identificaron dichas proteínas en R7, las cuales interactuaban con proteínas DIP expresadas en su neurona postsináptica Dm8 (Carrillo *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015). Esto corrobora que las MSC juegan un papel importante en la especificidad sináptica.

Gracias a los estudios previos realizados se ha podido confirmar la gran importancia de MSC en la formación de los circuitos neuronales en el sistema visual. No obstante, estos estudios también han demostrado que dichas moléculas no serían las únicas en participar en dicho proceso. Por lo que otras moléculas aún desconocidas que modulasen la actividad de MSC, serían necesarias para la formación de la especificidad sináptica, como por ejemplo en la selección de capa de R7 y R8 durante el desarrollo.

Como se ha comentado anteriormente, R7 y R8 tienen programas transcripcionales diferentes que controlan su distinta conectividad en la *medulla*. Por lo que sus diferencias transcripcionales explicarían su diferente y específica selección de capa. Así, gracias al *RNA-seq* previamente mencionado (Tan *et al.*, 2015; Morey *et al.*, no publicado) se podrían elucidar los mecanismos moleculares que regulasen a las MSC, como también, la identificación de otras moléculas con funciones importantes en la selección de capa de R7 y R8.

## Introducción

Durante el proceso de la selección de capa, el R8 se moviliza de forma activa con respecto a R7, sugiriendo que esta neurona requiere la expresión de genes específicos que permitan este movimiento y su diferente conectividad. La realización de un *screen* genético con el objetivo de determinar genes enriquecidos en R8 comparado con R7 durante la selección de capa, permitiría completar las rutas génicas que regulasen dicho proceso y una mayor comprensión de su diferente conectividad. Por ello, en esta tesis se han empleado los datos obtenidos del anteriormente explicado *RNA-seq* (Tan *et al.*, 2015; Morey *et al.*, no publicado) para revelar las diferencias transcripcionales entre R7 y R8, y estudiar qué genes estarían colaborando en la guía axonal del R8.

## 6. Moléculas de superficie celular implicadas en la selección de capa en R8 y R7

### 6.1 Selección de capa de R8

#### 6.1.1 Fmi y Gogo

Sens y Otd regulan la expresión de MSC implicadas en la guía axonal de R8 (Morey *et al.*, 2008; Mencarelli and Pichaud, 2015). Concretamente, Otd regula la expresión de Gogo y Fmi (Mencarelli and Pichaud, 2015), cuya interacción es esencial para que los R8s se dirijan correctamente a su capa final en la *medulla* (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). La interacción entre Fmi y Gogo ocurre de forma independiente a sus funciones tempranas en la interacción entre neuronas aferentes durante la formación del mapa retinotópico.

Gracias a un *screen* genético realizado para la identificación de mutaciones que provocaran defectos en la conectividad de los fotorreceptores, se identificó la molécula Fmi (K.-A. Senti *et al.*, 2003). Fmi es un tipo de cadherina con 7 pasos-transmembrana, la cual juega un papel importante en la guía axonal de los fotorreceptores y en la selección de capa (K. Senti *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2008). Además, está implicada en la polaridad celular plana y en la formación de las dendritas (Usui *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000). Gogo es un receptor putativo que fue identificado mediante un *screen* genético con el objetivo de identificar mutaciones que afectarían a los circuitos neuronales del sistema visual (Berger *et al.*, 2008). Este receptor regula la formación de las dendritas y la guía axonal de los fotorreceptores (Berger *et al.*, 2008; Tomasi *et al.*, 2008; Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011; Ohler, Hakeda-Suzuki and Suzuki, 2011; Mann *et al.*, 2012; Hakeda and Suzuki, 2013; Hein, Suzuki and Grunwald Kadow, 2013).

Fmi se expresa de forma intensa en la región diana del lóbulo óptico, mientras que Gogo únicamente se detecta en los axones de los fotorreceptores. La similitud de los fenotipos generados por mutantes de *gogo* y mutantes de *fmi* ponía en evidencia que ambas moléculas podrían estar interaccionando en R8 (K. Senti *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Tomasi *et al.*, 2008; Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). En este escenario la mayoría de los R8 mutantes son incapaces de extender sus filopodios hacia la capa M3 a 50h DFP, momento en el que comienzan su movimiento sincrónico para alcanzar su capa final receptora. Por lo que los R8s se quedan estancados en su capa temporal, siendo incapaces de enervar la *medulla*. Sin embargo, a pesar de dichas similitudes, Fmi y Gogo también tienen funciones independientes de la selección de capa de R8.

Gogo está implicado en la adhesión de los R8s a su capa temporal y Fmi actúa de forma antagonística inhibiendo la interacción de Gogo con la capa temporal. A continuación, estas dos moléculas cooperan para que los R8s avancen hacia su capa final M3 durante la metamorfosis. La expresión de Fmi en la región diana de la *medulla* es esencial, mientras que su dominio citoplasmático es dispensable para dicho proceso. Por lo que Fmi lograría que los R8s promuevan su extensión hacia M3 a través de sus propiedades de adhesión, mediante su dominio extracelular y por la interacción homofílica de Fmi en los fotorreceptores con Fmi en las neuronas diana. Por otra parte, el dominio citoplasmático de Gogo sí es necesario, sugiriendo que se encargaría de la transducción de la señal hacia el cono de crecimiento de R8 (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011).



### 6.1.2 Capricius (Caps)

Sens y Otd controlan la expresión de la MSC rica en repeticiones de leucinas Caps (Morey *et al.*, 2008; Mencarelli and Pichaud, 2015). Esta molécula fue originalmente identificada por estar implicada en la formación de la sinapsis en la unión neuromuscular (Shishido, Takeichi and Nose, 1998; Taniguchi *et al.*, 2000; Abrell and Jäckle, 2001). Un reciente estudio ha mostrado que la adhesión de los conos de crecimiento de R8 en su capa temporal producida por Caps junto con la segregación de los conos de crecimiento producida por Seq, crean un equilibrio necesario para el posicionamiento de los axones de los fotorreceptores a medida que se desarrolla la *medulla* (Kulkarni *et al.*, 2016).

Caps, además de expresarse en R8, también está presente en varias capas de la *medulla*, entre ellas la receptora de R8, en concordancia a su función en la selección de capa específica de R8 (Shinza-Kameda *et al.*, 2006). Estudios previos habían sugerido que Caps mediaba interacciones adhesivas homofílicas entre R8s y sus neuronas postsinápticas del mismo modo que en la unión neuromuscular (Shinza-Kameda *et al.*, 2006). Sin embargo, actualmente se postula que esta molécula interacciona de forma heterofílica con un ligando aún no identificado en M3, no siendo necesaria su expresión en la capa receptora de R8 (Berger-Muller *et al.*, 2013). El fenotipo observado en mutantes de *caps* mostró una penetrancia menor que el publicado previamente, sugiriendo la participación de otras proteínas de forma redundante en la selección de capa de R8.

### 6.1.3 Frazzled (Fra) y Netrin (Net)

El receptor Fra se expresa en R8 y es requerido de forma autónoma para guiar a sus axones hacia su destino final, la capa M3 (Timofeev *et al.*, 2012). La molécula secretada por la capa receptora de R8, Net (Timofeev *et al.*, 2012; Pecot *et al.*, 2014; Akin and Lawrence Zipursky, 2016), es reconocida por su receptor Fra, actuando como señal instructiva por quimioatracción, ya que su expresión ectópica en otras capas es capaz de redirigir erróneamente a los axones de R8 (Timofeev *et al.*, 2012). Contrastando con esta idea, un estudio reciente basado en la observación de la respuesta a Net de los conos de crecimiento de R8 en animales vivos intactos, ha reconsiderado el mecanismo de acción de Net y su receptor. Los conos de crecimiento de R8 mutantes de *Net* o *fra*, eran capaces de dirigirse a su capa receptora sin embargo, fallaban en conectar con sus dianas postsinápticas. Por lo que, Fra y Net se requieren para la conexión entre los procesos neuronales del cono de crecimiento de R8 y su capa final M3, apoyando la hipótesis de que Fra produce la adhesión de los procesos neuronales o de la matriz extracelular en la capa M3 de la *medulla* (Kulkarni *et al.*, 2016).

## 6.2 Selección de capa de R7

### 6.2.1 N Cadherin (Ncad)

Gracias a un *screen* de comportamiento visual en el que se estudió la afectación de la respuesta de R1-R6 y de R7 se identificó a la cadherina Ncad (Lee *et al.*, 2001). La selección de capa de R7 es regulada Ncad, la cual es necesaria tanto en los axones de R7 como en las neuronas diana en la capa M6 durante las etapas iniciales de la selección de capa. De la misma manera, también es requerida en una etapa más tardía para la elongación del cono de crecimiento hacia su destino final (C. Y. Ting *et al.*, 2005; Nern *et al.*, 2005). Ncad establece una interacción permisiva entre neuronas aferentes y sus dianas, necesaria para la selección específica de capa de R7. Dicha interacción tiende a ser únicamente adhesiva en la naturaleza, siendo la región citoplasmática de Ncad, y por lo tanto la transducción de la señal, no necesaria en R7s (Yonekura *et al.*, 2006).

La expresión de *Ncad* se produce en un gran número de neuronas de la *medulla*, por lo que descifrar cómo logra mediar la selección de capa en R7 ha sido objeto relevante de estudio. Mediante la observación *in vivo* de la dinámica de filopodios en animales mutantes de *Ncad*, se ha mostrado que esta molécula no actuaría como una señal en R7 para llegar a su capa final, ya que estos R7s mutantes no mostraron defectos en este proceso. No obstante, se identificó una disminución de la dinámica de los filopodios (Özel *et al.*, 2015). Este hecho haría referencia a una pérdida de la adhesión, probablemente produciendo la desestabilización de los contactos con sus dianas postsinápticas, incluso después de que la selección de capa ocurriese correctamente. De esta manera aumentarían los defectos en este proceso a lo largo del tiempo en mutantes de *Ncad*.

### 6.2.2 Receptores tirosina fosfatasa: LAR y PTP69D

La selección específica de capa de R7 también depende de los receptores tirosina fosfatasa PTP69 (Newsome, Asling and Dickson, 2000) y LAR (Clandinin *et al.*, 2001; Maurel-Zaffran *et al.*, 2001; C.-Y. Ting *et al.*, 2005). La identificación del receptor PTP69 se consiguió gracias un *screen* genético en la búsqueda de mutaciones que afectarían a la conectividad de los fotorreceptores (Newsome, Asling and Dickson, 2000), mientras que LAR se descubrió por medio de estudios de comportamiento que afectarían a la respuesta de R1-R6 y R7 (Clandinin *et al.*, 2001). A pesar de que en mutantes de ambos genes los R7s seleccionaban de forma defectuosa la capa receptora de R8 como su capa final, se desconoce el mecanismo molecular por el cual realizan su función.

LAR parece ser necesario exclusivamente en el cono de crecimiento de R7 en la segunda etapa de la selección de capa (Clandinin *et al.*, 2001; Maurel-Zaffran *et al.*, 2001; C.-Y. Ting *et al.*, 2005). Gracias a estudios genéticos y bioquímicos se ha postulado que LAR, junto con la proteína  $\alpha$ -liprin, se encargarían de modificar la actina del citoesqueleto en R7, siendo su actividad fosfatasa dispensable (Hofmeyer *et al.*, 2006; Hofmeyer and Treisman, 2009). Recientemente se han identificado dos tipos de liprinas con funciones diferentes en la selección de capa de R7.  $\beta$ -liprin actuaría en paralelo a  $\alpha$ -liprin evitando que los R7s sobrepasen su capa M6, mientras que  $\gamma$ -liprin compite con  $\alpha$ -liprin para unirse a LAR, posiblemente para regular negativamente su actividad (Astigarraga *et al.*, 2010).

## Introducción

La teoría de la quimioafinidad de Sperry (Sperry, 1963) propuso que las neuronas siguen unas señales específicas que indican con qué otras neuronas deben conectarse. Primeramente se pensó que eran gradientes de moléculas de adhesión en las neuronas los encargados en instruir el axón hacia su diana postsináptica. Sin embargo, la guía axonal ocurre mediante la combinación de señales de corto o largo alcance, pudiendo ser atractivas o repulsivas. Por lo que la teoría de Sperry más tarde, se inclinó hacia la vertiente de que es la combinación de una gran variedad de moléculas las que instruyen la extensión de los axones hacia sus dianas específicas.

La manera más evidente de pensar es que los genes que controlan la conexión específica entre neuronas se expresan de forma específica creando una identidad única. Sin embargo, la gran mayoría de las moléculas implicadas en la selección de capa de R7 y R8 no están expresadas especialmente en dichas células, sino que presentan un amplio rango de expresión actuando de forma combinada. Las distintas interacciones celulares que se producen durante el desarrollo de la *medulla* junto con la expresión dinámica de estas moléculas, controlada por programas transcripcionales intrínsecos, harían posible la formación de conexiones neuronales específicas durante el desarrollo. A pesar de producirse grandes avances en la identificación de moléculas que regulan la especificidad sináptica en R7 y R8 gracias a estudios genéticos, los mecanismos que dirigen el comportamiento de los conos de crecimiento durante el desarrollo *in vivo* continúan siendo una incógnita.





## **Objetivos**



El **objetivo principal** de esta tesis doctoral ha sido:

- Identificar moléculas adicionales que proporcionen una mayor comprensión de la conectividad del fotorreceptor R8 en *Drosophila melanogaster*.

Los **objetivos específicos** planteados durante este trabajo han consistido en:

- Realizar un *screen* genético mediante el empleo de RNA de interferencia (RNAi) de los genes enriquecidos en R8 durante todo el proceso de la selección final de capa (40h, 50h y 60h después de la formación de la pupa, DFP) y justo antes de que el proceso comience (40h DFP).
- Validar los fenotipos procedentes del *screen* mediante RNAi a través de líneas mutantes o inserciones.
- Estudiar detalladamente dos de los genes candidatos resultantes del *screen* por RNAi: *GstE11* y *espinas (esn)*.





## **Materiales y métodos**



# 1. Cepas de *Drosophila*

Las moscas utilizadas en este trabajo se han cultivado en medio estándar de *Drosophila* suplementado con levadura, en cámaras acimatadas a diferentes temperaturas: 17°C, 25°C y 29°C. En la tabla 1 se indican las diferentes líneas utilizadas y su procedencia.

Línea	Procedencia
<i>sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA, LexAOp-myr-tdtom/CyO; GMR-Gal4, UAS-Dcr2/TM6B</i>	Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>20C11FLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA, LexAOp-myr-tdtom/CyO; GMR-Gal4, UAS-Dcr2/TM6B</i>	Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>w; Bl/CyO; GMR-Gal4, UAS-Dcr2, Rh6-lacZ/TM6B</i>	Laboratorio Dr. Zipursky
<i>ey3.5flp(g5d); FRT-42B, Act5C-Gal80/CyO; sens-Gal4, UAS-utr-GFP/TM2</i>	Laboratorio Dr. Zipursky
<i>w; FRT-G13 ken<sup>11035</sup>/SM6b</i>	Lukacsovich <i>et al.</i> , 1999
<i>w; FRT-G13 ken<sup>02970</sup>/SM6b</i>	Lukacsovich <i>et al.</i> , 1999
<i>w; FRT-G13 ken<sup>1</sup>/SM6b</i>	Lukacsovich <i>et al.</i> , 1999
<i>w; P(FRT(w<sup>HS</sup>))G13</i>	Bloomington Stock Center
<i>w; lf/CyO; P(mw+)UAS-Ken/TM3, Ser</i>	Laboratorio Dr. Knoblich
<i>y[1] w[*]; Df(2R)Chi[g230], P{w[+mF]ry[+t7.2]=wF}4-1/CyO-Df(2R)B80, y[+]</i>	Bloomington Stock Center
<i>w; Sco/CyO; sensE1/TM2</i>	Nolo, Abbott and Bellen, 2001
<i>w; esn<sup>KO6</sup>/CyOdfYFP</i>	D. Matsubara <i>et al.</i> , 2011
<i>w; esn<sup>00447</sup>/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>w; Sp/CyO, YFP; UAS-GFP:esn<sup>FL</sup>/TM6B, YFP</i>	D. Matsubara <i>et al.</i> , 2011
<i>w[1118]; Df(2R)BSC262/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup> w<sup>*</sup>; Thor<sup>2</sup></i>	Tain <i>et al.</i> , 2009
<i>w1118; Df(2L)BSC292/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>w<sup>1118</sup>; PBac{WH}Cyp301a1<sup>f02301</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>w1118; Df(2R)BSC880/SM6a</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup> w<sup>*</sup>; Mi{MIC}CG14397<sup>M104470</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>w[1118]; Df(2L)Exel7080/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup> w<sup>*</sup>; Mi{MIC}CG45263<sup>M100162</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup> w<sup>*</sup>; Mi{MIC}Tpr2<sup>M11295</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>w<sup>1118</sup>; Df(2L)Exel7066/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup> w<sup>67c23</sup>; P{SUPor-P}CG8306<sup>KG04004</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>w1118; Df(2R)Exel7144/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>w<sup>1118</sup>; Mi{ET1}Ppn<sup>MB07666</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>w1118; Df(3R)BSC322/TM6C, Sb1 cu1</i>	Bloomington Stock Center
<i>w<sup>*</sup>; 5-HT1B<sup>ΔIII-V</sup></i>	Gasque <i>et al.</i> , 2013
<i>w1118; Df(2R)Exel6068, P{XP-U}Exel6068/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup>; ry<sup>506</sup> P{SUPor-P}CG6218<sup>KG09249</sup></i>	Bloomington Stock Center
<i>w1118; Df(3R)Exel6174, P{XP-U}Exel6174/TM6B, Tb1</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup> w<sup>*</sup>; Mi{MIC}CG2016<sup>M104995</sup></i>	Bloomington Stock Center

<i>w</i> [1118]; <i>Df</i> (3R) <i>Exel6143</i> , <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>XP-U</i> } <i>Exel6143/TM6B</i> , <i>Tb</i> [1]	Bloomington Stock Center
<i>w</i> *; <i>Npc2b19</i>	Huang et al., 2007
<i>w</i> [1118]; <i>Df</i> (3R) <i>BSC616/TM6C</i> , <i>cu</i> [1] <i>Sb</i> [1]	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *; <i>Mi</i> { <i>MIC</i> } <i>ItgaPS5</i> <sup>MI01533</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> 1118; <i>Df</i> (2R) <i>BSC785/SM6a</i>	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *; <i>Mi</i> { <i>MIC</i> } <i>CG32052</i> <sup>MI02380</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> 1118; <i>Df</i> (3L) <i>BSC673</i> , <i>P</i> + <i>PBac</i> { <i>XP3.WH3</i> } <i>BSC673/TM6C</i> , <i>Sb1 cu1</i>	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *; <i>P</i> { <i>Mae-UAS.6.11</i> } <i>CG11686</i> <sup>LA00195</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> 1118; <i>Df</i> (3R) <i>Exel8158/TM6B</i> , <i>Tb1</i>	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *; <i>Mi</i> { <i>MIC</i> } <i>Fkbp14</i> <sup>MI04530</sup> / <i>SM6a</i>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> [*]; <i>Df</i> (2R) <i>48</i> , <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>Ubi-Sara.J</i> } <i>2/CyO</i> , <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>ActGFP</i> } <i>JMR1</i>	Bloomington Stock Center
<i>y</i> <sup>d2</sup> <i>w</i> <sup>1118</sup> <i>P</i> { <i>ey-FLP.N</i> } <i>1</i> ; <i>P</i> { <i>neoFRT</i> } <i>82B P</i> { <i>lacW</i> } <i>CG11836</i> <sup>S00601</sup> <i>3/TM3</i> , <i>P</i> { <i>Car20y</i> } <i>AS1</i> , <i>Ser</i> <sup>1</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> [1118]; <i>Df</i> (3R) <i>BSC494/TM6C</i> , <i>Sb</i> [1] <i>cu</i> [1]	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *; <i>Mi</i> { <i>MIC</i> } <i>CG8420</i> <sup>MI12232</sup> / <i>TM3</i> , <i>Sb</i> <sup>1</sup> <i>Ser</i> <sup>1</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> 1118; <i>Df</i> (3R) <i>BSC666/TM6C</i> , <i>Sb1 cu1</i>	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *; <i>Mi</i> { <i>MIC</i> } <i>laccase2</i> <sup>MI07159</sup> / <i>SM6a</i>	Bloomington Stock Center
<i>Df</i> (2R) <i>M41A8/SM1</i>	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> * <i>Mi</i> { <i>MIC</i> } <i>CG32521</i> <sup>MI11815</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> * <i>P</i> { <i>EP</i> } <i>CG33178</i> <sup>G1042</sup>	Bloomington Stock Center
<i>y1 w</i> *;+; <i>CG6026</i> <sup>MI11998</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> [1118]; <i>Df</i> (3R) <i>Exel6183</i> , <i>repo</i> [*] <i>P</i> { <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]= <i>XP-U</i> } <i>Exel6183/TM6B</i> , <i>Tb</i> [1]	Bloomington Stock Center
<i>y</i> <sup>d2</sup> <i>w</i> <sup>1118</sup> <i>P</i> { <i>eyFLP.N</i> } <i>1</i> ; <i>P</i> { <i>neoFRT</i> } <i>82B P</i> { <i>lacW</i> } <i>CG11836</i> <sup>S006013</sup> / <i>TM3</i> , <i>P</i> { <i>Car20y</i> } <i>AS1</i> , <i>Ser</i> <sup>1</sup>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> ; <i>Rh6GFP</i> /( <i>CyO</i> );+	Japan
<i>w</i> ;+; <i>Rh6GFP/TM3</i> , <i>Ser</i>	Japan
<i>hsFLPwy</i> ; <i>Rh6lacz/CyO</i> ; <i>TM2/TM6B</i>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> ; <i>Bl/CyO</i> ; <i>Rh6lacz/TM2</i>	Bloomington Stock Center
<i>yw</i> ; <i>ey3.5gal4</i> ;+	Bloomington Stock Center
<i>w</i> *; <i>P</i> { <i>neoFRT</i> } <i>42D stanE59/CyO</i>	Usui et al., 1999
<i>W</i> ;+; <i>fmi RNAi/TM6B</i>	Labratorio Tom Clandinin
<i>w</i> ; <i>P</i> { <i>XP</i> } <i>GstE11</i> <sup>d06699</sup>	Harvard
<i>w</i> <sup>1118</sup> ; <i>Df</i> (2R) <i>BSC399/CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> <sup>1118</sup> ; <i>Df</i> (2R) <i>ED3683</i> , <i>P</i> { <i>3'.RS5+3.3'</i> } <i>ED3683/SM6a</i>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> ;+; <i>10xUAS-mCD8GFP</i>	Bloomington Stock Center
<i>wy</i> ; <i>wgsp/CyO</i> ; <i>LongGMRGal4/TM2</i>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> ; <i>apGal4</i> , <i>UAS-GFP/CyO</i> ; <i>tubGal80</i> <sup>TS</sup> / <i>TM6B</i>	Laboratorio Dr.Serras

**Tabla 1.** Líneas de *Drosophila* utilizadas. Se indica el genotipo y su procedencia.

Las líneas de RNA de interferencia (RNAi) proceden de colecciones disponibles de *Vienna Drosophila Resource Center (VDRC)* y de *Transgenic RNAi Project (TRiP)*. Esta información está indicada en las tablas 11, 12, 13 y 14 (Anexo 1).

## 2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por *Sigma*, tabla 2:

Nombre	Secuencia	Experimento
GstE <sup>d06699</sup> _FWD	5' CACTGTCTGGCTGAAGGTGA 3'	PCR
GstE <sup>d06699</sup> _REV	5' CCAGTCCCACCAACATATCC 3'	PCR
GstE11_FWD	5' TTTGGAGTTGGACTTGCGACT 3'	RT-PCR
GstE11_REV	5' GTGCTGCGCATTCAACTTGA 3'	RT-PCR
Rp49_FWD	5' ATGCTAAGCTGTCCACAAATG 3'	RT-PCR
Rp49_REV	5' CAGATACTGTCCCTTGAAGC 3'	RT-PCR
DIA_FWD	5' CAAGTGGACGTGCTGGGC 3'	RT-PCR
DIA_REV	5' AAAGTCTTGATGTCCGCAAAG 3'	RT-PCR

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.** Se indica la secuencia y el experimento en el que se han empleado.

## 3. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en esta tesis están representados en la tabla 3.

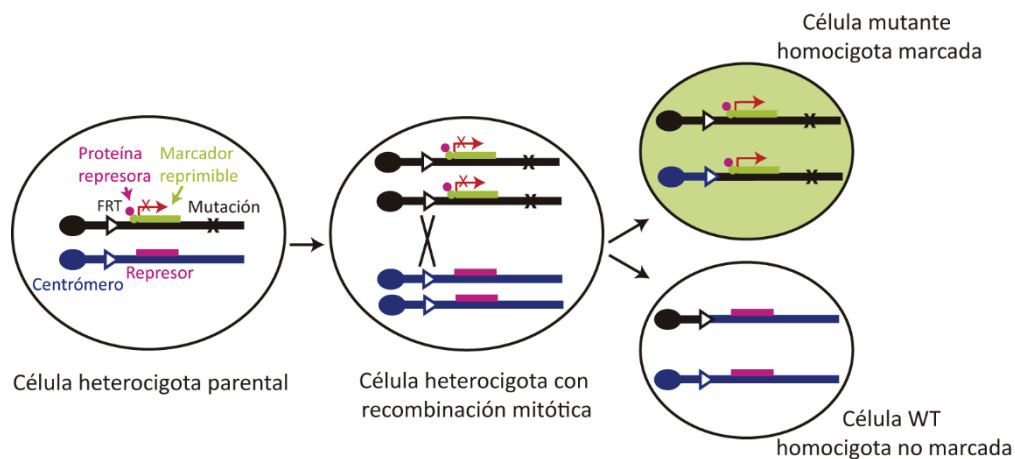
Anticuerpos primarios			
Antígeno	Huésped	Concentración	Origen
GFP	Conejo	1:800	<i>Abcam</i>
RFP	Conejo	1:200	<i>Clontech</i>
$\beta$ -Gal	Conejo	1:1000	<i>Cappl</i>
<i>Chaoptin</i>	Ratón	1:10	<i>DSHB</i>
Esn	Cobaya	1:1000	D. Matsubara <i>et al.</i> , 2011
Sens	Cobaya	1:1000	Dr. H. Bellen
Anticuerpos secundarios			
Antígeno	Huésped	Concentración	Origen
Ratón-AlexaFluor568	Cabra	1:500	<i>Life Technologies</i>
Ratón-AlexaFluor488	Cabra	1:500	<i>Life Technologies</i>
Ratón-AlexaFluor647	Cabra	1:500	<i>Life Technologies</i>
Conejo-AlexaFluor568	Cabra	1:500	<i>Life Technologies</i>
Conejo-AlexaFluo488	Cabra	1:500	<i>Life Technologies</i>
Cobaya-AlexaFluor568	Cabra	1:200	<i>Invitrogen</i>

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados.** Se indica el huésped, la concentración empleada y la procedencia de los anticuerpos.

## 4. *Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM)*

Esta técnica permite generar células mutantes las cuales son las únicas células marcadas (Lee and Luo, 1999). La ventaja de esta técnica comparada con el sistema FRT/FLP (Golic and Lindquist, 1989; Xu and Rubin, 1993), es que se visualiza la morfología mutante de neuronas mediante un marcador de la membrana plasmática, concentrándose en los procesos neuronales. Además, las células podían ser mutantes homocigotas para un gen en particular, en un fondo salvaje, permitiendo así el estudio de mutaciones letales.

La técnica *MARCM* se basa en expresar un marcador bajo el control de un promotor represor y en introducir un transgen que permita la expresión ubicua del represor. Dicho represor está limitado por dos secuencias FRT en los extremos, y situado en *trans*-heterocigosis al brazo del cromosoma donde se encuentra la mutación del gen a estudiar. En células heterocigotas, el marcador no se expresa debido a la presencia del represor expresado de forma ubicua. Si a causa de la recombinación mitótica, se producen células hijas homocigotas para la mutación en cuestión, se expresará el marcador ya que dichas células no tendrán el transgen con el represor (Figura 15).



**Figura 15. Técnica *MARCM*.** Un transgen que codifica para una proteína represora del marcador se localiza en posición distal de la secuencia FRT en el cromosoma homólogo del que porta una mutación. Las únicas células marcadas serán las células hijas homocigotas para la mutación debido a la ausencia de la proteína represora.

Para mediar la represión del marcador, se utilizó el sistema original de levadura Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) junto con el represor Gal80, el cual bloquea la actividad del FT Gal4 (Salmeron, Leuther and Johnston, 1990). Como marcador se utilizó la proteína fluorescente verde (GFP), que se inhibirá en las células mutantes heterocigotas y se expresará en las células mutantes homocigotas para el gen de interés. Con el objetivo de limitar la recombinación mitótica en los fotorreceptores se utilizó una flipasa (FLP) que actuará exclusivamente en los fotorreceptores: *ey3.5 (g5d)FLP*.

## 5. Diseño del *screen* de los genes enriquecidos en R8 mediante RNA de interferencia (RNAi)

Para estudiar la función de los genes enriquecidos en R8 en la selección de capa, se llevó a cabo un amplio cribaje (*screen*) genético mediante el uso de dos líneas independientes de RNAi por gen. Sin embargo, para alguno de los genes únicamente hubo disponible una línea. Dichas líneas se obtuvieron de las colecciones disponibles en *Vienna Drosophila Resource Center (VDRC)* y en *Transgenic RNAi Project (TRiP)*.

VDRC tiene disponible líneas *UAS-RNAi* en horquillas largas (librerías GD y KK) y librerías de microRNAs, sin embargo para esta tesis se emplearon líneas GD y KK. La principal diferencia entre ambas librerías, es que las GD son inserciones de transgenes basados en elementos-P en sitios aleatorios en el genoma, mientras que las KK contienen transgenes *phic31* insertados en sitios definidos del genoma.

Las colecciones *TRiP* están formadas por unos vectores llamados *VALIUM (Vermilion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS)*, los cuales contienen el RNAi (Ni *et al.*, 2009, 2011, no date). Al igual que en las librerías KK, la inserción de dichos vectores es dirigida en sitios específicos del genoma.

En este *screen* F1 se realizó un cruce para obtener las moscas transgénicas que expresaran el RNAi en los fotorreceptores mediante el sistema Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993). En este sistema procedente de levadura, el activador transcripcional Gal4 activará a su secuencia diana UAS, produciendo la expresión del RNAi (*UAS-RNAi*). Para ello, se utilizó el reportero *Glass Multimer Reporter (GMR)*, expresado detrás del SM en el disco imaginal de ojo (Hay, Maile and Rubin, 1997), el cual dirigía la expresión de Gal4. No se empleó un promotor específico de R8, ya que no se produciría la suficiente expresión de RNAi como para producir un fenotipo en R8. Contrastando con esto, *GMR-Gal4* produce una potente expresión del RNAi, asegurándonos así el posible silenciamiento del gen de interés. Además, se empleó la enzima Dicer2 (*UAS-Dcr2*) para incrementar la eficacia del RNAi.

Una vez se seleccionaron las moscas fenotípicamente, se diseccionaron tres cerebros por línea de RNAi. A continuación, mediante inmunofluorescencia se procedió a la detección de fenotipos en R8s en el microscopio confocal SP2. Para llevar a cabo la cuantificación fenotípica se utilizaron los controles correspondientes dependiendo de la línea RNAi empleada.

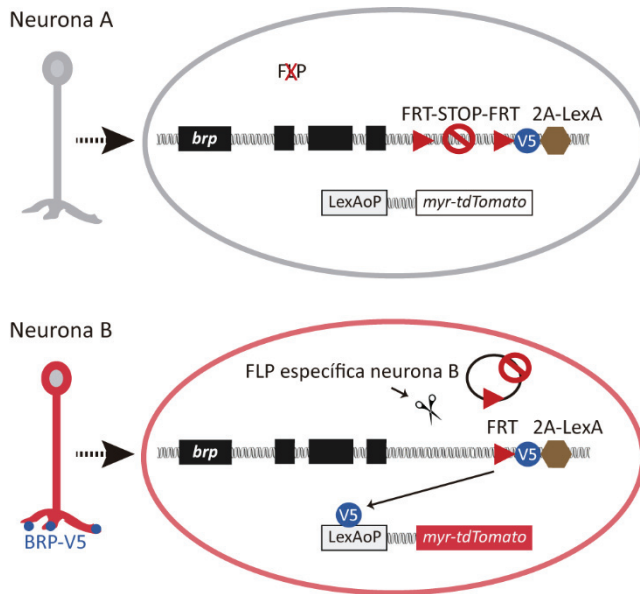
## 6. Estrategias para el *screen* de los genes enriquecidos en R8

### 6.1 Sistema *STaR (Synaptic tagging with recombination) GMR-Gal4*

El sistema *STaR* es un método que permite marcar proteínas endógenas presinápticas y postsinápticas, según el tipo celular (Chen *et al.*, 2014). *Bruchpilot (BRP)* (Kittel *et al.*, 2006; Wagh *et al.*, 2006; Fouquet *et al.*, 2009) es una proteína presente en las zonas presinápticas más activas en el sistema visual de *Drosophila* y en el cerebro central (Yasuyama, Meinertzhagen and Schürmann, 2003; Prokop and Meinertzhagen, 2006; Butcher *et al.*, 2012). A través de *STaR* se consigue marcar la proteína BRP con el *tag V5 (BRP-V5)* únicamente en procesos de células específicas, por la escisión de un casete de *STOP*, localizado entre secuencias FRT reconocidas



por una flipasa neural específica (*sens-FLP (g5d)* para R8s; *20C11-FLP (g5d)* para R7s). Dicha escisión también provocará que un casete *2A-LexA* active la expresión de *myristoylated-tandem-Tomato (myr-tdTom)* (Ryan and Drew, 1994; Lai and Lee, 2006), dependiendo de la flipasa empleada (Figura 16). De esta manera, se visualiza la morfología de dichas neuronas.



**Figura 16. Marcate celular específico mediante STaR.** Esquema del funcionamiento del sistema STaR. En la neurona B, la proteína BRP con el tag V5 (BRP-V5) se expresará gracias a la escisión del casete FRT-STOP-FRT, por medio de una flipasa (FLP) específica de la neurona B. Además, el sistema LexA-lexAop permitirá la expresión de *myr-tdTomato*, marcando la membrana de la neurona de color rojo.

En esta tesis el sistema *STaR* se combinó con el sistema *Gal4/UAS* (Brand and Perrimon, 1993) para utilizar el sistema denominado: *STaR GMR-Gal4*, en el *screen* de una parte de los genes enriquecidos en R8. En este sistema, el *driver* empleado, encargado de dirigir la expresión del RNAi, fue *GMR-Gal4*. De esta manera, el RNAi se expresaba en los fotorreceptores de forma potente, como se ha explicado previamente. Además, este sistema permitía la expresión de la enzima *Dcr2* para lograr una mayor eficiencia del RNAi.

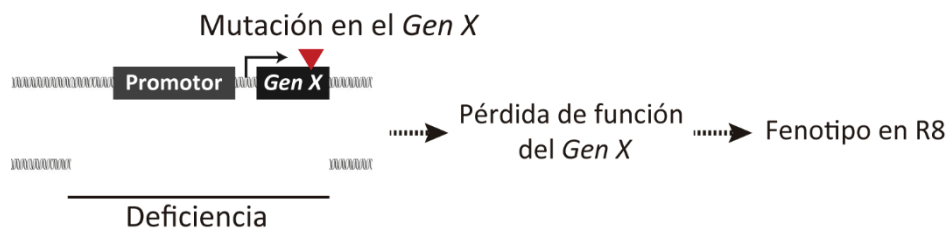
En esta tesis la detección de la proteína BRP no se llevó a cabo ya que nos enfocamos en identificar defectos en la selección de capa en R8.

## 6.2 Sistema *Rh6 GMR-Gal4*

Este sistema se basó en expresar el RNAi bajo el control del *driver GMR-Gal4*, pero en este caso el marcate de los R8s se realizó de forma diferente. *Rhodopsin 6 (Rh6)* es una opsina que se expresa en el 70% de los R8s (Huber *et al.*, 1997). En este sistema se utilizó un transgen que llevaba una porción del promotor de *Rh6 (Rh6-lacZ)*, para conducir la expresión de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) y así visualizar los R8s por la detección de la señal de LacZ. La ventaja de este sistema es que la cuantificación fenotípica se calculó por la media del porcentaje de R8s que no hacían correctamente la selección final de capa.

## 7. Estrategia para la validación de los fenotipos mediante mutaciones génicas

La validación de los fenotipos obtenidos a partir del *screen* mediante RNAi, fue necesaria para confirmar la función de los genes candidatos en la selección de capa del R8. Para ello, inicialmente se realizó la búsqueda en la literatura de líneas mutantes e inserciones de los genes candidatos. En esta búsqueda se tuvo en cuenta que las inserciones afectarían a la región 5'UTR o a la región codificante, lo que generaría la pérdida de función del gen en cuestión. Posteriormente, se realizaron los cruces pertinentes para obtener moscas transgénicas que portasen la mutación en cuestión, en *trans*-heterocigosis a una deficiencia cromosómica que cubriese el gen de interés, y además el transgen *Rh6-GFP* o *Rh6-lacZ*, permitiendo así la visualización de los R8s. El empleo de la deficiencia evitaba la aparición de fenotipos producidos por otras mutaciones presentes en el cromosoma ya mutado en el gen de interés (Figura 17).



**Figura 17.** Estrategia para la validación del fenotipo RNAi mediante líneas mutantes e inserciones. El esquema indica que las moscas mutantes portaron en un cromosoma, la mutación en el gen de interés (*Gen X*), y en el cromosoma homólogo existía una deficiencia que delecionaba el *Gen X*. Este escenario genético produciría la pérdida de función del gen, pudiendo reproducir el fenotipo causado por el RNAi.

Las deficiencias son aberraciones genéticas en las que una parte del cromosoma se pierde durante la replicación. En *Drosophila*, existen proyectos como *Bloomington Deletion Project*, *DrosDel Project* y *Exelixis* donde se generan deleciones en regiones cromosómicas definidas. La mayoría de los puntos de rotura ya están mapeados a una alta resolución, mientras que otros se han caracterizado mediante test de complementación con mutaciones mapeadas (Cook *et al.*, 2012; Roote and Russell, 2012).

## 8. Técnicas de análisis de DNA

### 8.1 Extracción de DNA genómico

Se colocaron dos moscas en un eppendorf de 1,5 ml libre de RNAsa y DNAsa procedente de Kontes (*Fisher Scientific*) a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 min. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de *Squishing Buffer* (*SB*: 10mM Tris-HCl Ph8, 1mM EDTA, 25mM NaCl), que había sido preparado previamente mediante la adición de Proteínasa K (20  $\mu\text{l}$  de Proteínasa K 10 mg/ml a 1 ml de *SB*). Después se empleó la herramienta *Disposable Kontes Pellet Pestle* para proceder a la homogeneización de las moscas durante 10 segundos. Seguidamente, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Después se procedió a la inactivación de la Proteínasa K incubándose a  $95^{\circ}\text{C}$ , 3 min. Finalmente, se realizó

un *spin* para recolectar el sobrenadante en un eppendorf nuevo. Se usó 1 µl del DNA obtenido para reacciones de *PCR*.

## 8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*)

La técnica de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar regiones de DNA a partir de muestras de DNA de origen diverso (genómico, plasmídico, cDNA). Consiste en un proceso cíclico de desnaturalización, unión de oligonucleótidos (óligos) y amplificación, que genera una amplificación exponencial del número de cadenas de DNA.

Para que la reacción tenga lugar hace falta suplementar la muestra de DNA con: polimerasa de DNA (enzima termoestable que realiza la síntesis de DNA), cofactor de la polimerasa (MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>). El uso de uno u otro dependerá del tipo de polimerasa que se esté utilizando), nucleótidos (dNTPs, las unidades que se irán incorporando en la cadena de DNA), óligos (secuencias de cortas de DNA complementarias a los extremos de la región que se quiere amplificar), tampón de la reacción (solución con la concentración óptima de sales para que el rendimiento de la polimerasa sea el máximo; depende de que polimerasa se esté utilizando). Las concentraciones de los reactivos y la temperatura de amplificación depende de la polimerasa y están indicadas por el fabricante, mientras que la temperatura de unión de los óligos, y de desnaturalización depende de las características de los óligos y de la muestra, respectivamente. En la tabla 4 se detallan los reactivos y los ciclos de una reacción de *PCR* estándar.

Reactivos	Ciclos
2 ng DNA	2 min. 95°C
Tampón de la reacción (1X)	30x: 1 min. 95°C (desnaturalización), 1 min. 55°C (unión de los óligos), 1 min. 72°C (amplificación)
MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM	
dNTPs 0,4 mM	
primers 0,5 pmol/µl	10 min. 72°C
DNA polimerasa 0,05 U/µl	

Tabla 4. Reactivos y ciclos de una *PCR* estándar.

## 9. Técnicas de análisis de RNA

### 9.1 Extracción de RNA en discos imaginales de ala

Las extracciones de RNA de discos imaginales de ala se realizaron mediante el kit de extracción *Mini RNA Isolation Kit* (ZYMO-RESEARCH), según las indicaciones del fabricante.

### 9.2 *RT-PCR* (*Real-time PCR*)

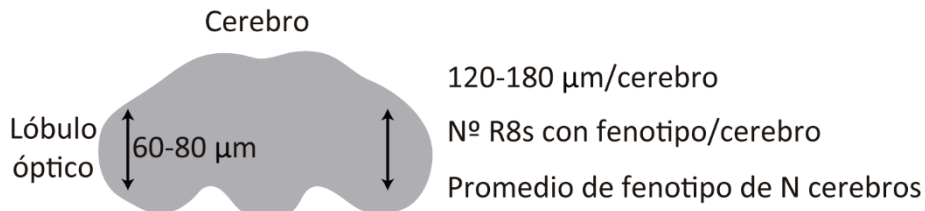
Para realizar la retrotranscripción se incubó 1 µg de RNA con 0,5µg de *oligodt* y 1 µl dNTPs 10mM, en un volumen final de 12 µl durante 5 min. a 65°C. Seguidamente se realizó una segunda incubación de 2 minutos a 37°C añadiendo 4 µl de *5x first strand buffer*, 2 µl de *DTT* 100 mM y 1

$\mu\text{l}$  de agua; y una tercera incubación de 50 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , añadiendo  $1 \mu\text{l}$  de *M-MLV* 200 U/ $\mu\text{l}$  (la transcriptasa reversa de *Promega*). Finalmente, toda la muestra se incubó 15 min. a  $70^\circ\text{C}$ .

Para llevar a cabo la *RT-PCR*, se usaron  $0,5 \mu\text{l}$  de cDNA (DNA complementario). Se realizaron tres réplicas para analizar los resultados, aplicando el método de normalización  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , de un total de tres réplicas independientes.

## 10. Cuantificación del fenotipo

Con el objetivo de identificar un fenotipo en R8s en la selección final de capa, se realizó la cuantificación de los R8s con defectos en la selección de su capa final M3 en la *medulla* en el confocal SP2. Para ello se cuantificó el número de R8s con fenotipo en una cantidad de tejido entre  $60$  y  $80 \mu\text{m}$  de cada lóbulo óptico del cerebro. Por lo que en cada cerebro se analizaron entre  $160$  y  $180 \mu\text{m}$  de tejido (Figura 18).



**Figura 18. Cuantificación de R8s con fenotipo en la selección de capa.** En cada lóbulo óptico del cerebro se analizó una cantidad de tejido comprendida entre  $60$ - $80 \mu\text{m}$ . De este análisis se obtuvo un número promedio de R8s con fenotipo de cada cerebro, observado en un total de  $120$ - $180 \mu\text{m}$  de tejido.

Una vez realizada la cuantificación, se obtuvo un valor promedio con respecto al número de R8s defectuosos. En el *screen* de los genes enriquecidos en R8 a  $40\text{h}$ ,  $50\text{h}$  y  $60\text{h}$ , y solo a  $40\text{h}$  DFP, el promedio se calculó de una  $N=3$ , siendo el número de cerebros analizados por cada línea de RNAi. Para la selección de los genes candidatos se tuvo en cuenta un *fold change* (*fc*) que se calculó con respecto a los controles (fondo fenotípico observado en moscas que no expresaban el RNAi). El valor numérico del *fc* elegido para la selección de los genes candidatos dependió de los resultados obtenidos en cada grupo de genes, para así priorizar el estudio de los más prometedores.

Por otra parte, en los restantes experimentos llevados a cabo en esta tesis debido a que se empleó una  $N>3$  cerebros, se utilizó un test estadístico para determinar si las diferencias fueron significativas con respecto a los controles correspondientes.

## 11. Inmunofluorescencia en cerebro de adulto y pupa

Los cerebros se deshidrataron en etanol al 70% durante 2 min. , y se lavaron en PBS 1X, tres veces. A continuación, la disección de los mismos se llevó a cabo en PBS 1X y posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA) a temperatura ambiente, durante 25 min. Después, se procedió al lavado, tres veces seguidas y tres veces cada 10 minutos.

Seguidamente, los cerebros se incubaron con solución de bloqueo (SB), durante 1 h y 30 min. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en SB, toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron los cerebros en PBT, tres veces seguidas y tres veces cada 10 minutos. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario toda la noche a 4°C, en la oscuridad.

Por último, el día siguiente se lavaron se lavaron los cerebros en PBT, tres veces seguidas y tres veces cada 10 minutos. Todas las soluciones utilizadas están resumidas en la tabla 5.

<b>PFA 4%</b>	Paraformaldehído al 4% diluido en PBS 1X
<b>PBS 1X</b>	125mM NaCl, 16mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> y 8.4mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.3 diluido en agua miliQ
<b>PBT</b>	Tritón X-100 al 0.3% diluido en PBS 1X
<b>Solución de bloqueo</b>	Suero bovino de albúmina al 2% y 0.05% NaN <sub>3</sub> diluido en PBT

Tabla 5. Soluciones para inmunofluorescencia. Se indica el nombre de las soluciones y su composición.

Para el montaje de los cerebros se empleó *Vectashield Antifade Mounting Medium* (Vector laboratories). Los cerebros se colocaron en el portaobjetos en posición vertical sobre una gota del medio de montaje, permaneciendo en la orientación apropiada al utilizar plastilina en cada esquina del cubre. Dicha orientación fue esencial para la correcta visualización de los fotorreceptores bajo el microscopio confocal.

## 12. Imaging

Las imágenes de esta tesis se obtuvieron a partir de los microscopios confocales Leica SP2 y SPE. Todas las imágenes se han procesado mediante Fiji y Adobe® Illustrator *software*.





## Resultados





# **Capítulo 1**

## **Contexto del proyecto y trabajo previo**



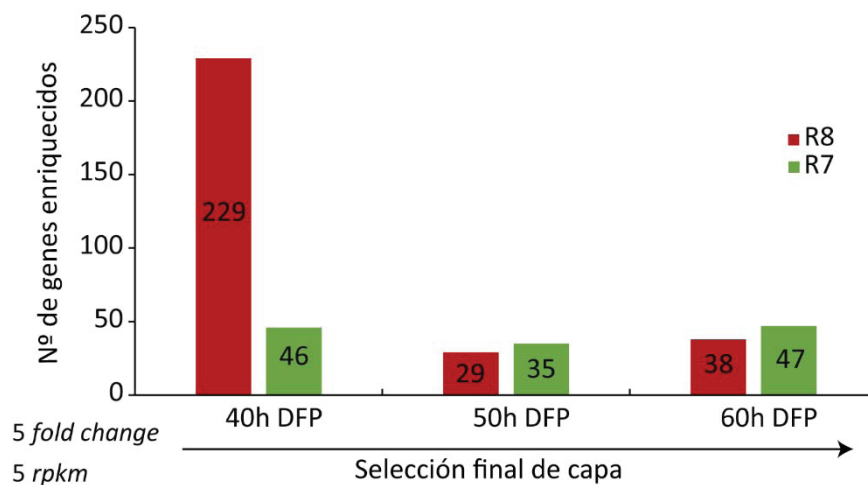
# 1. Contexto del proyecto y trabajo previo

## 1.1 Descripción del transcriptoma de R7 y R8

En estudios anteriores se obtuvo el transcriptoma de R7, R8 y tres tipos de neuronas que forman parte del neuropilo de la *lamina* (L3, L4 y L5) en diferentes estadios durante el desarrollo: 40h DFP, 50h DFP y 60h DFP (Tan *et al.*, 2015; Morey *et al.*, no publicado). Dichos estadios corresponden con el transcurso del proceso de la selección final de capa de R7 y R8:

- Antes de que R7 y R8 comiencen a extender sus axones: 40h DFP.
- Durante la extensión de los axones de R7 y R8: 50h DFP.
- Después de que R7 y R8 alcancen su destino final en la médula: 60h DFP.

La obtención del transcriptoma de R7 y R8 mediante *RNA-seq* durante el proceso final de la selección de capa tuvo como objetivo identificar genes diferencialmente expresados entre R7 y R8 en cada etapa analizada. Mediante el empleo de herramientas bioinformáticas se consiguieron identificar genes que estaban enriquecidos en R7 comparados con su expresión en R8 y genes enriquecidos en R8 comparados con su expresión en R7 en cada tiempo analizado (Figura 19).



**Figura 19. Genes enriquecidos en R7 y R8 en cada tiempo analizado (40h, 50h y 60h DFP).** Las barras rojas representan el número de genes más expresados en R8, mientras que en verde se observan los genes enriquecidos en R7. La expresión de los genes enriquecidos en R7 y R8 fue al menos de 5 *rpk*m, mostrando al menos un 5 de *fold change* (*fc*).

Para seleccionar estos genes enriquecidos se establecieron dos criterios: tener una expresión de 5 *rpk*m (*reads per kilobase of a specific mRNA per million reads*) y un *fc* de 5. De esta manera, los genes diferencialmente expresados mostraron una expresión considerable como para poder realizar su función, al estar cinco veces más expresados comparados con su expresión en R7 o en R8. Otro motivo fue que Sens, que es el FT que controla la selección de capa de R8 (Morey et

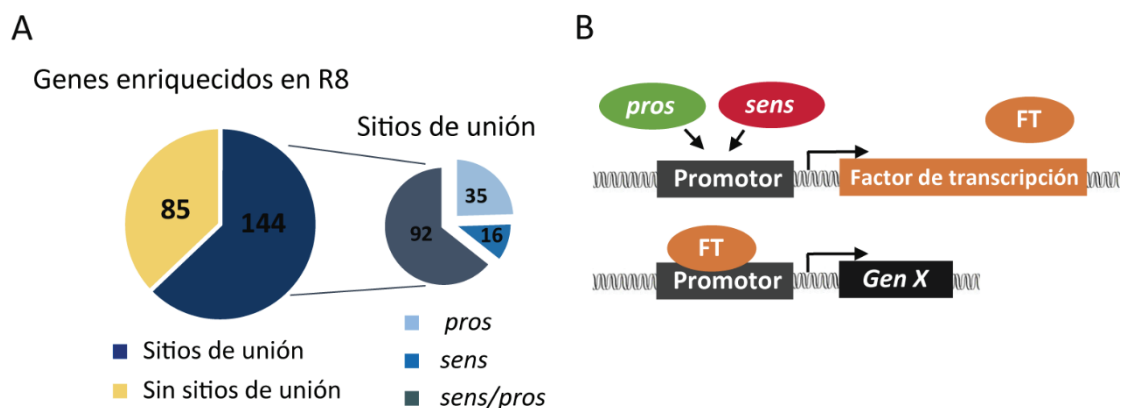
al. 2008) tenía una expresión alrededor de 5 *rpk*m, lo que sugiere que otros genes candidatos podrían tener un nivel de expresión similar para tener una función en el mismo proceso.

Además, se observó que, sobre todo a 40h DFP, el número de genes enriquecidos en R8 era significativamente mayor que el observado en R7, lo cual concordaba con el hecho de que los axones de los R8s se mueven activamente, mientras que los de R7s se mueven pasivamente (Özel *et al.*, 2015; Kniss, Holbrook and Herman, 2013; Feoktistov and Herman, 2016).

## 1.2 Análisis de sitios de unión para Sens y Pros

Según los datos obtenidos procedentes del *RNA-seq*, Sens y Pros son los únicos FTs expresados durante todo el proceso final de selección de capa en R8 y R7, respectivamente ( $fc > 5$  a 40h, 50h y 60h DFP). Debido a que ambos FTs podrían estar regulando la expresión de otros genes enriquecidos en R8 y/o R7, se procedió a la identificación de sitios de unión putativos para Sens y/o Pros en las regiones reguladoras de los genes diferencialmente expresados.

A través de modelos conocidos predictivos para Sens y Pros, teniendo en cuenta los sitios de unión para ambos FTs, se caracterizaron los promotores (1 kb antes del sitio de iniciación de transcripción) e intrones de todos los genes (umbral de similitud del 85%). Gracias a las matrices obtenidas en diferentes bases de datos (*JASPAR*, *Fly factor survey*) tanto para Sens como para Pros, se han obtenido predicciones de las secuencias diana de unión de ambos TFs, permitiendo así conocer qué genes procedentes del análisis del *RNA-seq* contenían dichas secuencias. De este análisis se concluyó que una parte de los genes presentaban sitios de unión putativos para Sens y/o Pros. Este hecho sugería que los genes enriquecidos en R8, además de tener sitios de unión a Sens, también lo podían tener para Pros, por lo que podrían ser activados en R8 por Sens y reprimidos en R7 mediante Pros y al revés, si esto ocurriese en los genes enriquecidos en R7. Por otra parte, se obtuvieron genes que no presentaban dichos sitios de unión. Estos genes estarían regulados a través de otros FTs con sitios de unión a Sens y/o Pros (Figura 20).



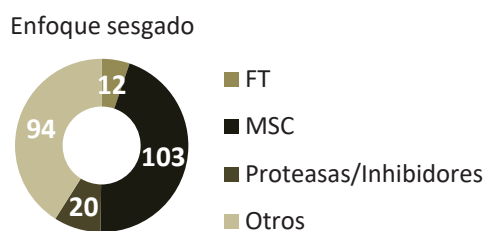
**Figura 20. Sitios putativos de unión para Sens y/o Pros.** A) Número de genes con sitios putativos de unión para Sens y/o Pros. Una parte de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP presentaron sitios putativos de unión en sus regiones reguladoras para Sens y/o Pros, mientras que otros no los presentaron. B) Regulación de la expresión de genes sin sitios de unión. Los genes sin sitios de unión para Sens y/o Pros serían regulados por FTs regulados por Sens y/o Pros.

En paralelo se empleó otro método para predecir sitios de unión en los genes diferencialmente expresados: *i-cis Target*. Este método permitió la identificación de sitios de unión putativos en los genes enriquecidos en R8 para Otd que es un FT implicado en la selección de capa de R8 (Mencarelli and Pichaud 2015), y para *Ken and barbie* (Ken), que es uno de los FTs enriquecidos en R8 a 40h DFP, obtenidos mediante el *RNA-seq*.

### 1.3 Clasificación de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP

Esta tesis se centró en el estudio de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP. Debido al elevado número de genes obtenidos, se realizaron dos enfoques que permitirían priorizar su estudio:

- **Sesgado:** basado en la selección de categorías biológicas relacionadas con la extensión axonal. De esta manera, se obtuvieron categorías como las MSC, que son importantes debido por actuar como los efectores finales del contacto célula-célula, estando implicados en la regulación de la guía axonal en diferentes regiones del sistema nervioso en vertebrados e invertebrados durante el desarrollo (O'Donnell, Chance, and Bashaw 2009). Los FTs fueron otra de las categorías biológicas obtenidas. En este caso, son importantes ya que pueden tener sitios de unión en sus regiones reguladoras para Sens y/o Pros, lo que podría sugerir su funcionamiento en R8 y/o en R7 ya que tanto Sens como Pros son capaces de activar y reprimir la expresión génica. Otra categoría fue la de proteasas e inhibidores de las proteasas, que juegan un papel importante en la rotura de la matriz extracelular permitiendo así la extensión celular (Figura 21).

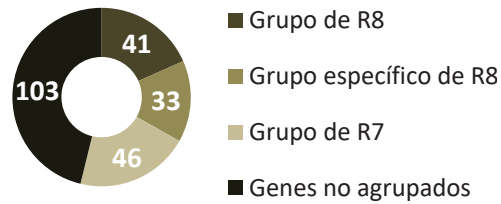


**Figura 21. Clasificación de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP según la categoría biológica (enfoque sesgado).** Teniendo en cuenta las categorías biológicas se obtuvieron genes que eran FT, MSC, proteasas e inhibidores de proteasas; todas ellas relacionadas con el proceso de la guía axonal.

En esta tesis se ha estudiado el FT más interesante, Ken, ya que algunos de los genes enriquecidos en R8 presentaban sitios de unión para este FT según *i-cis Target*. El estudio de la función de Ken en la guía axonal de R8 será explicado en detalle en el siguiente capítulo.

- **No sesgado:** este enfoque se centró en obtener diferentes grupos de genes con comportamiento similar según su patrón de expresión. Los sitios putativos de unión de Sens y/o Pros se encontraron distribuidos de forma indiferente entre los genes pertenecientes a los siguientes grupos:
  - a) Genes enriquecidos en R8 frente a R7 a 40h, 50h y 60h DFP. Estos genes podrían tener una función durante todo el proceso final de selección de capa en R8 (18 genes).
  - b) Gracias al análisis de la correlación entre redes génicas del transcriptoma de R7, R8 y de tres neuronas de la *lamina* (NLs L3-L5) a 40h DFP, se obtuvieron diferentes grupos de genes con un patrón de expresión similar (Figura 22):

Enfoque no sesgado



**Figura 22. Clasificación de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP según el patrón de expresión (enfoque no sesgado).** Al comparar el transcriptoma de R7, R8 y las NLs L3-L5 mediante el análisis de la correlación entre redes génicas, se obtuvieron diferentes grupos de genes según su patrón de expresión.

- 1) Genes completamente ausentes en R7, pero con expresión moderada en R8 y muy baja expresión en las NLs. Este grupo estaba formado por 32 genes y se le denominó: Grupo específico de R8.
- 2) Genes con expresión muy elevada en R8 y con muy baja expresión en R7 y las NLs. Este grupo contuvo 41 genes y fue nombrado: Grupo de R8.
- 3) Genes no agrupados, ya que no hubo el número suficiente de genes con el mismo comportamiento en la expresión génica. Este grupo estaba formado por 103 genes y fue nombrado: Genes no agrupados.
- 4) Genes altamente expresados en R7 y levemente expresados en R8 y las NLs. Dicho grupo formado por 46 genes fue nombrado: Grupo de R7.

Es importante mencionar que existió un solapamiento de genes entre el grupo de genes enriquecidos en todos los tiempos y los grupos R8 y específico de R8 enriquecidos a 40h DFP. Este hecho fue debido a que los genes enriquecidos en todos los tiempos analizados, podían tener un patrón de expresión que se ajustase al grupo R8 o al grupo específico de R8. Por consiguiente, una parte de los genes que pertenecían al grupo de genes enriquecidos en todos los tiempos podían ser miembros de los otros dos grupos de genes enriquecidos a 40h DFP.

En esta tesis se han estudiado mediante pérdida de función con RNAi todos los grupos del enfoque no sesgado, excepto los genes pertenecientes al grupo de R7.







**Capítulo 2**  
**Estudio del factor de transcripción *Ken and Barbie* (Ken) en la sección de capa de R8**



## 2. Estudio del factor de transcripción *Ken and Barbie* (Ken) en la selección de capa de R8

Como se mencionó anteriormente, Ken es uno de los FTs enriquecido en R8 a 40h DFP, es decir, antes del comienzo de la extensión axonal de R7 y R8 hacia su capa final en la *medulla*. Ken fue elegido para su estudio en detalle debido a que cumplía una serie de requisitos establecidos:

- 1) Tener un *rpk*<sub>m</sub> > 5 a 40h, 50h o 60h DFP (Figura 23).
- 2) Tener un *fc* > 5 a 40h, 50h o 60h DFP, es decir su expresión fue cinco veces mayor en R8 que en R7 a 40h DFP (Figura 23).
- 3) Sitios putativos de unión a Sens y/o Pros: Sens y Pros.
- 4) Poseer ortólogo humano: proteína BCL6.

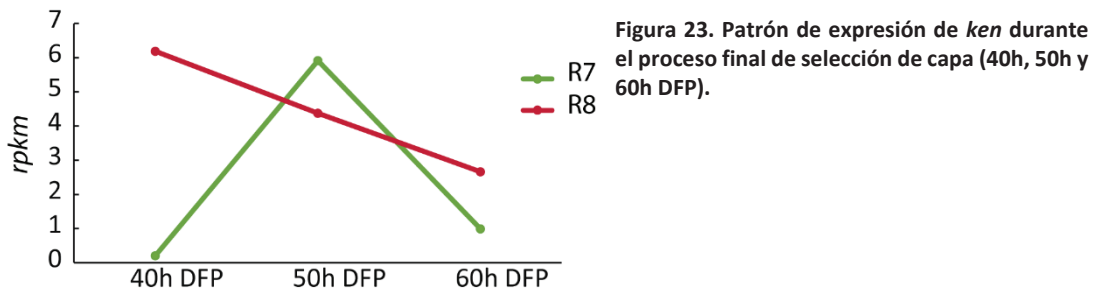


Figura 23. Patrón de expresión de *ken* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

Sin embargo, la causa más importante que determinó el estudio de Ken fue debido a que *i-cis Target* reveló que una parte de los genes enriquecidos en R8 presentaban sitios putativos de unión para Ken, como ya se ha mencionado previamente. Dicha información apoyaba la hipótesis de que los genes sin sitios de unión para Sens y/o Pros podrían estar regulados a través de FTs regulados por Sens y/o Pros. Por lo que Sens estaría regulando a Ken y este regularía a otros genes necesarios para la conexión sináptica específica en R8.

*ken* es un gen formado por tres exones que codifican una proteína de 601 aminoácidos (Kühnlein, Chen, and Schuh 1998; Tamas Lukacsovich et al. 2003; T Lukacsovich et al. 1999). Dicha proteína, contiene un dominio N-terminal, llamado BTB/POZ y un dominio C-terminal formado por motivos de dedos de zinc. Las proteínas formadas por estos tipos de dominios han sido relacionadas para funcionar como represores transcripcionales (Dhordain et al. 1998; Huynh and Bardwell 1998).

Ken es un FT implicado en el desarrollo de los genitales externos y en la pigmentación de las aristas (Castrillon et al. 1993; Tamas Lukacsovich et al. 2003). Además, Ken actúa en el desarrollo o mantenimiento del circuito neural en las fibras gigantes de *Drosophila* (Allen et al. 2007), apoyando la hipótesis de tener un papel en la formación del sistema visual.

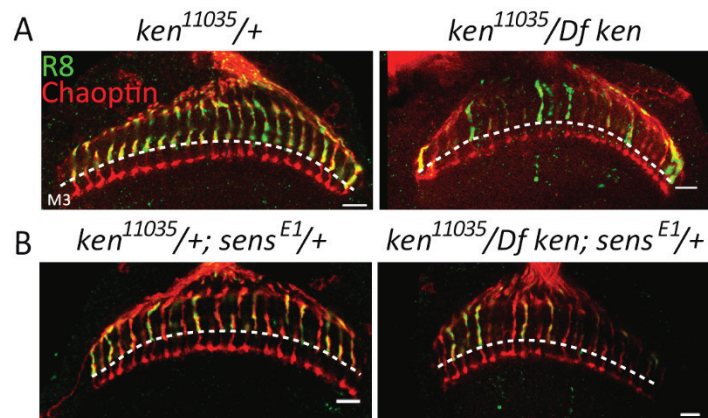
## 2.1 Pérdida de función de *ken* en R8

### 2.2.1 Animales mutantes de *ken*

Para analizar la función de Ken en R8 se utilizaron animales que portaban la mutación *ken*<sup>11035</sup>, siendo el alelo hipomorfo más fuerte. Para corroborar que dicha mutación afectaba a *ken* se realizaron experimentos de complementación cromosómica. Dichos experimentos consistieron en la obtención de moscas mutantes para *ken*<sup>11035</sup> en *trans*-heterocigosis a otras mutaciones hipomorfas de *ken*: *ken*<sup>1</sup> o *ken*<sup>02970</sup>. Ambas combinaciones mostraron un fenotipo basado en una pérdida de coloración de las aristas, el cual era uno de los fenotipos previamente descritos generado por la pérdida de *ken* (Castrillon et al. 1993). Por lo tanto, la mutación *ken*<sup>11035</sup> afectaba al locus de *ken*.

A continuación, se realizó el experimento de pérdida de función de *ken* en animales mutantes *ken*<sup>11035</sup>. Para descartar la aparición de un fenotipo causado por una mutación secundaria en el cromosoma portador de la mutación *ken*<sup>11035</sup>, el animal mutante tuvo en un cromosoma la mutación de *ken* y en *trans*-heterocigosis, una deficiencia cromosómica cubriendo el gen en cuestión. Es importante mencionar que con el objetivo de visualizar los R8s se usó el constructo *sens-Gal4, UAS-utrGFP*.

El resultado de este experimento fue que no se observó un fenotipo de selección de capa en los R8s ya que la gran mayoría eran capaces de llegar a su capa correcta M3 en la *medulla*. Sin embargo, en los animales mutantes se observó un número menor de R8s marcados con GFP comparado con los animales control (Figura 24A).



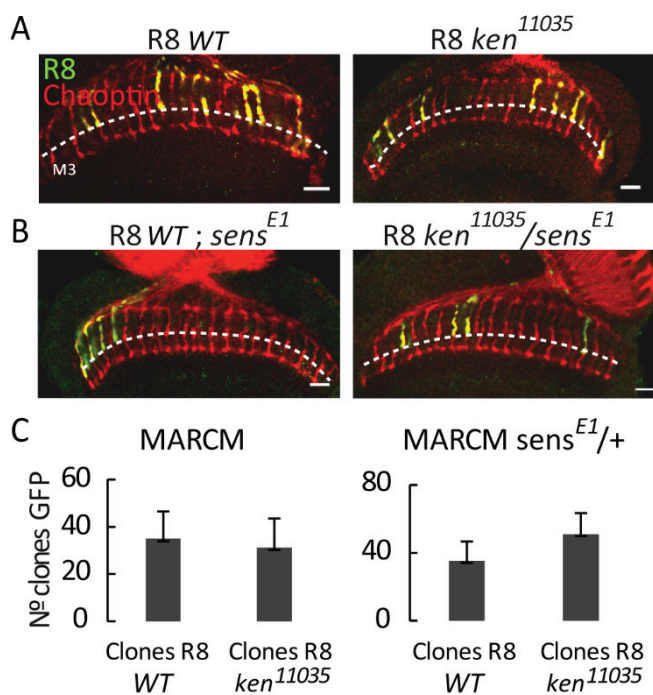
**Figura 24. Animales con pérdida de función de *ken*.** A) Pérdida de función de *ken*. En animales controles (imagen izquierda) los R8s se paran en la capa final M3, al igual que se observó en animales mutantes para *ken* (imagen derecha). Se observó una disminución de R8s marcados con GFP en los animales mutantes. B) Pérdida de función de *ken* en un fondo heterocigoto mutante de *sens*. En un fondo heterocigoto mutante de *sens*, los R8s de animales mutantes llegaban correctamente a su capa M3 (imagen derecha) comparado con animales controles (imagen izquierda). Se observó una reducción de R8s marcados y los marcados, presentaban menor marcaje. Cerebros analizados, n = 7. Barra de escala: 10 μm.

Debido a que no se detectó ningún fenotipo en la selección de capa de R8 en mutantes de *ken* decidimos poner el sistema al límite mediante un fondo heterocigoto mutante de *sens*. De esta manera sería más probable la obtención de un fenotipo ya que los genes regulados por *Sens* funcionarían en menor nivel. El resultado obtenido mostró que en los animales mutantes de *ken* en el fondo mutante establecido, los R8s realizaron correctamente la selección específica de capa. Sin embargo, volvimos a observar la aparición de huecos de R8s sin marcar con GFP y los que estaban marcados presentaban menor marcaje de GFP (Figura 24B).

### 2.2.2 Clones R8 mutantes homocigotos para *ken*

Con el propósito de restringir la mutación de *ken* exclusivamente al R8 y poder observar si la bajada de la tinción de los R8s era autónoma, se utilizó la técnica genética MARCM (ver Materiales y métodos) para generar clones de R8s marcados con GFP mutantes homocigotos para *ken*, en un fondo salvaje no marcado con GFP.

En este caso, el resultado mostró que los R8s mutantes homocigotos para la mutación *ken*<sup>11035</sup>, eran capaces de llegar a su capa correcta en el neuropilo de la *medulla* (Figura 25A).



**Figura 25. Clones mutantes *ken*<sup>11035</sup> en R8.** A) R8s mutantes homocigotos para *ken*. Los clones mutantes de R8 identificaron correctamente su capa (imagen derecha, cerebros analizados, n=13) al igual que los clones WT (*wild type*, salvajes) (imagen izquierda, n=10). B) R8s mutantes homocigotos de *ken* en un fondo heterocigoto mutante de *sens*. En un fondo heterocigoto mutante para *sens* no se observaron defectos en la selección de capa en clones de R8 mutantes (imagen derecha, n=13) comparado con clones WT (imagen izquierda, n=9). C) Representación gráfica del número de clones mutantes R8 de *ken*. La diferencia entre el número de clones WT y mutantes no fue significativa (gráfica izquierda). En un fondo mutante heterocigoto de *sens* el número de clones WT y de clones mutantes de *ken* fue similar (gráfica derecha). Test estadístico: Kruskal-Wallis, p-valor= 0,05. Número de clones: promedio de R8s marcados con GFP. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

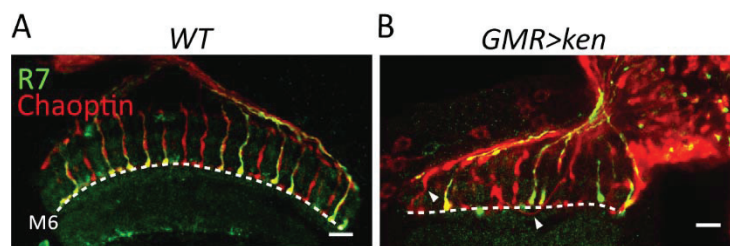
Este resultado volvía a sugerir que Ken no estaba implicado en la selección final de capa del R8. El número de clones R8 mutantes marcados con GFP fue similar al número de clones R8 salvajes marcados con GFP (Figura 25C). Sin embargo, para confirmar que realmente Ken no estaba implicado en este proceso se realizó el mismo experimento que el previamente explicado, pero en este caso, las moscas portaron un fondo mutante heterocigoto para *sens*, lo cual podría forzar el sistema provocando así un fenotipo en R8. El resultado desveló que los R8s mutantes homocigotos faltándoles una copia de *sens* fueron capaces de detectar correctamente su capa final (Figura 25B) y nuevamente el número de clones de R8 mutantes y salvajes fue similar (Figura 25C). Por lo que se podría concluir que Ken no estaría implicado en la selección final de capa de R8.

## 2.2 Ganancia de función de *ken* en R7

Los datos obtenidos del *RNA-seq* mostraron que *ken* está claramente enriquecido en R8 y muy débilmente expresado en R7 a 40h DFP. Este hecho sugería que Ken podría estar reprimido en R7 a través de Pros ya que mostraba sitios putativos de unión para este. Entonces, nos

preguntamos si un incremento en la expresión de *ken* en R7 provocaría un cambio en la selección de capa, pudiéndose comportar como un R8. Para llevar a cabo dicho experimento se sobreexpresó *ken* (*UAS-ken*) de forma ectópica en los fotorreceptores mediante el sistema *STaR GMR-Gal4*. Los R7s se visualizaron a través de una flipasa específica hasta 88h DFP, por lo que para observar el resultado se diseccionaron cerebros en la etapa de pupa a 88h DFP, etapa en la que R7 y R8 ya se encuentran en su capa final.

El resultado mostró que los R7s llegaban a su destino final de forma correcta (Figura 26). Por otra parte, se observaron algunos fenotipos inespecíficos, consistiendo en desplazamientos de R7s o R8s hacia columnas colindantes causando la desorganización de los fotorreceptores en la *medulla*. Dichos fenotipos no ocurrían de forma frecuente, sugiriendo que la expresión ectópica de *ken* en los fotorreceptores podría alterar diferentes rutas génicas provocando dichos fenotipos.



**Figura 26. Sobreexpresión de *ken* en fotorreceptores a 88h DFP.** A) Animales salvajes (*WT*, *wild type*). En moscas *WT* los R7s alcanzaban su capa final M6 (cerebros analizados, n= 4). B) Animales con sobreexpresión de *ken* en los fotorreceptores. Al expresar de forma ectópica *ken* en los fotorreceptores los R7s llegaban correctamente a su capa M6, pero se observaron fenotipos inespecíficos en la organización de los mismos (triángulos blancos, n=6). Barra de escala: 10  $\mu$ m.







## **Capítulo 3**

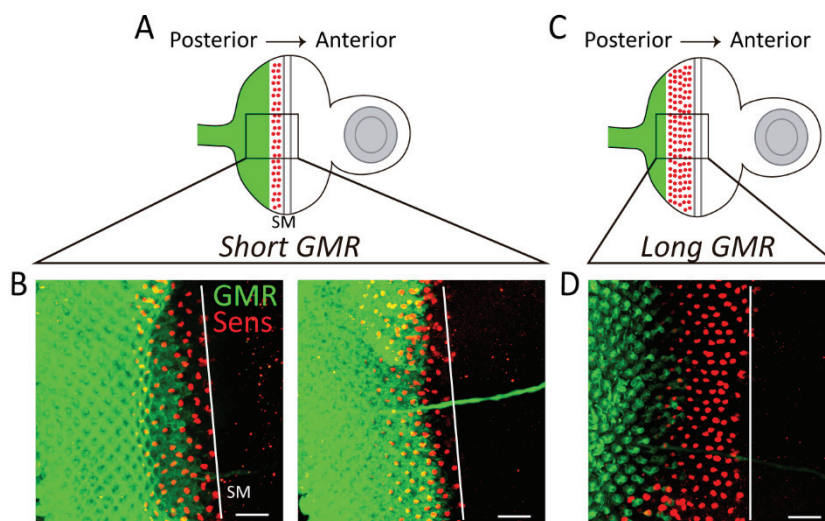
**Estudio de los genes enriquecidos en R8 durante todo el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP) y antes de su inicio (40h DFP) mediante RNAi**



### 3. Estudio de los genes enriquecidos en R8 durante todo el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP) y antes de su inicio (40h DFP) mediante RNAi

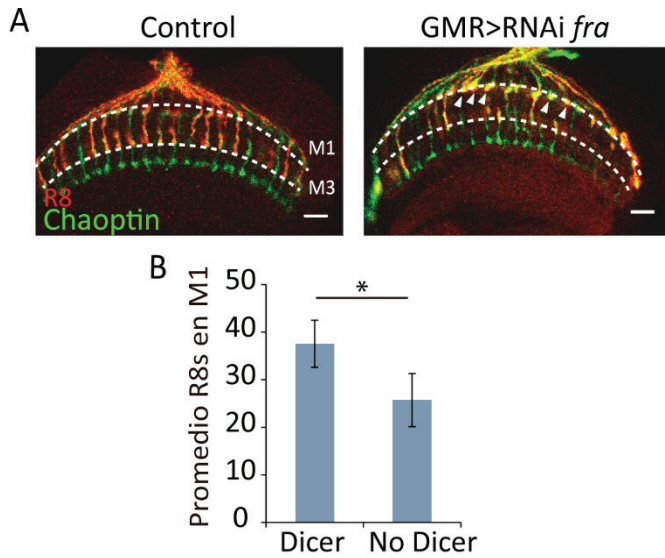
#### 3.1 Puesta a punto del *screen* mediante RNAi: control positivo y comprobación del *driver GMR-Gal4*

Previamente al inicio del estudio de una parte de los genes enriquecidos en R8 se comprobó que las técnicas utilizadas para la expresión del RNAi funcionaran correctamente. Para ello, se comprobó la eficacia del *driver GMR-Gal4*, el cual permitía la expresión del RNAi en los fotorreceptores. Mediante su combinación con el transgen *UAS-mCD8GFP* se observó que la expresión de GFP en discos imaginales de ojo se producía justo detrás del SM en los fotorreceptores. Esto significaba que el *driver GMR-Gal4* del sistema *STaR* y del sistema *Rh6 GMR-Gal4* (compartían el mismo *driver*) se expresaba justo al diferenciarse los fotorreceptores (este tipo de *driver* se llama *short GMR*) a diferencia de otros tipos de *drivers GMR-Gal4* que se expresaban más tarde en el desarrollo (expresión más alejada del SM, *long GMR*) (Figura 27).



**Figura 27. Comprobación de la expresión del *driver GMR-Gal4*.** A) Representación esquemática de un disco imaginal de ojo en el que el *driver short GMR-Gal4* expresaba GFP en los fotorreceptores justo detrás del SM. Los R8s se representan en rojo. B) Disco imaginal de ojo con expresión de GFP bajo el control de *GMR-Gal4* del sistema *STaR* (izquierda) y del sistema *Rh6 GMR-Gal4*. En ambos casos, la expresión de GMR comienza justo detrás del SM (indicado por el inicio de expresión de Sens): *Short GMR*. C) Esquema de un disco de ojo en el que el *driver long GMR-Gal4* expresaba GFP en los fotorreceptores más tarde que en el caso del *short GMR-Gal4*. D) Disco imaginal de ojo con expresión de GFP bajo el control del *driver long GMR-Gal4*. Barra de escala: 20 µm.

Para saber si ambos sistemas eran capaces de producir un fenotipo en R8 se combinaron con el RNAi de *fra*, que es un gen implicado en la guía axonal de R8 (Timofeev et al., 2012) (Figura 28A).

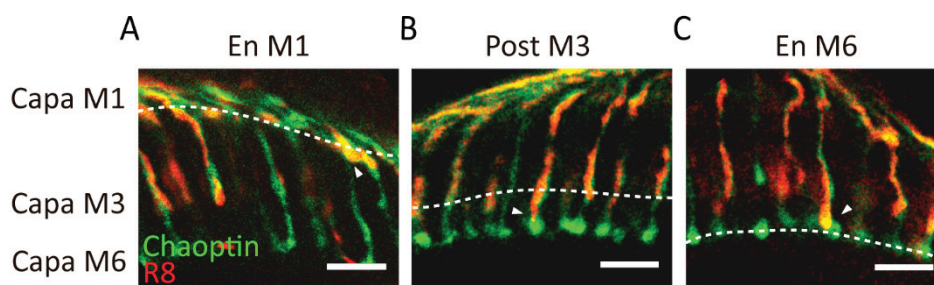


**Figura 28. Establecimiento del control negativo del screen mediante RNAi.** A) Expresión del RNAi de *fra* en los fotorreceptores. La expresión del RNAi de *fra* en los fotorreceptores mediante el driver del sistema *STaR GMR-Gal4* (imagen derecha) y el sistema *Rh6 GMR-Gal4* produjo que una parte elevada de R8s se parasen de forma errónea en la capa M1 (la imagen representa el fenotipo con el primer sistema mencionado ya que el resultado fue idéntico). B) Efecto de la enzima Dicer2 en la expresión del RNAi. La expresión de la enzima Dicer2 junto con la expresión del RNAi de *fra* produjo un fenotipo mayor en R8 (413 R8s con fenotipo en M1) comparado con el fenotipo producido sin la expresión de Dicer2 (257 R8s con fenotipo en M1). Cerebros analizados, n= 11. Test estadístico: T-Student, p-valor= 0,05. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

El resultado mostró una cantidad elevada de R8s detenidos en la capa M1, debido a la expresión del RNAi de *fra* en los fotorreceptores. También se confirmó que la enzima Dicer2 funcionaba correctamente, al producir un número mayor de fenotipos en R8 con el RNAi de *fra*, comparado con la expresión del RNAi de *fra* sin la enzima Dicer2 (Figura 28B).

### 3.2 Tipos de fenotipos observados en R8

En el transcurso del screen de los genes enriquecidos en R8 mediante 2 líneas de RNAi por cada gen, se observaron diferentes tipos de fenotipos en la selección de capa del R8 (Figura 29):



**Figura 29. Tipos de fenotipos observados en R8.** A) Fenotipo R8 en M1. Los R8s se paran en la capa M1 de la *medulla*, antes de llegar a su capa final M3 (En M1). B) Fenotipo R8 post M3. Los R8s sobrepasan su capa final M3 (Post M3). C) Fenotipo R8 en M6. Los R8s sobrepasan su capa final, deteniéndose en la capa M6 (En M6). Cada fenotipo está indicado con un triángulo blanco. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

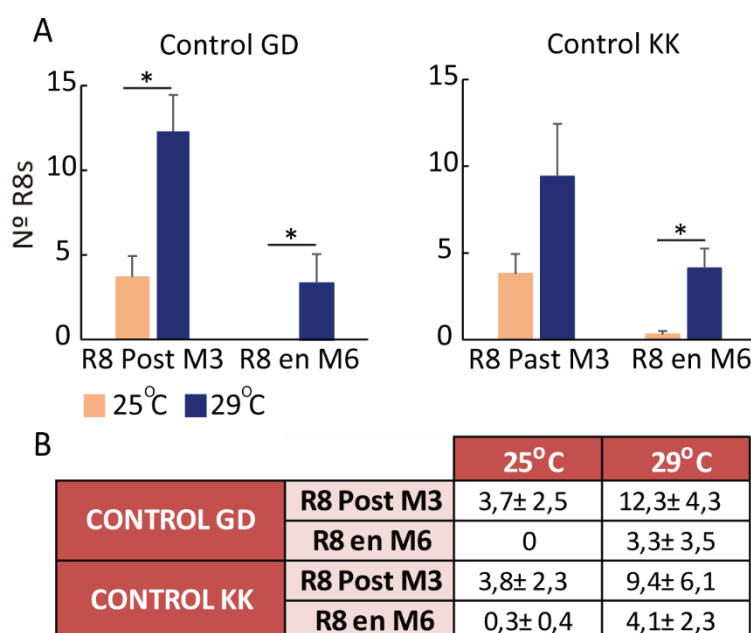
- En M1 (M1): los R8s se detenían antes de llegar a su destino final correcto en la capa de la *medulla* M1 (Figura 29A). Este fenotipo era especial debido a que apenas estaba presente en los controles empleados.
- Posterior a M3 (PM3 o post M3): los R8s se paraban una vez sobrepasaban su capa final M3 de la *medulla* (Figura 29B)
- En M6 (M6): los R8s se detenían en la capa receptora de los R7s en la *medulla*, M6 (Figura 29C).

El estudio de los genes enriquecidos en R8 mediante RNAi se realizó mediante dos técnicas (ver Materiales y métodos) que diferían en la forma visualizar los R8s.

### 3.3 Comparación de las técnicas empleadas: *STaR GMR-Gal4* y *Rh6 GMR-Gal4*

En esta tesis se utilizaron dos métodos para el estudio de los genes enriquecidos en R8 procedentes del enfoque no sesgado. Inicialmente se usó el sistema *STaR GMR-Gal4* y a continuación, se empleó el sistema *Rh6 GMR-Gal4* (ver Materiales y métodos). Con ambos métodos el RNAi se expresó mediante el *driver GMR-Gal4*, potenciando su eficiencia mediante la enzima Dicer2. Sin embargo, los dos sistemas eran diferentes en la forma en la que se visualizaban los R8s.

En el sistema *STaR GMR-Gal4* los R8s se marcaban gracias a una flipasa específica de R8 que permitía la escisión de un casete de *STOP* produciendo la expresión de *myr-tdTom* en el R8. No obstante, durante el *screen* nos percatamos de algunas limitaciones de este sistema. Una parte de R7s aparecían marcados debido a la actividad de la flipasa en R7 con baja frecuencia. Además, se detectaron fenotipos con baja frecuencia en la selección de capa del R8 en animales controles, que no estaban expresando el RNAi, debido al aumento de temperatura de 25°C a 29°C (temperatura establecida para la expresión de los RNAi) y a la carga transgénica (Figura 30). Este experimento se realizó con los controles de las líneas de RNAi procedentes de VDRC (librerías KK y GD).



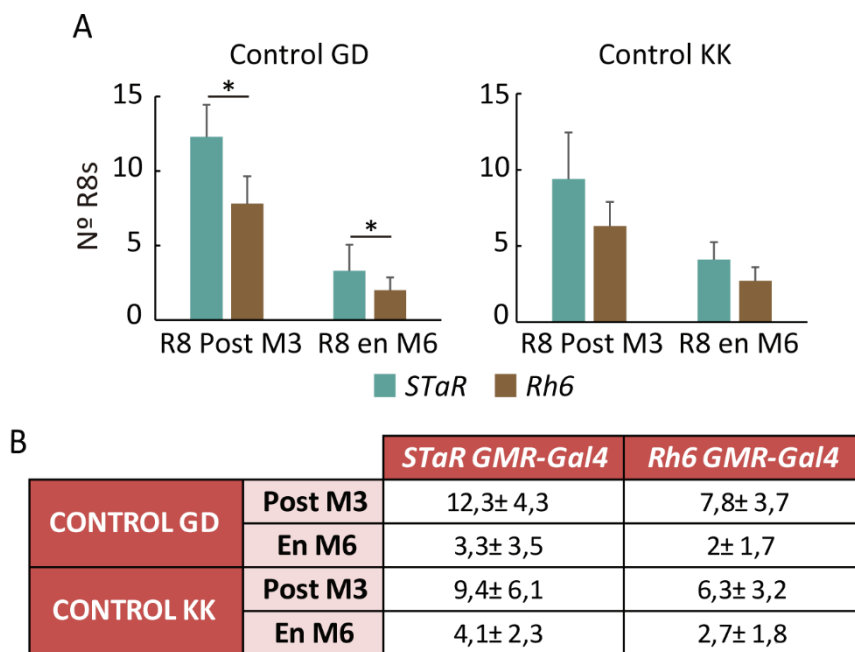
**Figura 30. Control de temperatura del sistema *STaR GMR-Gal4*.**

A) Representación gráfica del fondo fenotípico en controles GD y KK según la temperatura. Los animales controles GD y KK mostraron en menor frecuencia fenotipos en R8 a 25°C comparado con 29°C. B) Valor numérico del fondo fenotípico en controles GD y KK. La diferencia entre los fenotipos R8 a 25°C y 29°C fue estadísticamente significativa tanto en controles GD, como KK. Nº R8: promedio del fenotipo. Cerebros analizados, n control GD= 9 (29°C), 7 (25°C), n control KK= 10 (29°C), 7 (25°C). Test estadístico: Kruskal-Wallis, p-valor= 0,05.

El hecho de que un pequeño porcentaje de R7s estuvieran marcados indicaba que era factible confundirlos con R8s que se parasen de forma errónea en la capa de R7, interpretándolos como falsos positivos.

El gen *rhodopsin 6 (Rh6)* es una opsina que se expresa en el 70% de los R8s. Por lo que para visualizar los R8s se utilizaron animales que portaban un transgen formado por una parte del promotor de *Rh6* el cual dirigía la expresión de *lacZ*, actuando así como gen reportero, permitiendo la visualización de los R8s. De esta manera los R7s no se marcaban y además, la cuantificación fenotípica fue más precisa ya que se calculó como el porcentaje de R8s defectuosos (ver Materiales y métodos).

La comparación entre los controles del sistema *STaR GMR-Gal4* y del sistema *Rh6 GMR-Gal4* mostró que la aparición de fenotipos de R8 post M3 o en M6 disminuyó a 29°C con el sistema *Rh6 GMR-Gal4*, concluyendo que con este, la detección de fenotipos en R8 era más acertada pudiendo evitar resultados falsos positivos (Figura 31). Para realizar la comparación de los dos sistemas la cuantificación de fenotipos en R8 con el sistema *Rh6 GMR-Gal4* no se representó como un porcentaje, si no como el promedio de R8s con fenotipo.



**Figura 31. Comparación entre el sistema *STaR GMR-Gal4* y el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.** A) Representación gráfica del fondo fenotípico en controles GD y KK según el sistema empleado. En los controles GD y KK, utilizando el sistema *Rh6 GMR-Gal4*, los fenotipos post M3 y en M6 de R8 fueron menores que al utilizar el sistema *STaR GMR-Gal4*. Dicha diferencia fue estadísticamente significativa en los controles GD. B) Valor numérico del fondo fenotípico según el sistema empleado. Nº R8: promedio del fenotipo. Cerebros analizados, n control GD: *STaR GMR-Gal4*= 9, *Rh6 GMR-Gal4*= 13; n control KK: *STaR GMR-Gal4*= 10, *Rh6 GMR-Gal4*= 13. Test estadístico: Kruskal-Wallis, p-valor= 0,05.

Estos resultados provocaron el cambio de la metodología empleada en el *screen*, para así mejorar el ruido fenotípico producido por el fondo genético y la aparición de falsos positivos. Alterar este tipo de parámetros fue fundamental para garantizar la obtención de unos resultados adecuados en el *screen* mediante RNAi.

### 3.4 Screen de los genes enriquecidos en R8 procedentes del enfoque no sesgado mediante RNAi

#### 3.4.1 Genes enriquecidos durante todo el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP)

La comparación del transcriptoma de R7 y R8 a cada tiempo analizado resultó en la obtención de este grupo de genes que estaban más expresados en R8 durante todo el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP). Para proceder a su estudio se llevó a cabo el *screen* genético de estos genes mediante el sistema *STaR GMR-Gal4*.

Este grupo estaba formado por 18 genes y se testaron un total de 32 líneas de RNAi. Los resultados de este análisis están representados en la Tabla 11 (Anexo 1). Tal y como se observa en la Tabla 11, 10 de 18 genes fueron candidatos por presentar un fenotipo en R8 al ser silenciados con una línea de RNAi o con dos. Con respecto al fenotipo observado, 3 genes mostraron el fenotipo en M1, el cual no estaba presente en los controles, 1 gen mostró el fenotipo post M3, 3 genes mostraron el fenotipo en M6 y 3 genes mostraron el fenotipo en M1 y en M6 con la misma línea de RNAi.

El criterio para seleccionar estos genes candidatos se basó en establecer un *fc* con respecto a sus controles apropiados mayor o igual a 1,6 y que al menos una línea de RNAi mostrara fenotipo en los tres cerebros analizados. En el caso de los genes que mostraron el fenotipo en M1 se eligieron si mostraban fenotipos en al menos una línea de RNAi en los tres cerebros sin tener en cuenta el *fc*, ya que dicho fenotipo apenas estaba presente en los controles. Para confirmar una función de estos genes candidatos en la guía axonal del R8 se realizaron más experimentos que serán mencionados posteriormente.

#### 3.4.2 Genes enriquecidos en R8 antes del inicio del proceso final de selección de capa (40h DFP): Genes del grupo de R8 y del grupo específico de R8

Ambos grupos proceden del análisis de la correlación de redes génicas al comparar el transcriptoma de R7, R8 y tres NLs. El estudio de estos genes se realizó con el sistema *STaR GMR-Gal4*. El criterio establecido para elegir los genes candidatos fue que el *fc* fuese mayor a 1,8 para el grupo de R8 y mayor que 2,4 en el caso del grupo específico de R8. En ambos casos los genes seleccionados mostraron fenotipo en los tres cerebros analizados en al menos una línea de RNAi. Los genes que mostraron el fenotipo en M1 se eligieron siguiendo el mismo criterio que en el anterior grupo explicado.

Respecto al grupo de R8 estudiamos 41 genes, testando 75 líneas de RNAi (Tabla 12, Anexo 1). En este caso, 34 genes mostraron un fenotipo en R8: 4 genes con fenotipo en M1, 27 genes con fenotipo en M6, 1 gen con fenotipo post M3 y en M6 con la misma línea de RNAi y 2 genes con fenotipo en M1 y en M6 con la misma línea o con líneas diferentes de RNAi.

El grupo específico de R8 lo formaron 32 genes, siendo testadas un total de 57 líneas de RNAi (Tabla 13, Anexo 1). Tras su análisis, 9 genes mostraron fenotipos en R8: 6 genes con fenotipo en M1, 1 gen con fenotipo en M1 y post M3 con diferentes líneas de RNAi, 1 gen con fenotipo en M1 y en M6 con diferentes líneas de RNAi y 1 gen con fenotipo post M3 y en M6.



**Re-screen mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4***

Como se ha explicado anteriormente, en un momento determinado del *screen* nos percatamos de que el sistema *STaR GMR-Gal4* producía falsos positivos debido al marcaje de algunos R7s, pudiendo ser confundidos con R8s defectuosos en la capa M6. Por esta razón, decidimos realizar un *re-screen* mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4* de una parte de los genes candidatos que habían sido seleccionados hasta el momento y así confirmar el fenotipo previamente obtenido.

Se seleccionaron un conjunto de genes que en su mayoría mostraron el fenotipo de R8 en M6, con el objetivo de comprobar su autenticidad. También, se seleccionaron genes que mostraron el fenotipo post M3 para confirmarlos con el sistema *Rh6 GMR-Gal4*. Además, se incluyeron algunos de los genes que mostraron el fenotipo en M1, siendo este un fenotipo interesante ya que no estaba presente en los controles empleados. Así, se eligieron un total de 19 genes para el *re-screen*, de un total de 48 genes candidatos hasta el momento (para el cálculo de los 48 genes candidatos se tuvo en cuenta el solapamiento de genes entre los grupos).

En la tabla 6 se indica la selección de los genes elegidos para el *re-screen* y el fenotipo obtenido mediante el sistema *STaR GMR-Gal4*. Además, también se representa la presencia del fenotipo en las líneas de RNAi analizadas. Así, se observó que el fenotipo podía producirse con las dos líneas utilizadas por cada gen en los tres cerebros observados, con las dos líneas de RNAi pero solo una con fenotipo en los tres cerebros, con una línea de RNAi en todos los cerebros o con las dos líneas pero el fenotipo no se producía en los tres cerebros.

Genes	Fenotipo R8	Líneas RNAi con fenotipo
<i>Ssl2</i>	PM3/M6	2 en todos los cerebros
<i>Coop</i>	M6/M1	2, solo 1 en todos los cerebros
<i>CG6421</i>	M6/M1	2, solo 1 en todos los cerebros
<i>Mtn A</i>	M6	2, solo 1 en todos los cerebros
<i>CG14132</i>	M6	2, solo 1 en todos los cerebros
<i>CG13062</i>	M6	2, solo 1 en todos los cerebros
<i>CG43462</i>	M1	2, solo 1 en todos los cerebros
<i>CG12880</i>	M6	1 en todos los cerebros
<i>CG7330</i>	M6	1 en todos los cerebros
<i>CG31808</i>	M6	1 en todos los cerebros
<i>GstE11</i>	PM3/M6	1 en todos los cerebros
<i>CG13532</i>	M1/PM3/M6	1 en todos los cerebros
<i>CG17265</i>	PM3	1 en todos los cerebros
<i>CG9782</i>	M1	1 en todos los cerebros
<i>Tsf1</i>	M1	1 en todos los cerebros
<i>Ppn</i>	M1	1 en todos los cerebros
<i>CG13033</i>	M1	2, ninguna en todos los cerebros
<i>AlphaPS5</i>	M1	2, ninguna en todos los cerebros
<i>5-HT1B</i>	M1	2, ninguna en todos los cerebros

**Tabla 6. Genes candidatos para repetir su estudio con el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.** Se eligieron 19 genes para validar el fenotipo obtenido con el sistema *STaR GMR-Gal4*. Dependiendo del gen, los fenotipos se observaron con una línea de RNAi o en las dos. El fenotipo se daba en todos los cerebros testados o no en todos.

Por una parte, una vez que estos genes candidatos se volvieron a testar con el sistema *Rh6 GMR-Gal4*, observamos que de los 10 genes con fenotipo R8 en M6, solo 2 genes seguían mostrando dicho fenotipo: *GstE11* y *CG6421* (Tabla 15, Anexo 1) lo que confirmaba la presencia de falsos

positivos al utilizar el sistema *STaR GMR-Gal4* (Tabla 7). Con respecto al fenotipo post M3, se observó que, de los 3 genes que lo mostraron con el sistema *STaR GMR-Gal4*, solo 1 lo mostró en el *re-screen* (*GstE11*) (Tabla 7). Por otra parte, 6 de los 10 genes que mostraron el fenotipo R8 en M1, aún lo mostraron con el sistema *Rh6 GMR-Gal4* e incluso en 5 de ellos se detectó el fenotipo R8 en M6 (Tabla 7).

Genes	RNAi	Sistema <i>STaR GMR-Gal4</i>			Sistema <i>Rh6 GMR-Gal4</i>		
		M1	PM3	M6	M1	PM3	M6
<i>GstE11</i>	38243 GD	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí
<i>Tsf1</i>	55936 V20	Sí	No	No	Sí	No	No
<i>AlphaPS5</i>	100120 KK	Sí	No	No	No	No	Sí
	6647 GD	Sí	No	No	Sí	No	Sí
<i>5-HT1B</i>	51842 V20	Sí	No	No	Sí	No	No
	33418 V20	Sí	No	No	No	No	Sí
<i>Ppn</i>	16523 GD	Sí	No	No	Sí	No	No
<i>CG43462</i>	102322 KK	Sí	No	No	Sí	No	No
	18706 GD	Sí	No	No	Sí	No	Sí
<i>CG13033</i>	14250 GD	Sí	No	No	No	No	Sí
<i>CG6421</i>	15805 GD	Sí	No	Sí	Sí	No	No
<i>Ssl2</i>	102870 KK	No	Sí	Sí	No	No	No
<i>Coop</i>	29350 V10	Sí	No	Sí	No	No	No
<i>Mtn A</i>	105011 GD	No	No	Sí	No	No	No
<i>CG14132</i>	106561 KK	No	No	Sí	No	No	No
<i>CG13062</i>	101832 KK	No	No	Sí	No	No	No
<i>CG12880</i>	1313 GD	No	No	Sí	No	No	No
<i>CG7330</i>	35620 V22	No	No	Sí	No	No	No
<i>CG31808</i>	101864 KK	No	No	Sí	No	No	No
<i>CG13532</i>	105696 KK	Sí	Sí	Sí	No	No	No
<i>CG17265</i>	101468 KK	No	Sí	No	No	No	No
<i>CG9782</i>	102259 KK	Sí	No	No	No	No	No

**Tabla 7. Conservación fenotípica en el *re-screen* mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.** Se representa la conservación de cada fenotipo en R8 (en M1, post M3 y en M6) al utilizar el sistema *STaR GMR-Gal4* y el sistema *Rh6 GMR-Gal4* en los 19 genes elegidos. Los genes remarcados en color verde mantuvieron el mismo fenotipo con ambos sistemas (Sí: rojo), lo mantuvieron y además se detectó un nuevo fenotipo (Sí: verde) o no lo mantuvieron pero se observó un fenotipo diferente (Sí: verde).

Estos resultados pusieron de manifiesto que el sistema *STaR GMR-Gal4*, además de producir falsos positivos, podría enmascarar la detección del fenotipo R8 en M6. Esto ocurriría debido a que con dicho sistema los fenotipos en M6 no se detectarían, ya que los controles presentaban un fondo fenotípico mayor que el sistema *Rh6 GMR-Gal4* (Figura 31).

Tras la realización de este *re-screen* decidimos descartar el resto de genes que mostraron el fenotipo en M6 con el sistema *STaR GMR-Gal4*, ya que lo más probable es que se tratase, de nuevo, de falsos positivos.

De esta parte se concluye que de los grupos de genes: grupo de R8 y grupo específico de R8, se obtuvieron un total de 8 genes interesantes: *GstE11*, *Tsf1*, *AlphaPS5*, *5-HT1B*, *Ppn*, *CG43462*, *CG6421* y *CG13033*.

#### **Re-screen mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4 + eyeless-Gal4***

Los fenotipos observados mediante los sistemas *STaR GMR-Gal4* y *Rh6 GMR-Gal4* no fueron elevados. Una explicación a este hecho podía ser que los genes testados se expresaran en una etapa del desarrollo previa a la expresión de *GMR*, siendo capaces de realizar su función antes de ser silenciados mediante el RNAi. Para comprobar esta hipótesis se eligió una parte de los genes más interesantes con el objetivo de expresar el RNAi mediante el *driver eyeless (ey3.5)-Gal4* junto con *GMR-Gal4*. De esta manera, la expresión del RNAi ocurría antes en el desarrollo ya que *eyeless* se expresa en un tiempo más temprano que *GMR*. Otro motivo por el que se realizó este *re-screen* fue para producir fenotipos que podrían ser indetectables mediante la expresión del RNAi bajo el control del *driver GMR-Gal4*. Por todo ello, se eligieron genes que presentaban fenotipos bajos con el sistema *Rh6 GMR-Gal4* (*GstE11* y *CG6421*) y genes en los que no se detectó un fenotipo con dicho sistema (*CG17265*, *CG13062* y *CG12880*). Los resultados obtenidos están representados en la Tabla 16 (Anexo 1).

El análisis de los resultados reveló que en los controles utilizados ya había alrededor del 10% de R8s que pasaban de su capa (PM3), mientras el 3% de R8s se paraban de forma errónea en M6. Esto quería decir que estábamos observando fenotipos moderados ya en los controles, por lo que este método no era el idóneo para producir un aumento de fenotipos previamente observados o para producir fenotipos indetectables mediante el *driver GMR-Gal4*. Por consiguiente, se puede concluir que los fenotipos bajos obtenidos se producían debido a otra hipótesis como por ejemplo, por un efecto redundante entre los diferentes genes.

Sin embargo, con este experimento demostramos que *CG13062* y *GstE11* eran genes requeridos en una etapa temprana del desarrollo ya que los animales experimentales permanecían en el interior de la pupa sin cabeza o con cabeza de tamaño reducido (Tabla 16, Anexo 1).

#### **3.4.3 Genes no agrupados sin un patrón de expresión común**

De este grupo se analizaron 92 genes de los 103 que lo componían ya que algunos de los genes no presentaron líneas de RNAi disponibles. En total se testaron 167 líneas de RNAi mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*. De este análisis seleccionamos 35 genes candidatos que mostraban fenotipo en R8 con un *fc* de al menos 2, con respecto a sus controles correspondientes y que al menos una línea de RNAi mostrara fenotipo en los tres cerebros analizados (Tabla 14, Anexo 1). Se observó que 29 genes mostraron el fenotipo en M6, 3 genes con fenotipo en M1, 1 gen con fenotipo post M3, 2 genes con fenotipo en M1 y en M6 con líneas diferentes de RNAi.

### **3.5 Listado final de genes candidatos**

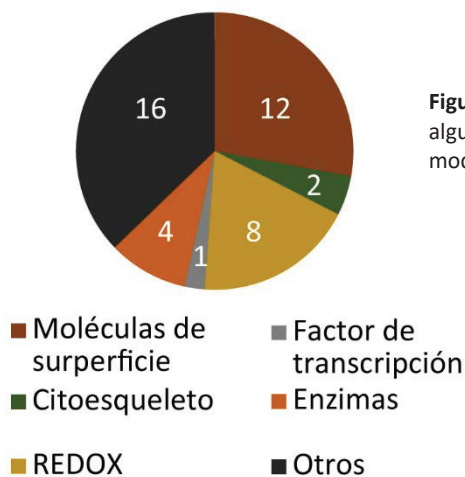
En la siguiente tabla están representados los 43 genes candidatos obtenidos del *screen* con RNAi de los genes enriquecidos en R8 del enfoque sesgado (Tabla 8). De la misma manera, la tabla 8 informa del fenotipo observado en cada caso, el grupo de procedencia de cada gen, los sitios putativos de unión para Sens y Pros y la categoría funcional biológica a la que pertenecen.

Genes	Fenotipo R8	Grupo de procedencia	SU Sens	SU Pros	Categoría funcional
<i>CG9444</i>	M6	No agrupados		X	MSC
<i>Npc2b</i>	M1/M6	No agrupados			MSC
<i>Clect27</i>	M6	No agrupados	X	X	MSC
<i>CG11069</i>	M6	No agrupados		X	MSC
<i>Fkbp13</i>	M6	No agrupados	X	X	MSC
<i>CG5883</i>	M1	No agrupados			MSC
<i>Tsf1</i>	M1	Específico de R8			MSC
<i>Ppn</i>	M1	R8	X	X	MSC
<i>5-HT1B</i>	M1	Enriquecidos en todos los tiempos	X	X	MSC
<i>AlphaPS5</i>	M1/ M6	Enriquecidos en todos los tiempos			MSC
<i>CG13033</i>	M6	Enriquecidos en todos los tiempos		X	MSC
<i>CG43462</i>	M1/M6	R8/Enriquecidos en todos los tiempos			MSC
<i>esn</i>	M6	No agrupados	X	X	Citoesqueleto
<i>CG32137</i>	M6	No agrupados	X	X	Citoesqueleto
<i>CG40485</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>laccase2</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>CG33178</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>GstE14</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>GstE11</i>	PM3/M6	Específico de R8			REDOX
<i>CG5653</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>Cyp301a1</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>CG8306</i>	M6	No agrupados		X	REDOX
<i>CG6218</i>	M6	No agrupados			Enzimas
<i>CG11836</i>	M6	No agrupados			Enzimas
<i>CG32052</i>	M1	No agrupados		X	Enzimas
<i>CG6421</i>	M1/M6	R8			Enzimas
<i>dve</i>	M1/PM3/M6	No agrupados	X	X	FT
<i>Thor</i>	M6	No agrupados		X	Otros
<i>CG30154</i>	M6	No agrupados		X	Otros
<i>Cpr49Ae</i>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<i>CG11686</i>	M6	No agrupados			Otros
<i>Tpr2</i>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<i>CG10126</i>	M6	No agrupados			Otros
<i>CG17777</i>	M6	No agrupados			Otros

<b>CG14567</b>	M6	No agrupados			Otros
<b>CG8420</b>	M6	No agrupados			Otros
<b>CG14397</b>	M6	No agrupados		X	Otros
<b>CG32521</b>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<b>CG13117</b>	M6	No agrupados			Otros
<b>CG1722</b>	M6	No agrupados			Otros
<b>Scp2</b>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<b>CG6026</b>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<b>CG2016</b>	PM3	No agrupados			Otros

**Tabla 8. Genes candidatos procedentes del screen mediante RNAi.** Se indica el nombre de cada gen, el tipo de fenotipo RNAi en R8, el grupo de procedencia, la presencia de sitios putativos de unión para Sens y/o Pros y, por último, la categoría funcional a la que pertenecen.

Las categorías biológicas resultaron de la búsqueda de información sobre los dominios proteicos de los genes candidatos. De esta manera, obtuvimos categorías biológicas que resultaron ser importantes por estar íntimamente relacionadas con el proceso de la guía axonal: FTs, MSC y moléculas modificadoras del citoesqueleto (citoesqueleto). Además, se obtuvieron otras categorías como enzimas implicadas en procesos de oxidación-reducción (REDOX) y otra categoría formada por genes relacionados con procesos metabólicos (otros) (Figura 32). Dichas categorías sugerían que el estado REDOX de las neuronas y su metabolismo celular podrían jugar un papel importante en el proceso de la guía axonal.



**Figura 32. Clasificación funcional de los genes candidatos.** Se obtuvieron algunas categorías funcionales implicadas en la guía axonal: MSC, modificadores del citoesqueleto y FTs.





## **Capítulo 4**

# **Validación de los fenotipos RNAi**





## 4. Validación de los fenotipos RNAi

### 4.1 Búsqueda bibliográfica de líneas mutantes e inserciones

Para continuar con el estudio de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP, procedimos a validar los fenotipos obtenidos al silenciar los genes mediante RNAi. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica y en bases de datos de inserciones disponibles para cada gen candidato (*Flybase*, *Pubmed*, *Gene Disruption Project database*). Un aspecto interesante que observamos fue que algunos de los genes tenían ya una función en el SN o estaban relacionados con él:

- *esn*: es un gen que codifica una proteína con un dominio llamado LIM implicado en modificar el citoesqueleto. Animales mutantes para *esn* mostraban un fenotipo en la repulsión de las dendritas de neuronas de la etapa larvaria de *Drosophila* (D. Matsubara et al. 2011).
- *4E-BP (Thor)*: codifica para una proteína de unión al factor de iniciación de la traducción cuya función está regulada por Tor, contribuyendo así a la regulación de la traducción, la respuesta al estrés ambiental y el crecimiento celular (Glatter *et al.*, 2011; Hay and Sonenberg, 2004; Tee and Blenis, 2005). Thor presentaba un papel protector frente a la enfermedad de Parkinson (Tain et al. 2009). Además, mutantes de *Thor* han mostrado fenotipos en la guía axonal de los fotorreceptores y de sinapsis (Dimitroff et al. 2012).
- *Cyp301a1*: es una enzima REDOX relacionada con demencia ya que se ha demostrado que interacciona genéticamente con una proteína asociada a los microtúbulos llamada Tau, la cual está involucrada en algunos tipos de demencia (Butzlaff et al. 2015).
- *GstE11*: codifica para una enzima REDOX indirectamente relacionada con el SN. Se ha demostrado que otras familias de este tipo de enzimas tienen un papel protector en situación de estrés oxidativo en el SN (S. Y. Lee et al. 2015) y también, un papel en la patogénesis del Parkinson (Kim and Yim 2013).
- *Npc2b*: codifica para una MSC que está directamente relacionada con el SN ya que moscas mutantes para este gen muestran defectos en el transporte axonal en la unión neuromuscular (X. Huang et al. 2007).
- *Tpr2*: es un gen implicado en la interacción entre proteínas y en el ensamblaje de complejos multiproteicos. Estudios previos demuestran que este gen podría tener un efecto protector de los defectos tóxicos producidos por la acumulación de poliglutamina, causada por la enfermedad de Huntington y otras enfermedades neurodegenerativas (Kazemi-Esfarjani and Benzer 2000). Además, gracias a un sistema predictivo mediante algoritmos se postula que Tpr2 tendría una probabilidad del 90% de estar implicado en la formación de la sinapsis (Pazos Obregón et al. 2015).

Al llevar a cabo la selección de las inserciones se tuvo en cuenta que estuvieran afectando la región 5' UTR o la región codificante del gen en cuestión, asegurando así una pérdida de función. El resultado de dicha búsqueda puso de manifiesto que 25 genes tuvieron inserciones disponibles para ser testadas de las cuales 19 eran viables y 6 eran letales (Figura 33).

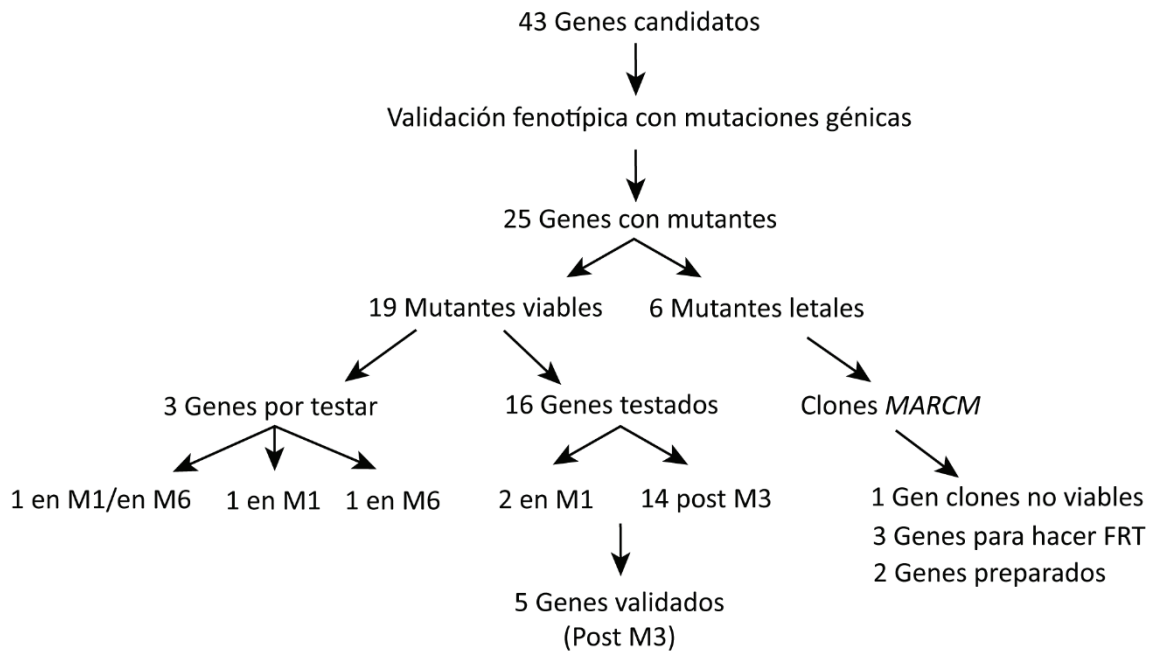


Figura 33. Validación fenotípica de los genes candidatos mediante líneas mutantes e inserciones.

Entre estas inserciones algunas de ellas ya habían sido publicadas en estudios previos, mientras que otras eran desconocidas (Tabla 9). De los 43 genes candidatos, 18 no presentaron mutantes y/o no había información sobre ellos. En concreto, esta tesis se ha centrado en la validación de las inserciones viables debido a que su confirmación se podía realizar de forma inmediata. Con respecto a las inserciones letales su validación se realizaría mediante la técnica *MARCM*. Para algunas de estas inserciones sería necesario generar moscas recombinantes de la inserción y la secuencia FRT necesaria para la obtención de clones *MARCM* (Tabla 9). Por otra parte, los genes sin inserciones disponibles y/o sin información sobre ellos serían candidatos para la obtención de mutantes nulos mediante la técnica CRISPR (Tabla 17, Anexo 2).

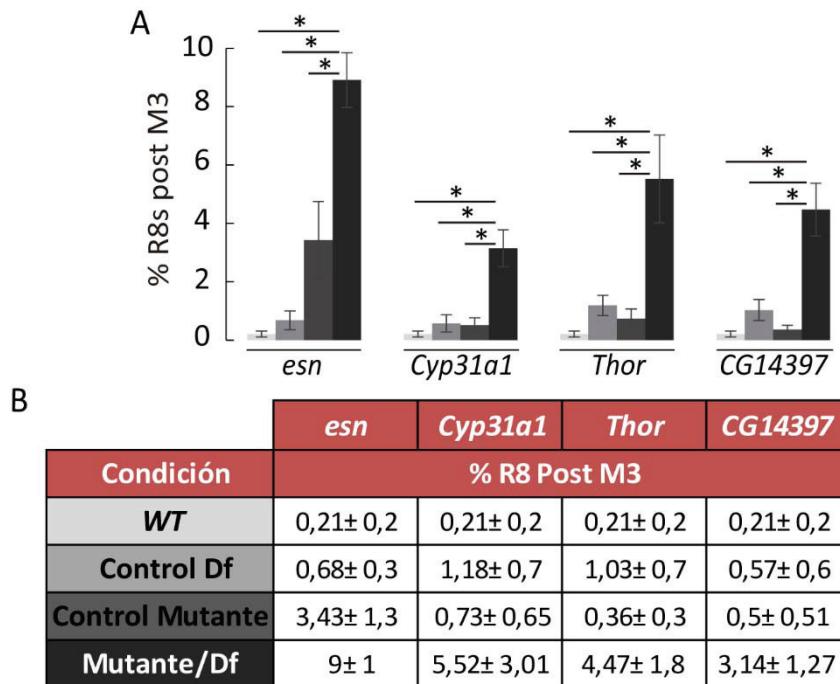
Genes con inserciones viables			
Genes	Mutante o Inserción	Tipo	Función relacionada con el SN
<i>esn</i>	<i>esn</i> <sup>KO6</sup> (Daisuke Matsubara et al. 2011)	Nulo	En dendritas de neuronas de la larva (Daisuke Matsubara et al. 2011)
<i>Thor</i>	<i>Thor</i> <sup>2</sup> (Teleman, Chen, and Cohen 2005)	Nulo	En la sinapsis y guía axonal (Dimitroff et al. 2012)
<i>Cyp31a1</i>	<i>Cyp31a1</i> <sup>f02301</sup> (Sztal et al. 2012)	Hipomorfo	Relacionado con neurodegeneración (Butzlaff et al. 2015)

<b><i>Tpr2</i></b>	<i>Tpr2</i> <sup>Mi11295</sup> (Sztal et al. 2012)	Hipomorfo	Relacionado con neurodegeneración y sinapsis (Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000; Pazos Obregón <i>et al.</i> , 2015)	
<b><i>Npc2b</i></b>	<i>Npc2b</i> <sup>19</sup> (X. Huang et al. 2007)	Nulo	En el transporte axonal de la unión neuromuscular (X. Huang et al. 2007)	
<b><i>GstE11</i></b>	<i>gstE11</i> <sup>d06699</sup>	Desconocido	Otras gsts relacionadas con neurodegeneración (Lee <i>et al.</i> , 2015; Kim and Yim, 2013)	
<b><i>5-HT1B</i></b>	<i>5-HT1B</i> <sup>ΔIII</sup> (Gasque et al. 2013)	Nulo	No	
<b><i>CG32521</i></b>	<i>CG32521</i> <sup>Mi11815</sup> (Müller et al. 2005)	Desconocido	No	
<b><i>AlphaPS5</i></b>	<i>alphaPS5</i> <sup>Mi01533</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG14397</i></b>	<i>CG14397</i> <sup>Mi04770</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG6026</i></b>	<i>CG6026</i> <sup>Mi11998</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG33178</i></b>	<i>CG33178</i> <sup>KG1042</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG11686</i></b>	<i>CG11686</i> <sup>Mae-UAS.6.11.LA00195</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG2016</i></b>	<i>CG2016</i> <sup>Mi04995</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG6218</i></b>	<i>CG6218</i> <sup>KG09249</sup>	Desconocido	No	
<b><i>CG32052</i></b>	<i>CG32052</i> <sup>Mi02380</sup>	Desconocido	No	
<b>Genes con inserciones letales</b>				
<b>Genes</b>	<b>Mutante</b>	<b>Recombinación con FRT</b>	<b>Tipo</b>	<b>Función relacionada con el SN</b>
<b><i>GstE14</i></b>	<i>GstE14</i> <sup>KO</sup> (Enya et al. 2014)	No	Nulo	No
<b><i>Fkbp14</i></b>	<i>Fkbp14</i> <sup>D58</sup> (van de Hoef, Bonner, and Boulianne 2013)	Clones no viables	Nulo	No
<b><i>laccase2</i></b>	<i>laccase2</i> <sup>Mi07159</sup>	No	Desconocido	No
<b><i>dve</i></b>	<i>dve</i> <sup>1</sup> (Kölzer et al. 2003)	Sí	Hipomorfo	Represión de las opsinas Rh3, Rh5 y Rh6 en R1-R6 (Johnston et al. 2011)
<b><i>CG11836</i></b>	<i>CG11836</i> <sup>S006013</sup>	Sí	Desconocido	No
<b><i>CG8420</i></b>	<i>CG8420</i> <sup>Mi12232</sup>		Desconocido	Relacionado con neurodegeneración (Karres et al. 2007)

**Tabla 9. Genes candidatos con líneas mutantes viables y letales.** La tabla representa los genes con líneas mutantes viables y letales. De ambos se indica el tipo de mutante (nulo, hipomorfo o desconocido), la referencia y el fenotipo en el SN.

## 4.2 Validación del fenotipo RNAi

A continuación, se llevó a cabo la validación de los fenotipos obtenidos mediante RNAi según la estrategia establecida (ver Materiales y métodos). Testamos un total de 16 genes de los 19 que tenían mutantes viables, consiguiendo validar el fenotipo en 5 de ellos: *esn*, *Thor*, *Cyp31a1*, *CG14397* y *GstE11* (en este caso la validación se consiguió mediante otro modo que será explicado a continuación) (Tabla 18, Anexo 3, figura 34).



**Figura 34. Genes candidatos validados con líneas mutantes.** A) Representación gráfica de los fenotipos observados con líneas mutantes en 4 genes validados. Se consiguieron validar los fenotipos de 4 genes: *esn*, *Cyp31a1*, *Thor* y *CG14397*. En todos los casos el fenotipo (R8 post M3) mostrado en moscas mutantes en *trans*-heterocigosis a una deficiencia que cubría el gen fue estadísticamente significativo comparado con dos tipos de controles: deficiencia en heterocigosis (Control Df) y mutante en heterocigosis (Control mutante). B) Valores numéricos obtenidos en la validación del fenotipo con líneas mutantes. WT: *wild type*, salvaje. Cerebros analizados, n= 6-8. Test estadístico: Kruskal-Wallis y T-Student, p-valor= 0,05.

Sorprendentemente, 4 de ellos eran algunos de los cuales habían mostrado fenotipos en el SN en estudios previos o tenían alguna relación con el SN: *esn*, *Thor*, *Cyp31a1* y *GstE11*.

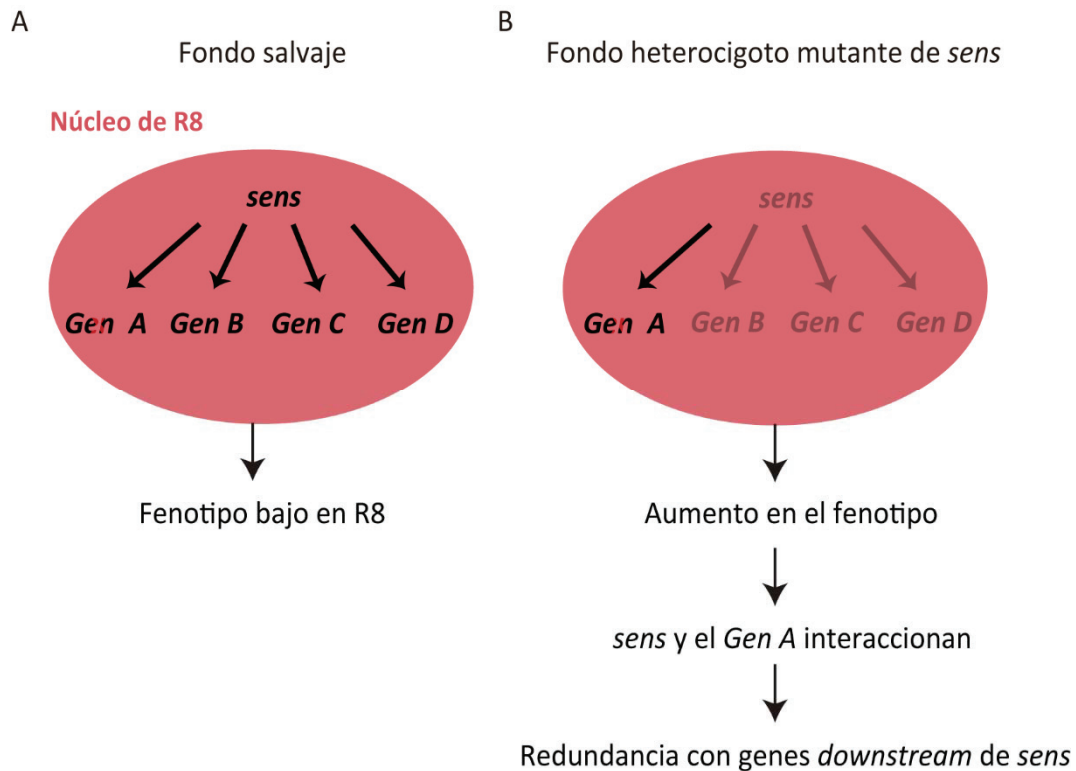
En la presente tesis se ha estudiado en detalle la función de los genes: *esn* y *GstE11*. La razón por la que dichos genes fueron seleccionados se basa en que *esn* estaba relacionado directamente con el SN y además interaccionaba con *fmi*, que es un gen implicado en la selección de capa de R8 (Hakeda-Suzuki et al. 2011). Con respecto a *GstE11*, este gen fue interesante para su estudio detallado debido a que mostró el fenotipo más elevado de R8s al sobrepasar su capa M3 en el *screen* con el sistema *Rh6 GMR-Gal4* (14,4% R8s post M3 y 10,2% de R8s en M6).

### 4.3 Interacción genética con Sens

Un aspecto importante para considerar es que los fenotipos observados en la validación de los fenotipos con líneas mutantes o inserciones no fueron muy elevados. Una posible explicación pudo ser que los mutantes empleados no fueron completamente nulos sin embargo, este sólo fue el caso para 3 de los 5 genes con fenotipos validados: *Cyp31a1*, *CG14397* y *GstE11*. Con respecto a *Thor* y *esn*, los mutantes testados fueron nulos y los fenotipos obtenidos no fueron elevados (*Thor*: 4,5% de R8s post M3, *esn*: 13,28% de R8s post M3). Este hecho nos llevó a pensar que los fenotipos en baja proporción eran el resultado de un proceso de redundancia ya que eliminando completamente un gen, otros podrían suplir dicha pérdida haciendo que el sistema funcionara más o menos de forma adecuada.

Los genes redundantes podrían ser *sens* y los genes regulados por este. Sens es el FT que regula el desarrollo de los R8s (Frankfort et al. 2001), controlando la expresión de proteínas de superficie celular implicadas en la selección de capa del R8, como Caps (Morey et al. 2008; Shinza-Kameda et al. 2006). Además, se ha demostrado que deben haber otros genes adicionales que sean regulados por Sens colaborando en la guía axonal del R8 (Morey et al. 2008). Esto sugería que Sens podría regular la expresión de los genes validados y también la de otros genes enriquecidos en R8.

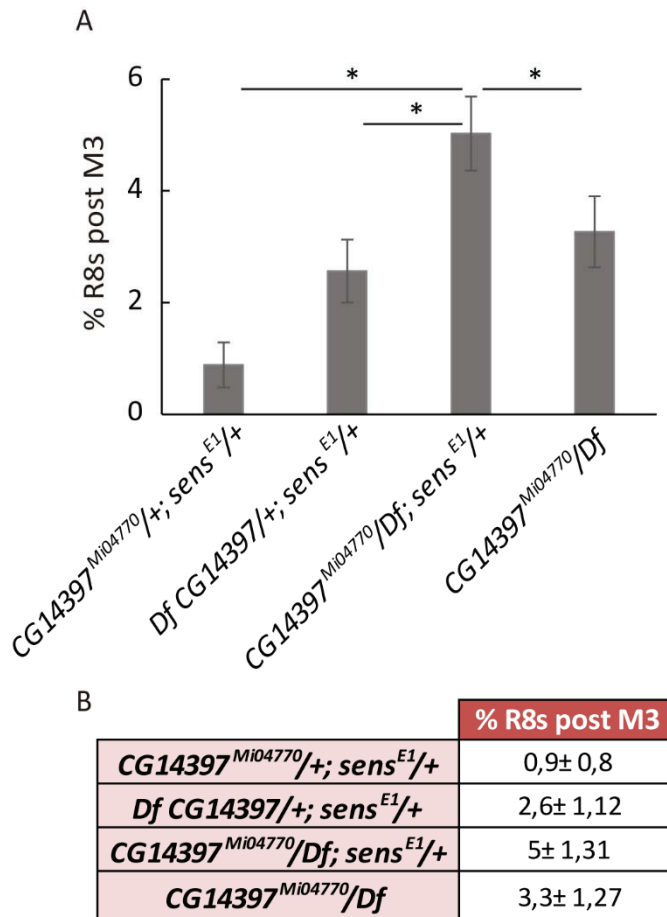
El experimento genético tradicional para identificar una interacción entre genes se basaba en la obtención de moscas mutantes para el gen de interés en un fondo mutante heterocigoto para el otro gen en cuestión. El objetivo era que en estos animales se produjera un fenotipo más fuerte comparado con animales mutantes para el gen en un fondo salvaje. Este aumento fenotípico se generaría debido a que el fondo mutante heterocigoto forzaría el sistema al límite al disminuir la expresión de otros genes (Figura 35). De esta manera, se confirmaría una interacción genética directa o indirecta entre dos genes.



**Figura 35. Interacción genética de los genes candidatos con Sens.** A) Esquema del fenotipo bajo en la validación del fenotipo con líneas mutantes o inserciones. Animales mutantes homocigotos para el gen candidato X (*Gen A*) producen un fenotipo bajo en la selección de capa de R8. B) Esquema de la interacción genética entre *Sens* y los genes candidatos. Animales mutantes para el *gen A* en un fondo heterocigoto mutante de *sens* producirían un mayor fenotipo comparado con la condición genética A). Por lo que *Sens* y el gen de interés interaccionarían genéticamente, indicando un proceso de redundancia con genes regulados por *Sens*.

Este experimento se realizó con el objetivo de identificar una interacción genética entre los genes candidatos y *Sens*, confirmándose así un proceso de redundancia. Para ello, se obtuvieron animales transgénicos mutantes para los genes validados: *esn*, *Thor*, *Cyp3a1* y *CG14397*, en un fondo heterocigoto mutante para *sens*, con el propósito de generar un aumento del fenotipo. Además, también se llevó a cabo en dos genes adicionales: *AlphaPS5* y *Tpr2*, en los que la validación del fenotipo del RNAi no fue evidente ya que la comparación de la condición experimental (mutación/deficiencia) y el control de la deficiencia en heterocigosis (deficiencia/+) no fue estadísticamente significativa. Además, ambos genes presentaban funciones que podrían ser importantes para extensión axonal del R8. *AlphaPS5* es una integrina asociada al proceso de adhesión celular (Hynes and Zhao 2000), mientras que *Tpr2* es una chaperona probablemente implicada en el ensamblaje y función sináptica (Pazos Obregón et al. 2015).

Los resultados mostraron que el único gen que interaccionaba genéticamente con *Sens* fue *CG14397* (Figura 36, Tabla 19, Anexo 4) ya que se observó un aumento del fenotipo obtenido en animales mutantes para este gen en *trans*-heterocigosis a la deficiencia y eliminando una copia de *Sens* (5% de R8s post M3) comparado con animales mutantes del gen en un fondo salvaje (3,2% de R8s post M3). Al no presentar sitios putativos de unión para *Sens*, esta interacción se produciría de forma indirecta a través de otros genes regulados directamente por *Sens*.



**Figura 36. Interacción genética entre CG14397 y Sens.** A) Representación gráfica de los resultados obtenidos en la interacción genética de Sens y CG14397. Animales mutantes para CG14397 en trans-heterocigosis a una deficiencia, en un fondo heterocigoto mutante de *sens* (*CG14397<sup>M104770</sup>/Df, sens<sup>E1</sup> -/+*; Cerebros analizados, n= 7) muestran un fenotipo mayor de R8s post M3 (45 de 916 R8s con fenotipo) comparado con animales mutantes de CG14397 (56 de 1725 R8s con fenotipo, *CG14397<sup>M104770</sup>/Df*; n= 8). El fenotipo también es estadísticamente significativo con respecto a los controles correspondientes (*CG14397<sup>M104770</sup>/+, sens<sup>E1</sup> -/+*, n=6, 7 de 804 R8s con fenotipo; *Df/+*, *sens<sup>E1</sup> -/+*, n=6, 21 de 825 R8s con fenotipo). B) Valores numéricos de la interacción genética de Sens y CG14397. Test estadístico: T-Student, p-valor= 0,05).





**Capítulo 5**  
**Estudio de la función de GstE11**  
**en la selección de capa de R8**



## 5. Estudio de la función de GstE11 en la selección de capa de R8

### 5.1 Origen de las GSTs y su relación con el SN

*GstE11* codifica para un miembro de la familia E de las glutatión S-transferasas (GSTs) (Ranson et al. 2001). Estas enzimas son una familia muy importante de enzimas detoxificadoras que son activas durante el metabolismo de drogas (Mannervik and Danielson 1988; Hayes and Pulford 1995). En muchos organismos las GSTs pertenecen a la familia de isozimas citosólicas (State, 1986; Hayes and Pulford, 1995) o microsomales (Dejongs et al. 1988; Jakobsson et al. 1999). Su función principal consiste en catalizar la conjugación de la forma reducida del glutatión a varios sustratos exógenos y endógenos electrofílicos (Armstrong 1997; Hayes and Pulford 1995). Respecto a su especificidad de sustrato, la mayoría de las GSTs son capaces de catalizar un amplio rango, mientras que una pequeña parte (isozimas microsomales) presentan asociaciones muy específicas (Dejongs et al. 1988; Jakobsson et al. 1999).

Entre todos los miembros del reino animal, son los insectos los que presentan una enorme variedad de GSTs. Hace ya más de medio siglo los insecticidas empezaron a introducirse en el medio ambiente con el objetivo de fomentar el desarrollo de la agricultura. Sin embargo, los insectos han sido capaces de desarrollar defensas contra estos de forma extremadamente rápida. De hecho, esta rapidez evolutiva ha supuesto un gran problema para la industria agroquímica (Tu and Akgül 2005). La aparición de familias nuevas de GSTs ha sido, entre otras, uno de los métodos que han favorecido el metabolismo de los insecticidas por parte de los insectos (Clark 1990). Gracias a la secuenciación completa del genoma de *Drosophila* y especies de mosquitos (Enayati, Ranson, and Hemingway 2005) la gran diversidad de familias de GSTs se ha convertido en objeto de estudio, especialmente, en el contexto de la resistencia a pesticidas.

En *Drosophila*, hay un único gen de GSTs que presenta un 45% de identidad en la secuencia de aminoácidos respecto al gen de la *gst* microsomal en humanos (Dejongs et al. 1988). La comparación de secuencias entre GSTs conocidas resultó en una clasificación de seis clases diferentes de GSTs citosólicas: Delta (D), Epsilon (E) (Sawicki et al. 2003), Omega (O), Sigma (Beall et al. 1992; Singh et al. 2001), Zeta y Theta (Tu and Akgül 2005). Las clases D y E son clases específicas de *Drosophila*, mientras que las restantes se comparten con todos los eucariotas (Saisawang, Wongsantichon, and Ketterman 2012; Tu and Akgül 2005). Además, ambas clases son las más estrechamente relacionadas como se demostró mediante alineamiento de secuencia y análisis filogenético (Saisawang, Wongsantichon, and Ketterman 2012).

Respecto a la familia E, de sus 14 miembros, de la *GstE1* a la *GstE10* se encuentran formando un *cluster* en el cromosoma 2R, mientras que el resto de los miembros están dispersos a lo largo del cromosoma, encontrándose así la *GstE11* que posee la mayor eficiencia catalítica hacia su sustrato. Asimismo, tanto la familia E como la D estarían principalmente implicadas en la detoxificación ya que ambas son capaces de catalizar una gran diversidad de sustratos (Saisawang, Wongsantichon, and Ketterman 2012).

Es importante mencionar que estudios anteriores asociaron las GSTs con el SN. Concretamente, la *GstO1* presentó un papel protector durante estrés oxidativo en el SN en *Drosophila* (S. Y. Lee et al. 2015). En el caso de la *GstO2*, también fue relacionada con el SN debido a un posible efecto protector sobre algunos de los defectos producidos en Parkinson (Kim and Yim 2013; Kim et al. 2012).

A pesar de que la familia GSTE no ha sido directamente relacionada con el SN, el *screen* de los genes enriquecidos en R8 mediante RNAi ha mostrado que la pérdida de función de *GstE11* producía un fenotipo en la selección final de capa del R8 (23% de R8s en M6). Por lo que este gen podría estar implicado en la guía axonal del R8, lo que se intentó confirmar mediante la validación con una inserción. Además, otro gen miembro de la misma familia también mostró un fenotipo en la selección de capa en el *screen*: *GstE14*. Esta parte se discutirá en detalle en el apartado de Discusión.

Con respecto a su patrón de expresión, el *RNA-seq* mostró que la *GstE11* se encontraba sobre-expresada en R8s frente R7s a 40h DFP, mientras que en R7s prácticamente no se expresaba en todo el proceso. Aunque su expresión era elevada en R8s a 40h DFP, después dicha expresión decrecía bruscamente a 50h y a 60h DFP (Figura 37).

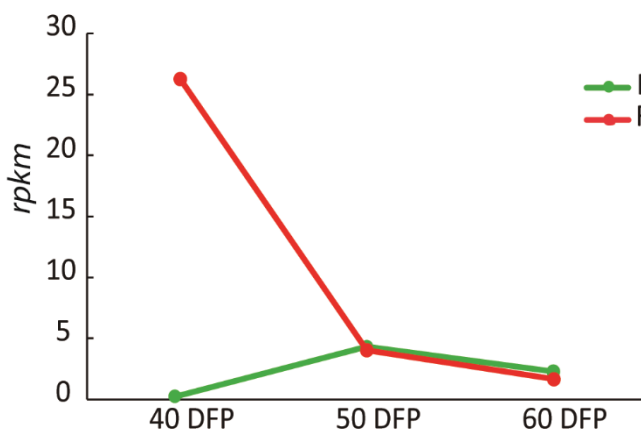


Figura 37. Patrón de expresión de *GstE11* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

Estos datos sugerían que la función de esta enzima se limitaría al inicio del proceso de selección de capa en el R8. Con respecto a la presencia de sitios putativos de unión para Sens y/o Pros en la región reguladora de *GstE11*, las predicciones bioinformáticas no detectaron ninguno de ellos.

## 5.2 Validación del fenotipo RNAi mediante la inserción *GstE11*<sup>d06699</sup>

Para verificar el fenotipo obtenido con el RNAi de la *GstE11* se eligió una inserción (*P(XP)GstE11*<sup>d06699</sup>) que interrumpía la región codificante en el exón 2, afectando a las dos isoformas existentes de la *GstE11*. Además, dicha inserción no afectaría al dominio catalítico localizado en el extremo N-terminal (Figura 38).

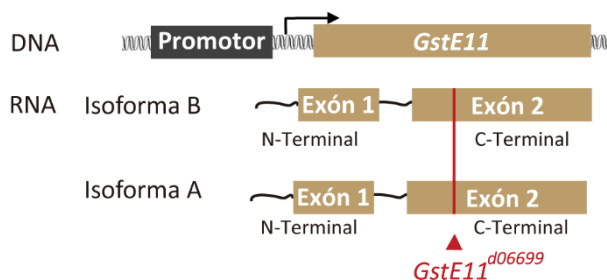
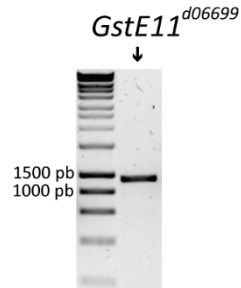


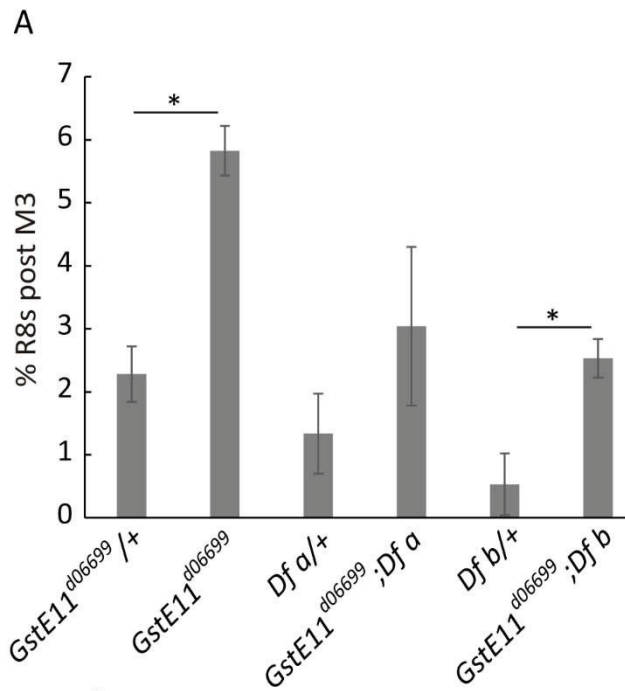
Figura 38. Inserción *GstE11*<sup>d06699</sup>. Se representan las dos isoformas A y B de *GstE11* y la localización de la inserción *GstE11*<sup>d06699</sup> interrumpiendo el exón 2 de ambas isoformas. La inserción afecta al extremo C-terminal, mientras que el extremo N-terminal, donde se encuentra el dominio catalítico, no se vería afectado.

Inicialmente se procedió a demostrar que la inserción  $P(XP)GstE11^{d06699}$  interrumpía de forma específica  $GstE11$ . Mediante  $PCR$  se confirmó que en animales mutantes homocigotos la inserción sí interrumpía el gen (Figura 39).



**Figura 39.** La inserción  $GstE11^{d06699}$  afecta a  $GstE11$ . Mediante  $PCR$  se comprobó que la inserción  $GstE11^{d06699}$  interrumpía el locus de  $GstE11$  en animales mutantes homocigotos  $GstE11^{d06699}$ .

Una vez confirmado que esta inserción interrumpía específicamente el locus del gen, se procedió a analizar el fenotipo en R8s en animales mutantes  $GstE11^{d06699}$  en *trans*-heterocigosis a dos deficiencias que cubriesen el gen (Df a:  $Df(2R)BSC399$  y Df b:  $Df(2R)ED3683$ ) o con la inserción en homocigosis ya que era viable. El resultado no mostró fenotipos en R8 en ninguna de las condiciones explicadas, impidiéndose así la validación del fenotipo producido por el RNAi (Figura 40).



B

	% R8s post M3
<i>GstE<sup>d06699</sup> /+</i>	2,2± 0,88
<i>GstE<sup>d06699</sup></i>	5,8± 0,79
<i>Df a/+</i>	1,3± 1,27
<i>GstE<sup>d06699</sup> /Df a</i>	3± 2,51
<i>Df b/+</i>	0,5± 0,98
<i>GstE<sup>d06699</sup> /Df b</i>	2,5± 0,61

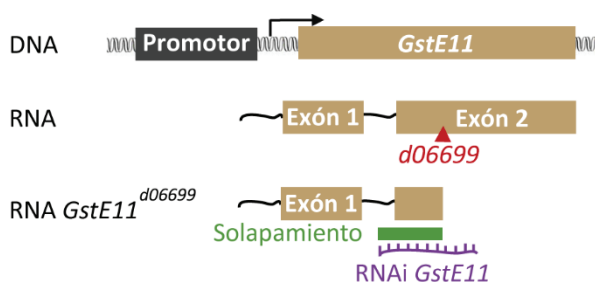
**Figura 40. Validación del fenotipo RNAi de *GstE11*.**

A) Representación gráfica de los fenotipos observados en R8 en la validación del fenotipo RNAi de *GstE11*. Moscas mutantes homocigotas *GstE<sup>d06699</sup>* no mostraron un fenotipo en R8 (*GstE<sup>d06699</sup>*, cerebros analizados, n= 7, 81 de 1215 R8s con fenotipo) comparado con el fenotipo RNAi (14,4% R8s post M3 y 10,2% de R8s en M6). En el caso de moscas mutantes *GstE<sup>d06699</sup>* en *trans*-heterocigosis a la deficiencia b, tampoco se observó un fenotipo en R8 (*GstE<sup>d06699</sup> /Df b*, n= 4, 22 de 871 R8s con fenotipo). De la misma manera, en las moscas mutantes *GstE<sup>d06699</sup>* en *trans*-heterocigosis a la deficiencia a, no se detectó un fenotipo en R8 (*GstE<sup>d06699</sup> /Df a*, n= 6, 21 de 737 R8s con fenotipo). B) Valores numéricos del porcentaje promedio de fenotipos obtenidos en la validación del fenotipo RNAi de *GstE11*. Test estadístico: T-Student y Kruskal-Wallis, p-valor= 0,05).

Una razón que justificara este resultado podría ser que la inserción *GstE11<sup>d06699</sup>* no causara una pérdida de función de *GstE11*, por ejemplo al no afectar el dominio catalítico de la enzima. Por otra parte, podría ser que el fenotipo observado mediante RNAi fuese inespecífico debido a efectos *off-targets*. Para desvelar esta incógnita realizamos un experimento genético que demostró la especificidad del RNAi de *GstE11*.

### 5.3 Validación de la especificidad del RNAi contra *GstE11*

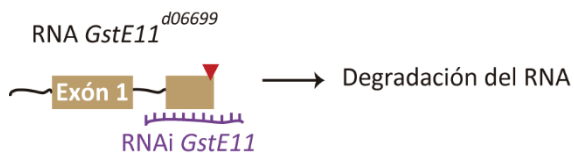
Identificamos un solapamiento entre la secuencia genómica diana del RNAi de *GstE11* y el punto de inserción del transgen que producía la mutación *GstE11<sup>d06699</sup>* (Figura 41).



**Figura 41. Solapamiento entre la secuencia diana del RNAi de *GstE11* y la inserción *GstE11<sup>d06699</sup>*.** El RNAi contra *GstE11* es complementario a una parte de la secuencia (exón 2) del RNA producida por la inserción *GstE11<sup>d06699</sup>*.

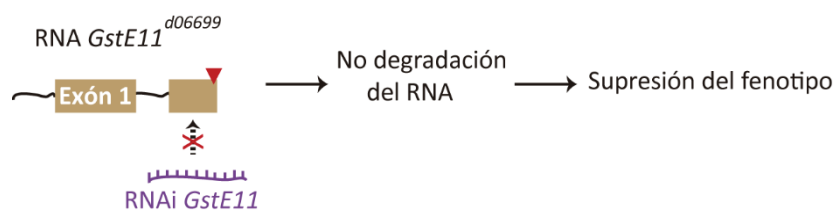
Conocido esto, decidimos llevar a cabo un experimento genético para poder demostrar que el RNAi estaba produciendo el silenciamiento de *GstE11*. En la condición experimental en la que animales recombinantes que portasen la inserción de *GstE11* y además, expresasen el RNAi en los fotoreceptores en *trans*-heterocigosis a una deficiencia que cubría el gen, podrían darse las siguientes opciones:

- El solapamiento sería suficiente para que el RNAi se pueda unir al transcrito producido por la inserción *GstE11*<sup>d06699</sup>, degradando de esta manera, el RNA (Figura 42):



**Figura 42.** El solapamiento entre la secuencia diana del RNAi de *GstE11* y la inserción *GstE11*<sup>d06699</sup> sería suficiente para que el RNAi degrade el RNA. El RNA producido por la inserción *GstE11*<sup>d06699</sup> permitiría que el RNAi de *GstE11* se uniese a su secuencia diana.

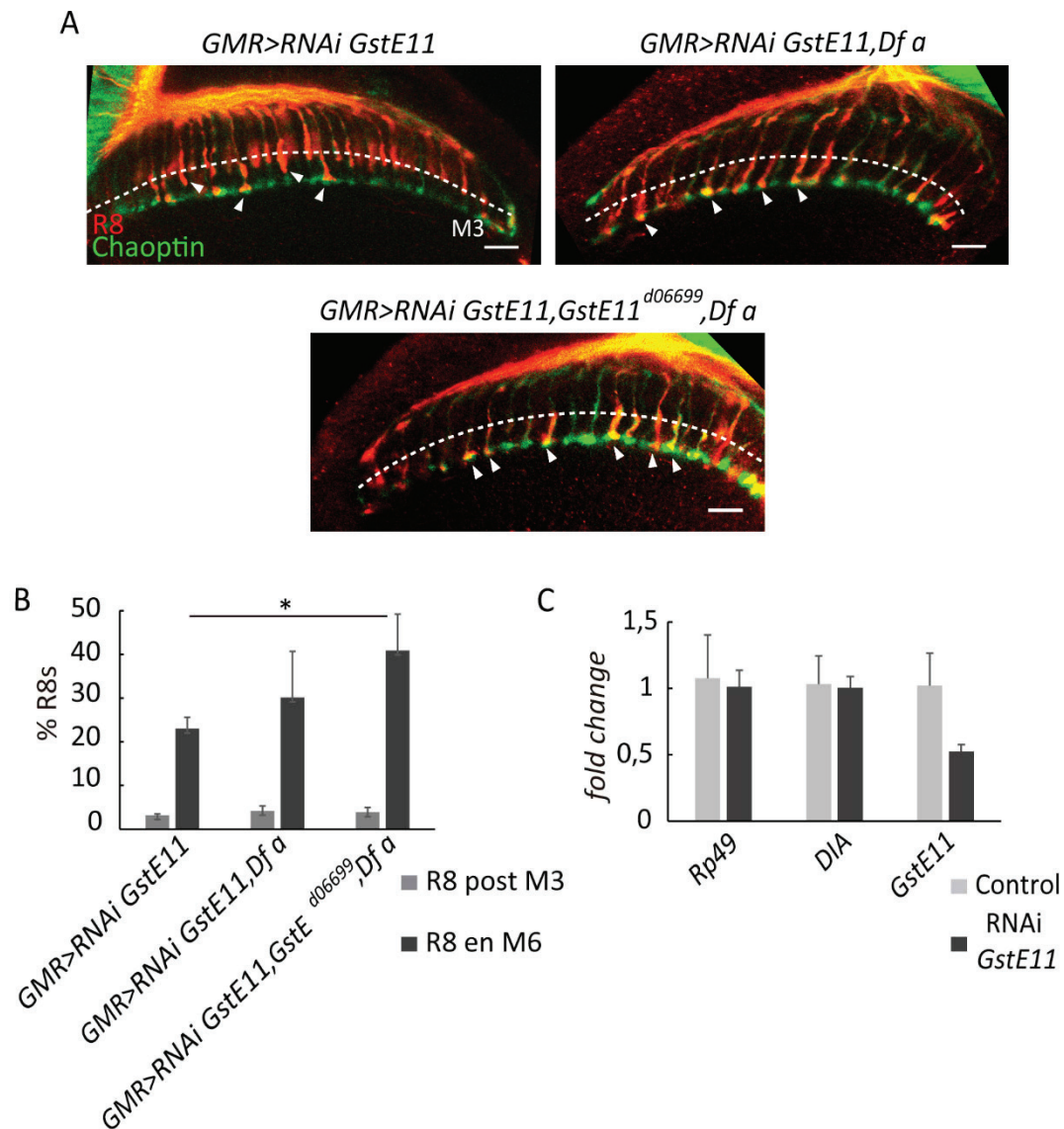
- Opción 1: se produciría un aumento del fenotipo comparado con el producido por el RNAi de la *GstE11*. Conclusión: la diana del RNAi es *GstE11*.
  - Opción 2: se produciría el mismo fenotipo que el producido por el RNAi de *GstE11*. Conclusión: El RNAi se une a otro gen cercano produciendo el fenotipo previamente observado.
- El solapamiento no sería suficiente para la unión del RNAi al gen *GstE11*: El transcrito producido por la mutación *GstE11*<sup>d06699</sup> sería demasiado corto para permitir la unión del RNAi, suprimiendo el fenotipo producido por la expresión del RNAi. Conclusión: la diana del RNAi es *GstE11* (Figura 43):



**Figura 43.** El solapamiento entre la secuencia diana del RNAi de *GstE11* y la inserción *GstE11*<sup>d06699</sup> no sería suficiente para que el RNAi degrade el RNA. El RNA *GstE11*<sup>d06699</sup> no incluiría la secuencia complementaria suficiente, como para permitir que el RNAi se una.

El resultado fue la aparición de un aumento en el fenotipo en animales recombinantes experimentales comparado con aquellos que solo expresaban el RNAi de *GstE11* (Figura 44A y B).





**Figura 44. Especificidad del RNAi contra *GstE11*.** A) Fenotipos observados en R8 en las diferentes condiciones. Animales que expresaron el RNAi de *GstE11* (*GMR>RNAi GstE11*, cerebros analizados, n= 10) mostraron un fenotipo basado en el 3% de R8s post M3 (61 de 1912 R8s post M3) y el 22,9% de R8s en M6 (434 de 1912 R8s en M6), mientras que en aquellos animales que, además de expresar el RNAi, portaban en *trans* una deficiencia que cubría el gen (*GMR> RNAi GstE11, Df a*, n=18), un 4,2% de R8s pasaban M3 (136 de 3298 R8s post M3) y un 30,1% llegaban a M6 (1017 de 3298 R8s en M6). Si estos mismos animales también llevaban la mutación *GstE11<sup>d06699</sup>* (*GMR> RNAi GstE11, GstE11<sup>d06699</sup>, Df a*, n=19), el fenotipo era del 3,8% de R8s post M3 (105 de 3036 R8s post M3) y 40,8% en M6 (1324 de 3036 R8s en M6). Las diferencias con respecto al fenotipo en M6 fueron estadísticamente significativas al comparar los animales *GMR> RNAi GstE11* y *GMR> RNAi GstE11, GstE11<sup>d06699</sup>, Df a*. B) Representación gráfica del porcentaje promedio de fenotipo observado en cada caso. Test estadístico: T-Student, Kruskal-Wallis, p-valor= 0,05, barra de escala: 10µm. C) Representación gráfica de los resultados procedentes de la RT-PCR. A través de RT-PCR se detectó la disminución del transcrito de *GstE11* en larvas L3 que expresaron el RNAi contra *GstE11* en el dominio *apterous* del disco imaginal de ala. Como genes controles se emplearon *Rp49* y *DIA*.

El resultado obtenido nos indicaba que aparentemente el RNAi contra la *GstE11* producía de forma específica un fenotipo en R8s sin embargo, otra posibilidad sería que el aumento fenotípico observado se causara por forzar de forma extrema el sistema genético. Esta posibilidad fue descartada al observar una disminución del transcrito de la *GstE11* al expresar el

RNAi en el dominio *apterous* (*ap-Gal4*) (Bejarano et al. 2008) del disco imaginal de ala en la etapa L3 larvaria mediante *RT-PCR* (ver Materiales y métodos) (Figura 44C).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que *GstE11* sería necesaria para que los R8s localicen su destino final específico en el cerebro. No obstante, se tendrían que realizar más experimentos para elucidar el mecanismo molecular por el cual *GstE11* funciona en la guía axonal del R8.



**Capítulo 6**  
**Estudio de la función de Espinas**  
**(Esn) en la selección de capa de R8**

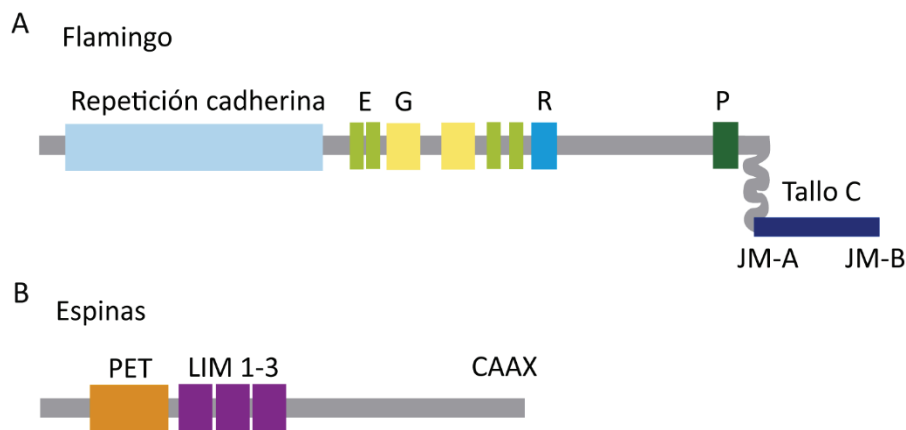


## 6. Estudio de la función de Esn en la selección de capa en R8

### 6.1 Esn funciona en las dendritas de la larva

*esn* codifica para una proteína con dominio LIM formada por secuencias ricas en cisteína con un motivo dedo de zinc (Sánchez-García and Rabbitts 1994; Dawid, Breen, and Toyama 1998). *esn* es un gen similar a *prickle*, estando así relacionado con la polaridad planar celular (Gubb *et al.*, 2000). En estudios previos se identificó un nuevo dominio formando parte del dominio LIM: dominio PET (Prickle-Espinas-Testis) implicado en interacciones entre proteínas de la polaridad planar o en la organización del citoesqueleto (Gubb *et al.* 1999). Con respecto a su patrón de expresión en el SN, se ha demostrado que Esn se expresa en el SN en la etapa embrionaria de *Drosophila*, localizándose en órganos sensoriales precursores y en axones y núcleos de neuronas del SNP (D. Matsubara *et al.* 2011).

Esn tiene una función en el establecimiento de interacciones repulsivas entre las dendritas de las neuronas de la larva (D. Matsubara *et al.* 2011), siendo necesarias para la proyección ordenada de las dendritas y para el correcto procesamiento de señales (Zipursky and Sanes 2010). Dicha función se consigue gracias a su interacción genética con Fmi. La combinación en *trans*-heterocigosis de mutantes nulos de *fmi* y *esn* producía un fenotipo en estas interacciones dendríticas tan severo como el observado en mutantes hipomorfos de *fmi* (D. Matsubara *et al.* 2011). Además, dicha interacción ocurría de forma directa entre el dominio LIM (incluyendo el dominio PET) de Esn y el tallo C-terminal de Fmi (D. Matsubara *et al.* 2011) (Figura 45).



**Figura 45. Identificación de la unión del dominio PET-LIM de Esn y el tallo C de Fmi.** A) Fmi está formado por un ectodominio, incluyendo repeticiones de cadherina, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático (yuxtamembrana, JM) tallo C-terminal. Esta región está dividida en la mitad terminal JM-A y la mitad terminal JM-B. E: repetición EGF, G: dominio globular A, R: dominio receptor de hormona, P: dominio GPS Latrofilina/CL-1. B) Esn contiene el dominio PET (PET), dominios triples LIM (LIM) y un motivo CAAX en la región C-terminal.

Cabe resaltar que *fmi* es un gen involucrado en la guía axonal del R8 mediante la interacción con *gogo* en *Drosophila* (Hakeda-Suzuki *et al.* 2011). Este hecho nos hizo preguntarnos si Esn estaría actuando en el R8 por medio de su interacción con Fmi, al igual que ocurría en las dendritas de

la larva. Para resolver esta hipótesis se realizaron experimentos genéticos que se explicarán a continuación.

## 6.2 Patrón de expresión de *esn* en R7 y R8

Los datos procedentes del *RNA-seq* mostraron que *esn* estaba sobreexpresado en R8 comparado con R7 a 40h DFP, mientras que posteriormente su expresión disminuía en R8. La expresión en R7 en cambio fue moderada en las tres etapas analizadas (Figura 46).

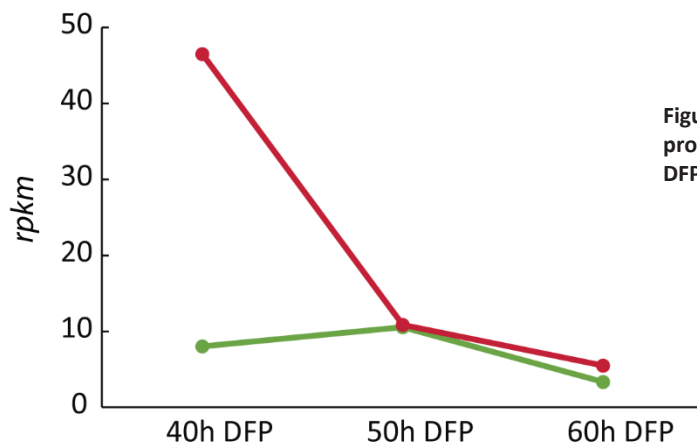
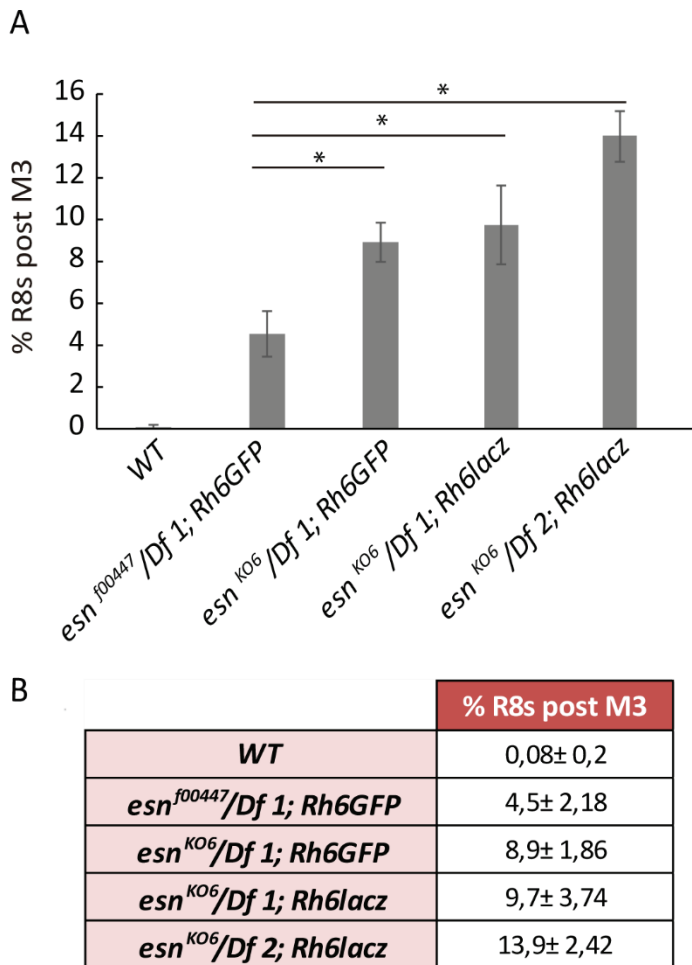


Figura 46. Patrón de expresión de *esn* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

Además, gracias a herramientas bioinformáticas observamos que *Esn* presentaba sitios putativos de unión para Sens y Pros. Esto sugiere que podría ser activado por Sens en R8, mientras que en R7 podría ser reprimido a través de Pros.

## 6.3 La pérdida de función de *esn* produce defectos en la selección de capa de R8

La pérdida de función de *esn* en los fotorreceptores produjo defectos en la selección final de capa de R8, lo cual se observó mediante su silenciamiento génico por RNAi en el estudio de los genes enriquecidos en R8 del enfoque no sesgado. Este fenotipo consistió en que el 4,7% o el 6,5% de R8s sobrepasaban de su capa M3 llegando a M6 (en M6) según las dos líneas de RNAi empleadas en el *screen* (Tabla 14, Anexo 1). Dicho fenotipo se validó en moscas mutantes nulas *esn*<sup>K06</sup>, en *trans*-heterocigosis a una deficiencia en las que un 9% de R8s mostraron el fenotipo post M3 (Figura 47). Además, este fenotipo se reprodujo en animales mutantes hipomorfos *esn*<sup>f00447</sup>, donde un 4,5% de R8s mostraron fenotipo post M3 (Figura 47). El fenotipo producido en las moscas mutantes hipomorfas fue la mitad que el producido en las moscas mutantes nulas, lo que concordaba con estudios donde se sugería que el alelo *esn*<sup>f00447</sup> reduciría a la mitad la proteína *Esn* (Thibault et al. 2004). Es importante mencionar que el fenotipo de *Esn* fue detectado gracias a dos marcadores diferentes de R8s: *Rh6-GFP* y *Rh6-lacZ*, siendo reproducido con dos deficiencias independientes que cubrían la región reguladora (Df 1: *Df(2R)BSC262*) o todo el locus de *Esn* (Df 2: *Df(2R)Exel6283*) (Figura 47).

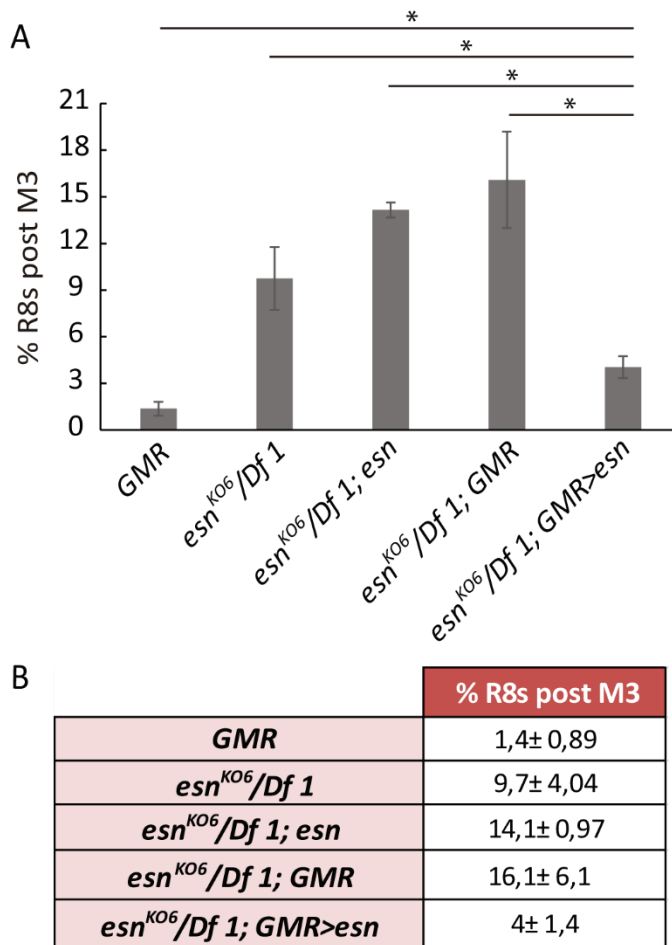


**Figura 47. La pérdida de *esn* produce defectos en la selección de capa de R8.** A)

Gráfica donde se representa el porcentaje de fenotipos post M3 en R8 observados en cada condición mutante de *esn*. Moscas mutantes *esn*<sup>f00447</sup> en *trans*-heterocigosis a la Df 1 (*esn*<sup>f00447</sup>/*Df* 1, *Rh6GFP*; cerebros analizados, n= 7, 66 de 1478 de R8s con fenotipo) muestran la mitad del fenotipo producido en moscas mutantes con el alelo nulo de *esn* en *trans*-heterocigosis a la Df 1 (*esn*<sup>KO6</sup>/*Df* 1, *Rh6GFP*, n= 6, 80 de 892 R8s con fenotipo; *esn*<sup>KO6</sup>/*Df* 1, *Rh6lacZ*, n=4, 60 de 638 R8s con fenotipo) y a la Df 2 (*esn*<sup>KO6</sup>/*Df* 2, *Rh6lacZ*, n= 9, 164 de 1225 R8s con fenotipo). El fenotipo del mutante nulo *esn*<sup>KO6</sup> se detectó además, con dos marcadores de R8s diferentes: *Rh6-GFP* y *Rh6-lacz*. B) Tabla donde se indican los valores numéricos del porcentaje promedio de R8s con fenotipo en cada condición mutante de *esn*. Test estadístico: T-Student, p-valor= 0,05.

Estos resultados sugerían que *Esn* tenía una función en la selección final de capa de R8 debido que dos alelos mutantes en *trans*-heterocigosis a dos deficiencias producían defectos en R8. Lo cual fue confirmado al rescatar un 75% del fenotipo producido en animales mutantes para *esn*, al reintroducir el DNA de *esn* en los fotorreceptores mediante el *driver GMR-Gal4* (Figura 48).





**Figura 48. La expresión de *esn* rescata el fenotipo producido por la pérdida de *esn*.** A) Gráfica donde se representa el porcentaje de fenotipos post M3 en R8 observados en cada condición. La expresión de *esn* mediante el driver *GMR-Gal4*, en un fondo mutante homocigoto de *esn* (*esn<sup>KO6</sup>/Df 1; GMR>esn*, cerebros analizados, n = 7, 66 de 1637 R8s con fenotipo) rescata un 75% del fenotipo producido por la pérdida de *esn* de R8s post M3. Esta bajada en el fenotipo fue significativa comparado con sus controles correspondientes: *esn<sup>KO6</sup>/Df 1; GMR* (n= 9, 187 de 1177 R8s con fenotipo), *esn<sup>KO6</sup>/Df 1; esn* (n= 8, 203 de 1431 R8s con fenotipo), *esn<sup>KO6</sup>/Df 1* (n= 4, 60 de 638 R8s con fenotipo), *GMR* (n= 14, 55 de 4185 R8s con fenotipo). En este experimento se empleó *Rh6-lacZ* para visualizar los R8s. % R8s post M3: porcentaje medio del fenotipo. B) Tabla donde se indican los valores numéricos del porcentaje promedio de R8s con fenotipo en cada condición. Test estadístico: T-Student, Kruskal-Wallis p-valor= 0,05.

Por lo tanto, estos resultados confirman que *Esn* está implicado en la guía axonal del R8 hacia su capa final M3. Dicha función podría ser conseguida mediante la interacción con *Fmi* del mismo modo que en las neuronas de la larva mediante el dominio LIM de *Esn*.

#### 6.4 Interacción genética *Esn-Fmi* en R8

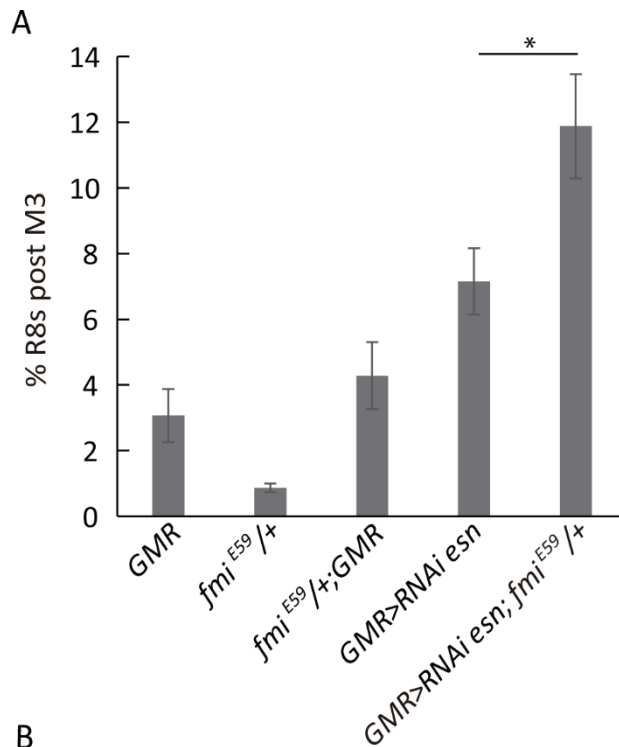
La cadherina transmembrana *Fmi* está involucrada en la guía axonal de R8 mediante la interacción con *Gogo* (Hakeda-Suzuki et al. 2011). *Fmi* permite la extensión de los R8s hacia M3 gracias a las propiedades de adhesión de su dominio extracelular y a la interacción homofílica con *Fmi* en las neuronas diana. La cooperación de *Gogo* se basaría en la posible función de su dominio citoplasmático en la transducción de la señal hacia el cono de crecimiento (Hakeda-Suzuki et al. 2011).

El fenotipo previamente publicado en R8s mutantes nulos de *fmi* se basaba en que los R8s se detenían en la capa M1, por lo que *Fmi* era necesario para movilizar los R8s de M1 a su capa final M3 (Hakeda-Suzuki et al. 2011). Sin embargo, hemos identificado que cuando hay niveles bajos de *Fmi* (*GMR>RNAi fmi*), algunos R8s son capaces de llegar a M3 pero debido a que no disponen del nivel suficiente de *Fmi*, sobrepasarían su capa, sin llegar a M6 (6,1% de R8s post M3) o llegando hasta M6 (23,6% de R8s en M6) (Figura 50). El fenotipo post M3 sería similar al fenotipo que produce la falta de *esn* (R8s post M3). Este hecho significaría que *Esn* podría estar funcionando junto con *Fmi* y *Gogo* en el cono de crecimiento del R8 para regular su estabilización en M3.

Debido a que *Esn* y *Fmi* interaccionaban en las dendritas de la larva (D. Matsubara et al. 2011), nos preguntamos si esta interacción también se daba en el R8. Para identificar una colaboración entre ambos, se intentó detectar una interacción genética. Para ello, el experimento ideal consistiría generar animales mutantes para *esn* en un fondo mutante heterocigoto de *fmi*. En esta situación esperaríamos observar un aumento del fenotipo comparado con el fenotipo de animales mutantes de *esn* o de *fmi*. De esta manera, *Esn* y *Fmi* interaccionarían genéticamente de forma directa o indirecta, sugiriendo su participación en la estabilización del cono de crecimiento del R8. Sin embargo, debido a que ambos genes se localizaban en el mismo cromosoma, a la no disponibilidad de una deficiencia que cubriese los dos genes y a su improbable recombinación por su proximidad en el genoma, el experimento se realizó de dos maneras:

- Opción 1: los animales experimentales expresaron el RNAi de *esn* mediante el *driver GMR-Gal4* en un fondo heterocigoto mutante para *fmi*.
- Opción 2: los animales experimentales expresaron el RNAi de *fmi* mediante el *driver GMR-Gal4* en un fondo mutante para *esn* en *trans*-heterocigosis a la deficiencia (Df 1: *Df(2R)BSC262*).

En los resultados de la opción 1, el fenotipo post M3 en R8 aumentó significativamente en los animales experimentales, de un 7,1% (fenotipo en animales que expresaban el RNAi de *esn*) a un 11,9% (Figura 49). Por lo que este resultado sugería que *Esn* y *Fmi* interaccionaban genéticamente.

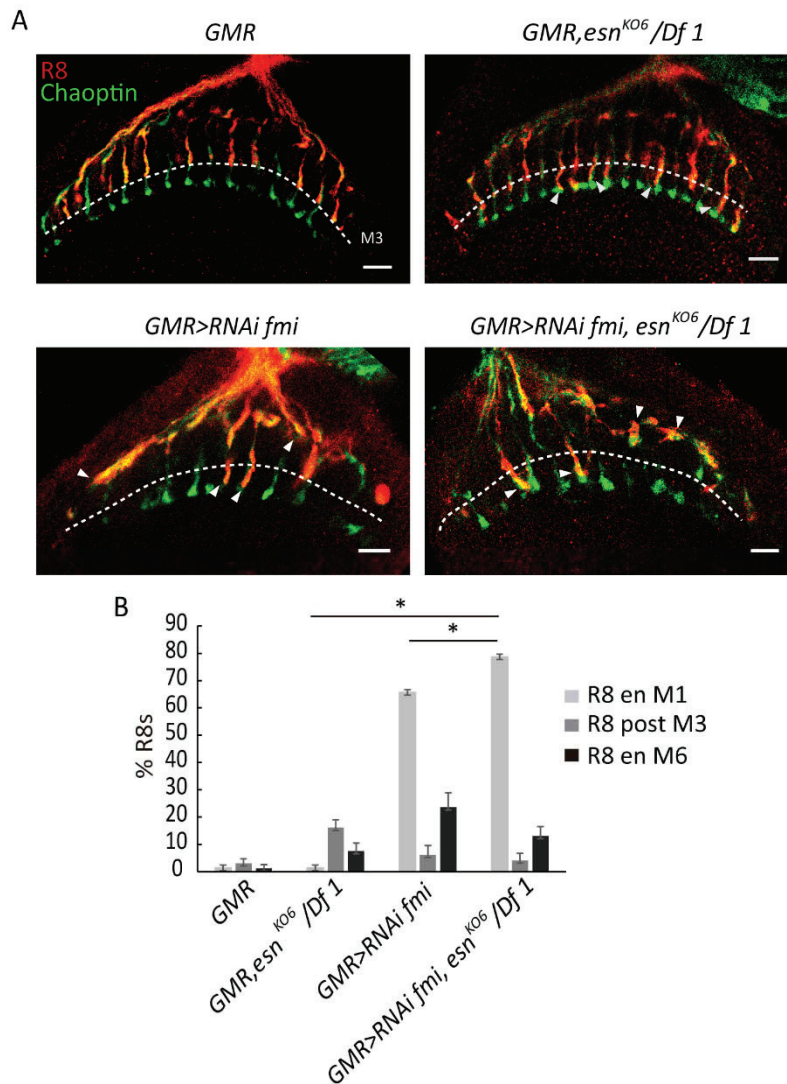


**Figura 49. Interacción genética entre Esn y Fmi (Opción 1).** A) Gráfica donde se representa el porcentaje de fenotipos post M3 en R8 observados en cada condición. El aumento del fenotipo post M3 observado en los animales que expresan el RNAi de *esn* en un fondo heterocigoto mutante de *fmi* (*GMR>RNAi esn, fmi<sup>E59</sup>/+*, cerebros analizados, n=7, 125 de 1052 R8s con fenotipo) fue estadísticamente significativo comparado con el efecto producido por el RNAi de *esn* (*GMR>RNAi esn, n= 6, 67 de 945 R8s con fenotipo*). % R8s post M3: porcentaje medio del fenotipo. B) Tabla donde se indican los valores numéricos del porcentaje promedio de R8s con fenotipo en cada condición. Test estadístico: T-Student, Kruskal-Wallis p-valor= 0,05.

**B**

	% R8s post M3
<b>GMR</b>	3,1± 1,62
<b><i>fmi<sup>E59</sup>/+</i></b>	0,9± 0,26
<b><i>fmi<sup>E59</sup>/+;GMR</i></b>	4,3± 2,03
<b><i>GMR&gt;esn ARNi</i></b>	7,1± 2,02
<b><i>GMR&gt;esn ARNi; fmi<sup>E59</sup>/+</i></b>	11,9± 3,16

Los resultados de la opción 2 mostraron que en los animales experimentales se producía un aumento significativo del fenotipo R8s en M1. Dichos animales presentaban un 78% de R8s que se paraban de forma errónea en la capa M1, mientras que en animales controles, que solo expresaban el ARNi de *fmi*, un 65,6% de R8s se paraban en M1 (Figura 50, Tabla 20, Anexo 5). Estos resultados de nuevo sugerían que Esn y Fmi interactuaban genéticamente.



**Figura 50. Interacción genética entre *Esn* y *Fmi* (Opción 2).** A) Gráfica donde se representa el porcentaje de fenotipos post M3 en R8 observados en cada condición. Los animales mutantes de *esn* en *trans*-heterocigosis a la deficiencia que además portaban el driver *GMR-Gal4* (*GMR, esn<sup>KO6</sup>/Df 1*, cerebros analizados, n= 7, 231 de 1461 de R8s con fenotipo) presentaban un 16,1% de R8s con fenotipo post M3 y un 7,5% de R8s con fenotipo en M6 (106 de 1461 de R8s con fenotipo). Por otra parte, en animales que expresaban el RNAi de *fmi* en los fotorreceptores (*GMR>RNAi fmi*, n=8), se observó un 6,1% de R8s post M3 (50 de 836 de R8s con fenotipo), un 23,6% en M6 (192 de 836 de R8s con fenotipo) y un 65,6% de R8s en M1 (553 de 836 de R8s con fenotipo). En animales que además de expresar el RNAi de *fmi*, también eran mutantes de *esn* (*GMR> RNAi fmi, esn<sup>KO6</sup>/Df 1*) n=6 se observó un aumento significativo del fenotipo en M1, ya que un 78,6% (557 de 706 de R8s con fenotipo) de R8s mostraban este comportamiento. Los fenotipos están indicados con triángulos blancos. % R8s post M3: porcentaje medio del fenotipo. B) Tabla donde se indican los valores numéricos del porcentaje promedio de R8s con fenotipo en cada condición. Test estadístico: T-Student, p-valor= 0,05. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Es relevante mencionar que en ambas opciones el aumento del fenotipo fue leve, sin embargo al ser este estadísticamente significativo, tanto en la opción 1 como en la opción 2, se confirmaría la interacción genética entre *Esn* y *Fmi*. Por consiguiente, ambos genes funcionarían

## Resultados

en la selección de capa de R8 de forma directa o indirecta. Los experimentos para demostrar si el dominio LIM de Esn mediaría la interacción con Fmi se encuentran en proceso.





## Discusión





# 1. Utilización del RNAi en el *screen* genético

Esta tesis se centró en realizar el *screen* de los genes enriquecidos en R8 pertenecientes al enfoque no sesgado, a través de la técnica RNAi. Ésta consiste en un proceso celular endógeno en el que el RNAm es degradado por RNA de cadena doble (dsRNA) de secuencia idéntica, provocando el silenciamiento génico (Fire *et al.*, 1998; Chapman and Carrington, 2007).

El silenciamiento génico por RNAi ha constituido un método ampliamente empleado y valioso para estudiar las funciones de los genes. El descubrimiento de esta técnica fue en *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) (Fire *et al.*, 1998) lo que permitió la realización de estudios funcionales en varios organismos, desde los clásicos modelos genéticos de *C.elegans* y *Drosophila*, hasta células humanas y organismos como las planarias y mosquitos, donde las técnicas genéticas no estaban disponibles. Aunque inicialmente el RNAi se empleó para silenciar genes individuales de interés, actualmente se utiliza en varios organismos a gran escala mediante la producción de librerías de RNAi. De esta manera, se podrían silenciar la mayoría de genes, permitiendo estudios genómicos de pérdida de función cubriendo todo el genoma. Por otra parte el silenciamiento génico por RNAi tiene algunas desventajas como por ejemplo, que dicho silenciamiento puede ser variable e incompleto y que los reactivos pueden ser inespecíficos. De la misma manera, los genes que codifican proteínas con un promedio de vida largo no son silenciados tan eficientemente.

A pesar de las desventajas que esta técnica pudiera presentar, las ventajas de la técnica de RNAi hicieron plausible su empleo en esta tesis en lugar del uso de líneas mutantes para cada gen. Dichas ventajas consistían en la existencia de librerías de RNAi para todos los genes de *Drosophila* (VDRC y TRiP) debido a la secuenciación completa de su genoma.

Por otra parte, en el caso del uso de líneas mutantes existe una falta de disponibilidad para algunos genes, sobre todo, para aquellos con función desconocida. Además, la generación de mutantes recombinados con secuencias FRTs necesarias para la generación de clones mutantes de genes letales necesarios para el desarrollo del animal, supone un alto coste temporal. Por lo tanto, debido a la gran disponibilidad de RNAi y a su rapidez en la obtención de resultados, este método fue el más adecuado para el estudio de los genes enriquecidos en R8 del enfoque sesgado.

Gracias al sistema Gal4-UAS (Brand and Perrimon, 1993) se ha logrado el silenciamiento génico mediante RNAi en cualquier tejido y a cualquier etapa del desarrollo de *Drosophila* debido a la amplia colección de líneas de *drivers* Gal4 (G Roman *et al.*, 2001; McGuire, 2003). Un ejemplo han sido los *screens* mediante RNAi en el SN, donde se ha demostrado que este método silencia de forma eficiente la expresión génica, generando fenotipos similares a los de mutantes hipomorfos o nulos (Schmid, Schindelholz and Zinn, 2002; Ivanov *et al.*, 2004). De esta manera, estudios previos han sido capaces de identificar genes implicados en el desarrollo del SN (Ivanov *et al.*, 2004; Koizumi *et al.*, 2007), reguladores transcripcionales de la renovación y diferenciación de los neuroblastos (Neumüller *et al.*, 2011) y nuevos genes implicados en la formación de agregados de poliglutamina en el cerebro por la enfermedad de Huntington (Doumanis *et al.*, 2009). Este tipo de estudio a gran escala ha permitido la identificación de genes implicados en la formación de la memoria en el sistema olfatorio (Walkinshaw *et al.*, 2015).

El descubrimiento de genes implicados en la extensión axonal de las neuronas también ha sido posible gracias a los *screens* genéticos mediante RNAi. Un ejemplo fue en neuronas del embrión de *Drosophila*, donde algunos de los genes también mostraron fenotipos en neuronas corticales de ratón (Sepp *et al.*, 2008). De igual manera, se han identificado genes de células gliales implicados en el ensamblaje axonal de las neuronas (Ghosh *et al.*, 2013). Además, en otras

especies como en *C.elegans*, también ha proporcionado nuevos conocimientos sobre el proceso de la guía axonal en motoneuronas y en el cordón nervioso ventral (Schmitz, Kinge and Hutter, 2007).

En el sistema visual también se han identificado genes importantes, por ejemplo el gen *Sema-1a* en la neurona de la *lamina* L3 necesario para su selección de capa específica (Pecot *et al.*, 2013), el gen *Alk* implicado en el desarrollo de la neurona L3 (Pecot *et al.*, 2014) y el gen *Multiplexin* de células gliales con funciones en la selección de capa de R2-R5 (Ma *et al.*, 2016).

Todos estos ejemplos ponen de manifiesto la gran utilidad del *screen* genético mediante RNAi, motivo por el cual fue la herramienta estratégica elegida para llevar a cabo esta tesis. Los genes candidatos procedentes de dicho *screen* fueron validados mediante líneas mutantes con el objetivo de reproducir los fenotipos observados en el *screen*.

Los estudios de comportamiento en la detección de la luz de color en animales mutantes podrían haber formado parte de esta tesis como un método adicional para confirmar el fenotipo RNAi o incluso para el *screen* mediante RNAi. Sin embargo, este tipo de *screen* visual no está actualmente adaptado para el estudio de la respuesta del R8, a diferencia del R7 y de R1-R6, donde gracias a dicho método se han identificado MSC importantes para la guía axonal (Clandinin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001).

## 2. Resultados del *screen* mediante RNAi

### 2.1 Efectos *off-targets*

43 Genes fueron los candidatos para tener una función en la guía axonal del R8 procedentes del estudio de pérdida de función con RNAi. Seguidamente, se procedió a la validación del fenotipo de aquellos que presentaban inserciones viables ya que era una manera rápida de verificar el fenotipo observado con el RNAi. Por lo tanto, se testaron 16 genes y el resultado mostró que de los 16, en 5 genes se reprodujo el fenotipo previamente identificado: *esn*, *Thor*, *Cyp31a1*, *CG14397* y *GstE11*. Esto sugería que los fenotipos obtenidos en los restantes 11 de los 16 genes testados podrían ser causados por *off-targets* de los RNAis testados.

Los efectos por *off-targets* son producidos por el efecto del propio RNAi al reconocer parcialmente la cadena sentido o anti-sentido de una diana inapropiada (Jackson *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006). Análisis *in silico* en *Drosophila* sugieren que los dsRNA pueden tener múltiples *off-targets* ya que cada RNAi pequeño (*small interference RNAi*, siRNA) producido por la maquinaria endógena de RNAi tiene su propio arsenal putativo de *off-targets* (Seinen *et al.*, 2011). Los efectos *off-targets* en estudios de RNAi no solo se producen en *Drosophila*, sino que también en mamíferos (Echeverri and Perrimon, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Aunque anteriormente se pensaba que el RNAi solo tenía como diana el RNAm maduro en el citoplasma, estudios posteriores demostraron que también puede actuar en el núcleo reconociendo promotores (Morris *et al.*, 2004) e intrones (Bosher *et al.*, 1999). Además, un estudio reciente demuestra que mediante un modelo predictivo, los intrones reconocidos por los RNAi debido a una gran homología de secuencia deben de tenerse en cuenta y ser considerados como *off-targets* (Seinen *et al.*, 2011).

En esta tesis se emplearon estrategias para evitar los efectos por *off-targets* ya que se seleccionaron los RNAi que presentaron menor número de estos. Esto se observó en la información proporcionada por VRDC. Además, también se tuvo en cuenta el coeficiente  $S_{19}$ , que mide la especificidad del RNAi. La mayoría de los RNAi elegidos tuvieron un  $S_{19}$  próximo a 1, lo que quería decir que deberían de ser altamente específicos. Otro aspecto importante que ayudó a minimizar la aparición de *off-targets* fue el empleo de dos líneas independientes de RNAi por cada gen analizado. Esta estrategia se basaba en que dos líneas sin solapamiento de RNAi tendrían sus propios *off-targets* pero su diana común sería el gen de interés. Por lo tanto, si ambas líneas comparten el mismo fenotipo será debido, probablemente, a la ausencia del gen y no por *off-targets*.

Por otra parte, otra explicación posible que demostrase la no validación fenotípica de los 11 genes candidatos restantes podría ser debido a que las líneas mutantes empleadas no fueron mutantes nulos. Este hecho podría haber causado que los fenotipos observados en estos 11 genes no fueran lo suficientemente altos como para ser detectados. Sin embargo, este no fue el caso de los genes *Npc2b* y *5-HT1B*, donde las líneas mutantes fueron mutantes nulos. Esto sugería que el fenotipo obtenido con el RNAi sería debido a *off-targets*. Por lo tanto, estos genes serían descartados para tener una función en la selección de capa del R8.

Los genes que resultaron ser letales se estudiarían mediante MARCM para generar R8s mutantes homocigotos (este estudio no se realizó en la presente tesis debido a la falta de tiempo). Uno de los genes letales fue *dve*, el cual codifica para un FT implicado en la regulación de la expresión de opsinas en los fotorreceptores R1-R6 (Johnston *et al.*, 2011). Según la literatura, este FT tenía una función descrita en R1-R6 pero no en R8, motivo por el cual nos sorprendió su expresión en

los datos del *RNA-seq*. Por ello, se procedió a la validación de su expresión mediante la detección con anti-Dve en el núcleo de R8. Sin embargo, al ser la expresión de este FT indetectable, nos sugería que el RNA de *dve* se expresaría en R8 pero no la proteína, concordando con los estudios previos. Estos resultados causaron que este FT se descartara para tener una función en la selección de capa de R8, aunque su RNAi mostrase un fenotipo, el cual, probablemente, sería producido por efectos *off-targets*.

## 2.2 Variabilidad en la cualidad fenotípica observada

Un hecho relevante que se observó, una vez se validaron los fenotipos con líneas mutantes, fue que en el caso de los 5 genes validados los fenotipos observados fueron R8s post M3. Esto contrastaba con los resultados obtenidos del *screen* mediante RNAi, donde en estos 5 genes y en la gran mayoría de los genes, los fenotipos detectados fueron R8s en M6.

En el *screen* de los genes enriquecidos en R8 las moscas tenían una carga genética mayor que las moscas empleadas para la validación del fenotipo mediante líneas mutantes. Además, la temperatura en ambos experimentos fue diferente, ya que el *screen* se realizó a 29°C para asegurar una mayor expresión del RNAi por el sistema Gal4/UAS, mientras que la validación se realizó a 25°C, siendo la temperatura *standard* de desarrollo. Por lo tanto, se postularía que en el caso de estos 5 genes, su pérdida de función provocaría que los R8s sobrepasaran su capa M3 sin llegar a la capa M6, pero en condiciones peores de supervivencia debido a la carga genética y al aumento de temperatura, dichos R8s estarían más desestabilizados, llegando así a la capa M6. De hecho, en el inicio del *screen* al comparar los controles negativos con sistema *STaR GMR-Gal4* y con el sistema *Rh6-GMR-Gal4* se observó que la mayor carga genética del primer sistema producía más fenotipos en R8s post M3 y en M6 comparado con el segundo, cuya carga transgénica era menor. Igualmente, con respecto a la temperatura ya habíamos observado que en el caso de ambos sistemas, a 29°C se producían más fenotipos en los controles negativos que a 25°C. Por lo que se podría confirmar que la modificación de parámetros como la temperatura y la carga genética afectaría a la estabilización de los R8s, tal y como se ha observado en los experimentos realizados en esta tesis.

El sistema *STaR GMR-Gal4* mostró algunas limitaciones durante el *screen* sin embargo, una gran ventaja era poder visualizar las sinapsis a nivel de neuronas individuales, en nuestro caso, en los R8s. Aunque en este estudio este aspecto pasó a ser secundario, sería de gran interés emplear este sistema en los genes validados con líneas mutantes para así comprobar si, además de defectos en la selección de capa, también habría fallos en la sinaptogénesis.

## 2.3 Fenotipos leves en la selección de capa de R8

Los fenotipos observados en R8 una vez se finalizó el *screen* de los genes del enfoque no sesgado con RNAi, fueron leves. Sin embargo, aun siendo fenotipos bajos, confirmamos que realmente eran fallos reales en la selección de capa del R8 por varios motivos.

El primero fue que, previamente al inicio del estudio, confirmamos que el *driver GMR-Gal4 (short GMR)* del sistema *STaR GMR-Gal4* y del sistema *Rh6 GMR-Gal4* producía la expresión del RNAi (*UAS-RNAi*) prácticamente desde la formación del SM durante la diferenciación de los fotoreceptores. Otro tipo de *driver: GMR (long)-Gal4*, formado por otras regiones del promotor de *GMR*, se expresaba más tardíamente en el desarrollo una vez se daba la formación del SM, por lo tanto hubiera producido la expresión del RNAi más tarde en el tiempo que el *driver GMR (short)-Gal4*.

El segundo motivo fue que, tanto el sistema *Rh6 GMR-Gal4* como el *STaR GMR-Gal4*, eran capaces de producir fenotipos con genes controles positivos, como fue en el caso de *fra*. Este hecho confirmaba que con ambos sistemas se detectaban señales altas por lo que fueron válidos para identificar fenotipos en R8. Sin embargo, se tendría que haber tenido en cuenta la comprobación de ambos sistemas con un control positivo que produjera un fenotipo medio, facilitando así, la identificación de los mismos durante el estudio de esta tesis. De esta manera, se hubiera permitido determinar el rango de fenotipos que se podían detectar.

El tercer motivo se basó en el establecimiento de controles negativos. Los controles negativos fueron animales que no expresaron el RNAi, gracias a los cuales se estableció el ruido mínimo producido por el fondo genético y por la temperatura de trabajo. Estos controles negativos permitieron determinar un umbral específico con el objetivo de seleccionar a los genes candidatos. De esta manera, se seleccionaron como genes candidatos aquellos que tuvieran un *fc* establecido según los resultados del *screen* en cada grupo de genes, determinando así el umbral oportuno, priorizando el estudio de aquellos que mostraban un fenotipo más interesante. Los controles positivos y negativos dan información sobre la reproducibilidad, la robustez y facilidad del *screen*. Por lo tanto los fenotipos observados en este estudio serían bajos no a causa de la técnica empleada, si no por el silenciamiento parcial del gen en cuestión, pudiendo tener un efecto fuerte su pérdida total (similar a una mutación hipomorfa).

Los 5 genes en los que se validó el fenotipo RNAi con líneas mutantes o inserciones mostraron fenotipos leves en R8 de la misma manera que ocurría con el RNAi. Una explicación pudo ser que algunos de los mutantes testados no fueron completamente nulos, como por ejemplo en el caso de *Cyp31a1*, *GstE11* y *CG14397*. Aunque en la selección de dichos mutantes se tuvo en cuenta que afectarían al inicio del gen o a la región codificante, algunos de ellos, como *Cyp31a1*, *GstE11* y *CG14397*, no habían sido estudiados previamente, por lo que se desconocía si eran hipomorfos o nulos. Así, la realización de *CRISPR* en el caso de *Cyp31a1*, *GstE11* y *CG14397* sería un experimento ideal con el que se conseguiría un aumento del fenotipo en R8, al eliminar completamente el gen, corroborando su función en la selección de capa. No obstante, en el caso de *esn* y *Thor* los mutantes testados fueron nulos y producían fenotipos bajos: *esn*<sup>KO6</sup>, 9% de R8s post M3, *Thor*<sup>2</sup>, 4,5% de R8s post M3. Por lo tanto, estos fenotipos serían explicados por las siguientes razones.

La redundancia con otros genes que también actuaran en el proceso podría ser la razón biológica que explicase la aparición de dichos fenotipos bajos en R8. Así, el RNAi silenciaría totalmente el gen, produciendo un efecto más débil debido a un proceso redundante. Para esclarecer esta hipótesis se realizó un experimento con el objetivo de demostrar una interacción genética con Sens y con los genes regulados por éste. En este experimento genético se incluyeron los 5 genes candidatos validados y 2 genes extra, independientemente de si su validación se produjo con mutantes nulos (*Thor*, *5-HTB*) o hipomorfos (*esn*, *Cyp31a1*, *Tpr2*) o desconocidos (*GstE11*, *CG14397*). En los tres casos, la identificación de la interacción con Sens pondría de manifiesto una redundancia génica.

El único gen que mostró una interacción genética con Sens debido a un aumento del fenotipo en moscas con la inserción, en un fondo mutante heterocigoto de *sens*, fue *CG14397*. Aunque de este gen no se disponía información, fue elegido para su validación debido a que mostró un fenotipo con el RNAi igual de elevado al producido por *esn* (fenotipo *CG14397*= 7,35 % de R8s en M6, fenotipo *esn*= 6,57% de R8s en M6). Además, este gen presentaba sitios putativos de unión para Sens por lo que dicha interacción podría darse de forma directa. Para demostrarlo serían necesarios experimentos de *ChIP*, verificando así, que Sens actuaría en la región reguladora de *CG14397*, activando su expresión en R8. Sin embargo, el fenotipo producido en

un fondo mutante heterocigoto de *sens*, sigue siendo leve, lo que significaría que la inserción empleada no estaría produciendo una pérdida completa del gen.

En el caso de *esn* los resultados no mostraron un aumento del fenotipo al eliminar una copia de *sens*. Es importante tener en cuenta que dicho experimento se realizó con el alelo mutante hipomorfo de *esn* que reducía a la mitad la proteína (Daisuke Matsubara *et al.*, 2011), por lo que sería necesario realizarlo con el mutante nulo, asegurando así, la detección del aumento fenotípico. *esn* además, mostraba sitios putativos de unión a Sens, apoyando la hipótesis de que Sens esté regulando su expresión.

Con respecto a *Cyp31a1* y *Thor*, tampoco se detectó un aumento del fenotipo. Aunque estos genes no presentaban sitios putativos de unión a Sens, no se concluiría la no interacción con este, debido a que otros genes podrían mediarla, interaccionando así indirectamente.

Los dos genes extra fueron *AlphaPS5* y *Tpr2*. Ambos fueron seleccionados para este experimento por su bajo fenotipo observado en la validación, el cual solo podría ser significativo al aumentar en un fondo mutante heterocigoto para *sens*. Sin embargo, no se observó una interacción genética con Sens al no detectar un aumento fenotípico. No obstante, no se descartaría la interacción genética con Sens, ya que por ejemplo *Tpr2* también presentaba sitios putativos de unión para este.

Una razón que dilucidase que el fenotipo no aumentara en un fondo mutante heterocigoto de *sens* sería que dicho fondo mutante no sería suficiente como para poner el sistema al límite. Por lo que sería necesario establecer un fondo mutante más potente para forzar así la identificación de una interacción genética. *Otd* es un FT implicado en la expresión de las rodopsinas y en la morfogénesis de los fotorreceptores (McDonald 2010, Fichelson 2012) al regular la enervación de R1-R6 en las columnas de la *lamina* y la selección de capa de R8 en la *medulla* (Mencarelli and Pichaud, 2015). En esta última función actúa junto con Sens de forma independiente, regulando la expresión de *Fmi*, *Gogo* y *Caps*. Por estas razones, el fondo mutante idóneo para forzar el sistema al límite y producir así un aumento del fenotipo observado en la validación del mismo, podría ser un fondo mutante doble heterocigoto de *sens* y *otd*.

En el caso de no identificar una interacción genética de los genes validados con Sens y *Otd*, podría significar que debido a los bajos fenotipos observados, tanto en el *screen* con RNAi como en la validación con líneas mutantes, los genes validados tendrían una función parcial en la selección de capa. Así, los FTs Sens y *Otd* dirigirían totalmente la maquinaria transcripcional en R8 requerida para que el cono de crecimiento identifique su capa final, siendo la acción combinatoria de los genes regulados directa o indirectamente por ellos, el mecanismo general que determinase la extensión final del axón del R8.

Los genes que presentaban sitios putativos de unión para Sens y/o Pros se encontraban distribuidos de forma regular en todos los grupos procedentes del enfoque no sesgado. Sin embargo, al estudiar la presencia de estos en los 43 genes candidatos, se observó que el 58% de los genes (25 genes) no presentaba sitios de unión, el 28% (12 genes) los mostraba para Sens y Pros, el 14% (6 genes) tenía sitios putativos de unión a Pros y ninguno de ellos presentaba sitios de unión para Sens. Por lo que, según las herramientas bioinformáticas empleadas para la predicción de los sitios de unión, más de la mitad de los genes candidatos podrían no ser activados por Sens en R8 ni reprimidos por Pros en R7. No obstante, lo esperado hubiera sido que más de la mitad de los genes mostraran sitios de unión para Sens y/o Pros ya que son los FTs que controlan la selección de capa de R8 y R7. Al no observar dicha correlación, se

propondría la realización de la técnica *ChIP* para confirmar la predicción realizada mediante herramientas bioinformáticas de los sitios de unión.

La clasificación de los genes enriquecidos en R8 en diferentes grupos permitió la identificación de grupos de genes con un comportamiento similar, según su patrón de expresión. Esto sugería que los genes con similar expresión podrían funcionar en el mismo proceso biológico, como es la selección de capa de R8. Sin embargo, los resultados del *screen* han mostrado que el 82% de los genes candidatos (35 de 43 genes) eran genes no agrupados. Por lo tanto, no se detectó una correlación entre la realización de grupos de genes con su implicación en el proceso. Esta observación pondría de manifiesto un estudio alternativo al *screen* genético realizado en esta tesis. Este estudio consistiría en la selección de un conjunto pequeño de genes para llevar a cabo su estudio detallado. Sin embargo, es importante tener en cuenta que una razón que explicase la ausencia de genes candidatos procedentes del resto de grupos, podría ser las dificultades técnicas producidas al inicio del *screen* genético. Esto podría haber provocado que genes candidatos adicionales no se detectaran en ese momento inicial.





## 3. Estudio de los genes candidatos

### 3.1 *ken*

Ken es un FT cuya función es la formación de los genitales y la pigmentación de las aristas (Castrillon *et al.*, 1993; Lukacsovich *et al.*, 2003). Debido a sus dominios proteicos se ha sugerido que pueda actuar reprimiendo la expresión de genes regulados por él (Dhordain *et al.*, 1998; Huynh and Bardwell, 1998). De hecho, estudios previos han demostrado que Ken es un regulador negativo de la vía de JAK/STAT. Esta vía está implicada en la regulación de genes necesarios para el crecimiento celular, supervivencia, desarrollo y diferenciación. Además, está ligada con el sistema nervioso, ya que defectos en esta ruta producen la inflamación del cerebro y la limitación de la supervivencia de neuronas y células gliales (Nicolas *et al.*, 2013). De forma interesante, la vía de JAK/STAT está implicada en el desarrollo del sistema nervioso, de manera que la activación de STAT92E es necesaria para el crecimiento axonal de neuronas del SNC y del SNP en el embrión de *Drosophila* (Li *et al.*, 2003). Adicionalmente, Ken actúa en el desarrollo o mantenimiento del circuito neural en las fibras gigantes de *Drosophila* (Allen *et al.*, 2007). La implicación directa o indirecta con el SN, hizo a Ken un FT atractivo para estar implicado en el desarrollo del sistema visual de *Drosophila*.

*ken* mostró una expresión en R8 a 40h DFP de un *rpk*m de 6,2, mientras que en R7 su expresión fue nula. Además, aunque su expresión en R8 disminuyó conforme el proceso de selección de capa avanzaba (50h DFP: 4,4 *rpk*m y 60h DFP: 2,7 *rpk*m), no se descartaría que pudiera ejercer una función, no solo al inicio de dicho proceso, sino que también a medida que el axón del R8 avanza hacia su destino final. Por lo que este FT actuaría en R8 al ser activado por Sens ya que su región reguladora presentaba sitios putativos de unión a Sens al inicio y/o durante la progresión de la selección final de capa. Gracias a los datos obtenidos en la plataforma *i-cis Target* se postula que Ken regularía la expresión de una parte de los genes que estaban enriquecidos en R8, debido a la presencia de sitios de unión a este FT. Esta intrigante información, junto con los datos de expresión procedentes del *RNA-seq*, convirtió a Ken en uno de los objetos de estudio en esta tesis.

Para comprobar que Ken se expresaba en R8 a 40h DFP existían un anticuerpo y unas líneas *enhancer-trap* que habían sido empleadas para detectar Ken en los testis, tejido donde su expresión era leve (Issigonis and Matunis, 2012). Durante esta tesis se intentaron confirmar los datos obtenidos del *RNA-seq* a través de dicho anticuerpo y de las líneas de *enhancer-trap*, no teniendo éxito en la detección de Ken en el núcleo de R8. Sin embargo, al no haber realizado un control positivo de su detección en los testis con el anticuerpo o con las líneas *enhancer-trap*, no sabemos si dichos reactivos funcionaban de forma correcta o no. Dado que en estudios previos tuvieron dificultades para la visualización de Ken en los testis, se decidió seguir adelante en la realización de experimentos de pérdida de función de *ken* en los fotorreceptores y en R8. No obstante, sería necesario confirmar la expresión de Ken en el núcleo de R8 mediante *RT-PCR*.

Los experimentos de pérdida de función de *ken* se realizaron con el alelo hipomorfo más fuerte *Ken*<sup>11035</sup>. Sin embargo, tanto en animales mutantes *Ken*<sup>11035</sup> en *trans*-heterocigosis a una deficiencia que cubría el gen, como en clones de R8s mutantes homocigotos, estos eran capaces de identificar y alcanzar su capa final M3 en la *medulla*. Únicamente en los animales mutantes se observó un menor número de R8s marcados con GFP comparado con animales salvajes. Para visualizar los R8s, en este caso, se empleó el transgen *sens-Gal4, UAS-utrGFP*, por lo que se sugirió que Ken podría estar regulando una parte del promotor de *sens*, razón por la cual se observaba un menor número de R8s GFP positivos en animales mutantes *Ken*<sup>11035</sup>. El motivo por

el que en el caso de clones mutantes homocigotos no se observó este defecto, pudo ser debido a que en los clones mutantes habría aún proteína *WT* Ken, siendo capaz de regular a Sens, produciendo así la expresión normal de GFP en dichos clones. Este resultado, dejaba la puerta abierta a la hipótesis de que Ken, además de regular la expresión de los genes enriquecidos en R8, también estaría activando la expresión de Sens para una función más tardía, que podría estar relacionada con la expresión de las opsinas o con la formación de la sinapsis.

Antes de descartar a Ken como FT implicado en la selección de capa del R8 realizamos un experimento genético para descartar un proceso de redundancia génica. Ya que una posibilidad que explicase la no aparición de un fenotipo en R8 podría ser que otros genes supliesen la pérdida de *ken*, haciendo que el sistema funcionase con normalidad. Para ello, obtuvimos moscas mutantes *Ken<sup>11035</sup>* en *trans*-heterocigosis a una deficiencia que cubría el gen, en un fondo heterocigoto mutante *sens<sup>E1</sup>*. De la misma manera, se realizó el mismo experimento en clones mutantes homocigotos R8s. Así, el sistema se desestabilizaría más ya que la pérdida de una copia de *sens* causaría una disminución de la expresión de genes regulados por él, provocando un fenotipo en R8. Los resultados no mostraron ningún defecto en la guía axonal de R8 sugiriendo que Ken no estaría implicado en este proceso, aunque sí que podría tener otra función al regular, probablemente, la expresión de Sens.

Los datos obtenidos del *RNA-seq* indicaron que Ken no se expresaba en R7 a 40h DFP. Además, las herramientas bioinformáticas proponían que este FT tendría sitios de unión para Sens y Pros. Con respecto a R7 esto sugeriría que Ken podría estar reprimido por Pros en esta neurona, lo cual sería necesario para que R7 llegara a su capa M6. Para confirmarlo, se expresó de forma ectópica *ken* en los fotorreceptores con el objetivo de detectar un fenotipo en R7. Sin embargo, se observaron fenotipos que se consideraron inespecíficos ya que afectaban a la organización en la *medulla*, tanto de R7s como de R8s. Dichos fenotipos serían la consecuencia de que la sobreexpresión de *ken* en los fotorreceptores afectara a la estabilidad de estos debido a que *ken* se estaría expresando en unos niveles mayores de los que dichas células pudiesen soportar. Este resultado nos señalaba que la predicción de los sitios de unión para Sens y/o Pros no reflejaría la represión de *ken* a través de Pros en R7. Estudios previos han sugerido que Pros inhibe el programa de R8 en R7 (Morey *et al.*, 2008). Por lo que si Pros inhibe a Ken en R7, su expresión ectópica podría haber producido un cambio en la selección de capa de este fotorreceptor hacia la capa receptora de R8. Sin embargo, otra posibilidad que se podría contemplar es que Pros inhiba a Ken para otras funciones independientes a la selección de capa en R7. Para corroborar que Pros y Sens se unen a la región reguladora de Ken según la información de los modelos predictivos, se tendrían que realizar experimentos de *ChIP*.

Una hipótesis alternativa que apoyara la idea de que Ken funcione controlando la selección de capa en R8, es que el fondo heterocigoto mutante de *sens* no sería suficiente como para poner el sistema al límite para generar un fenotipo. Un fondo mutante ideal sería el formado por un mutante heterocigoto de *sens* junto con un mutante heterocigoto de *otd*, ya que ambos son los FTs que controlan el proceso de la selección final de capa del R8 (Morey *et al.*, 2008; Mencarelli and Pichaud, 2015). Así los genes regulados por *Otd* también disminuirían su expresión, favoreciendo en mayor medida la aparición de defectos en los R8s.

Como se ha mencionado anteriormente, Ken es un regulador negativo de la vía de JAK/STAT, una función que podría ser relevante en el R8. Sin embargo, al no haber detectado fenotipos en R8s en animales mutantes o en clones mutantes homocigotos de *ken*, se podría descartar la implicación de la vía de JAK/STAT en la selección de capa. Otra posibilidad sería que el aumento de la vía de JAK/STAT causado por la pérdida de *ken* no sería suficiente como para alterar la función del R8 o que la presencia de otros reguladores negativos producirían los niveles

normales de JAK/STAT. Experimentos en estudios previos han sugerido que el FT que funciona en la vía de JAK/TAT, STAT92E, podría tener una función en la extensión axonal durante el desarrollo en neuronas del SNC y SNP (Li *et al.*, 2003). Según los datos del *RNA-seq* este FT se encuentra expresado en R8 a 40h DFP, con un *rpkm* de 7, aunque no estaría enriquecido comparado con R7. Por lo que una posibilidad sería que su sobreexpresión en R8 produjera una mayor extensión axonal lo que significaría que la pérdida de *ken* no era suficiente para producir una mayor actividad de la vía de JAK/STAT. Dicha ruta presenta bastantes componentes que la regulan de forma negativa, logrando que su actividad sea rápida y transitoria (Eyles and Hilton, 2003). Por lo que seguramente otros reguladores negativos de la vía de JAK/STAT suplirían la pérdida de *ken* en R8, manteniendo unos niveles normales de STAT92E. Por ejemplo, un regulador negativo que se encuentra altamente expresado en R8 durante los tres tiempos analizados del *RNA-seq*, es *Socs16D*. Es decir, puede que este regulador negativo esté supliendo la pérdida de *ken* en R8, haciendo que su extensión axonal proceda con normalidad. Para confirmar esta hipótesis se obtendrían animales dobles mutantes para *ken* y *Socs16D*, con el objetivo de detectar así, un fenotipo en R8. De esta manera, se verificaría un proceso de redundancia con otros miembros de la vía.

Por otra parte, no se descartaría una función de Ken en la selección de capa de R7 ya que al analizar su expresión en este fotorreceptor se observó que Ken únicamente se expresaba durante el proceso de selección de capa (50h DFP), teniendo un *rpkm* de 6. Esto sugería que este FT podría tener en paralelo a R8, una función en R7 al ser activado a través de Pros. Dicha hipótesis se apoyaba gracias a que Ken presentaba sitios putativos de unión a Pros, según las matrices obtenidas en *JASPAR* y *Fly factor survey*. Contrastando con dicha hipótesis, en animales mutantes *ken<sup>11035</sup>* no se detectaron defectos en la selección de capa de R7, por lo que sugerimos que Ken estaría implicado en otras funciones necesarias en R7. Aunque, como se comentó anteriormente, sería necesario la validación de los sitios de unión mediante *ChIP*.

### 3.2 *GstE11*

El gen de la *GstE11* codifica para una enzima implicada en mantener el estado REDOX de las células mediante la detoxificación de sustratos xenobióticos (Mannervik and Danielson, 1988; Hayes and Pulford, 1995). Esta enzima, entre los diferentes miembros de la familia E, es la que presenta mayor eficiencia catalítica hacia su sustrato. Además, tanto la familia GSTE como la D, están principalmente especializadas en la detoxificación ya que pueden catalizar una gran variedad de sustratos (Saisawang, Wongsantichon and Ketterman, 2012).

*GstE11* resultó ser un gen enriquecido en R8 a 40h DFP, formando parte del grupo específico de R8, por no estar expresado en R7. De hecho, el *RNA-seq* mostró que prácticamente se expresaba a 40h DFP en R8, sugiriendo que actuaría de forma específica al inicio del proceso en R8. El *screen* mediante RNAi de los genes enriquecidos en R8 del enfoque no sesgado, identificó el fenotipo más alto observado en la selección de capa del R8, donde el 14,5% de R8s fueron post M3 y el 10% mostró el fenotipo en M6. Esto provocó que este gen se convirtiera en objeto de estudio en esta tesis.

Al proceder a la validación el fenotipo de *GstE11* con una línea mutante desconocida, para nuestra sorpresa, el fenotipo que se obtuvo fue extremadamente bajo comparado con el observado con el RNAi. Esto nos llevó a pensar que el RNAi podría estar produciendo efectos *off-targets* causando el fenotipo en R8 ya que se corroboró que el mutante empleado afectaba a la región codificante del gen de las dos isoformas de *GstE11*. Sin embargo, moscas mutantes *GstE11<sup>d06699</sup>* en *trans*-heterocigosis a una deficiencia que además expresaban el RNAi de *GstE11*, mostraron un aumento significativo del fenotipo comparado con moscas que únicamente

expresaban el RNAi de *GstE11*. Este resultado apoyaba la idea de que realmente la falta de *GstE11* estaba produciendo defectos en el R8. Sin embargo, este aumento fenotípico inespecífico podría ser la consecuencia de la gran carga genética, lo cual fue descartado ya que, mediante *RT-PCR* se demostró que el RNAi de *GstE11* producía la bajada del transcrito. Por lo tanto, se confirmaría que *GstE11* tendría una función en la selección de capa del R8. El experimento de rescate del fenotipo al reintroducir el gen, corroboraría si realmente es la falta de este, la que produce el fenotipo en R8s.

El análisis del *RNA-seq* mostró la existencia de otras familias de GSTs expresadas en R7 y R8 en los tiempos analizados. De forma interesante, algunos mostraban una expresión elevada tanto en R7 como en R8 a 40h, 50h y 60h DFP, mientras que otros, incluida *GstE11*, estaban enriquecidos en R8 a 40h DFP. Solo una parte de ellas se seleccionaron para su estudio mediante RNAi ya que el resto no presentaban un *rpkms*>5 y un *fc*>5 (Tabla 10).

Gen	R7			R8			Fc R8/R7		
	40h DFP	50h DFP	60h DFP	40h DFP	50h DFP	60h DFP	40h DFP	50h DFP	60h DFP
<i>GstD1</i>	347,20	94,47	46,22	275,54	75,26	25,04	0,79	0,80	0,54
<i>GstD2</i>	0,13	0,33	0,35	0,77	2,52	0,14	5,71	7,65	0,39
<i>GstD3</i>	0,72	4,67	0,38	13,25	2,23	0,38	18,46	0,48	1,00
<i>GstE1</i>	0,10	3,32	1,24	1,47	2,09	1,33	15,42	0,63	1,07
<i>GstE3</i>	5,44	14,30	10,83	3,64	12,20	4,26	0,67	0,85	0,39
<i>GstE5</i>	0,21	0,75	0,40	0,59	2,27	0,81	2,77	3,03	2,03
<i>GstE6</i>	2,39	9,36	2,10	6,15	8,67	2,54	2,57	0,93	1,21
<i>GstE11</i>	0,35	4,32	2,29	26,26	4,04	1,67	75,58	0,93	0,73
<i>GstE12</i>	38,72	94,20	44,85	57,65	62,75	47,18	1,49	0,67	1,05
<i>GstE13</i>	66,46	107,33	108,66	67,13	84,93	87,81	1,01	0,79	0,81
<i>GstE14</i>	0,09	3,88	0,15	7,80	6,12	0,34	84,88	1,58	2,25
<i>GstS1</i>	118,95	266,18	214,66	160,28	376,03	434,10	1,35	1,41	2,02
<i>GstT4</i>	2,53	0,50	0,33	2,98	0,46	0,41	1,18	0,91	1,23
<i>GstT3</i>	4,90	9,25	2,42	3,29	4,78	1,99	0,67	0,52	0,82

**Tabla 10. Patrón de expresión de otras familias de GSTs en R7 y R8 en la selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).** Se representa el nombre de cada gen, el *rpkms* obtenido como la media de las réplicas realizadas en el *RNA-seq* en cada tiempo analizado y el *fc* para cada gen en cada etapa comparando R8 con R7. En color rojo están resaltados los genes *GstD3*, *GstE11* y *GstE14* por estar enriquecidos en R8 con un *fc*>5. El gen *GstD3* no mostró fenotipo en R8 en el *screen* de los genes enriquecidos del enfoque no sesgado.

Una de ellas fue *GstE14*, también miembro de la familia E, que mostró un fenotipo de R8 en M6 al silenciarse mediante RNAi en el *screen* realizado en esta tesis. Dicho fenotipo, se produjo con las dos líneas RNAis testadas, sugiriendo la validez del mismo. Sin embargo, sería necesaria la validación del fenotipo mediante líneas mutantes, siendo en este caso letales. La técnica *MARCM* permitiría la validación del fenotipo ARNi en clones de R8s mutantes homocigotos para *GstE14*. Este experimento no se realizó durante esta tesis debido a que inicialmente se centró en la validación de los genes que presentaban líneas mutantes viables, cuya validación era más inmediata.

Para demostrar que los dos miembros de la familia E colaborarían en el proceso de la selección de capa de R8, se tendría que analizar el fenotipo en R8 en animales dobles mutantes para *GstE11* y *GstE14*. En el caso en el que se observara un aumento fenotípico comparado con el

producido en animales mutantes individuales para cada gen, podríamos confirmar que ambas enzimas actúan en el mismo proceso de forma redundante. Además la familia E puede catalizar una gran variedad de sustratos y en concreto, *GstE11* es la que presenta mayor eficiencia catalítica (Saisawang, Wongsantichon and Ketterman, 2012). Por lo tanto, con este experimento se sugeriría que *GstE11* y *GstE14* tendrían un papel en la selección de capa de R8. Esta función sería independiente a su efecto protector frente al estrés oxidativo ya que en animales con pérdida de función de ambas enzimas, se esperaría observar que la desregulación del estado REDOX produjera un fenotipo en M1 en R8 debido a su neurodegeneración. Sin embargo el fenotipo observado en ambos casos consistía en R8s que eran capaces de alcanzar su capa pero la sobrepasaban. Esto sugiere que el desequilibrio REDOX producido por la pérdida de función de *GstE11* y/o *GstE14* lo suplirían otras GSTs con expresión en R8 (Tabla 10), mientras que *GstE11* y *GstE14* tendrían un papel específico en la selección de capa de R8.

Por otra parte, otra posibilidad es que los genes de otras familias de GSTs expresados en R8 puedan tener una función redundante en la selección de capa. Experimentos de pérdida de función de *GstE11* o *GstE14* en un fondo mutante heterocigoto para las GSTs de otras familias, nos darían la información de una interacción genética y por tanto, de una colaboración en el mismo proceso. Además, debido a que algunas de ellas también están expresadas en R7 no se descarta que pudieran tener una función en su selección de capa.

### 3.3 *esn (espinas)*

*Esn* estaba implicado en las interacciones repulsivas entre las dendritas de la larva necesarias para el correcto procesamiento y transmisión de la información. Dicha función se conseguía gracias a la interacción entre el dominio LIM de *Esn* y el dominio C-terminal de la cadherina no clásica *Fmi* (D. Matsubara *et al.*, 2011). La interacción genética observada entre *Esn* y *Fmi* en R8 junto con la literatura previamente publicada, nos llevó a relacionar *Esn* y *Fmi* en R8.

*Fmi* estaba implicado inicialmente en la regulación de las interacciones aferente-aferente entre R8s necesarias para mantener su espaciado y en la formación de los *cartridges* en la *lamina* (K.-A. Senti *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Chen and Clandinin, 2008). Además, *Fmi* funciona en la selección de capa del R8 interactuando con *Gogo* de dos maneras: 1) promoviendo su desanclaje de la capa M1 ya que la pérdida total de *Fmi* hace que los R8s se detengan en M1 (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). 2) Estabilizando el cono de crecimiento de R8 en M3 ya que experimentos de sobreexpresión de *Fmi* y *Gogo* en R7 demuestran que parte de estos se detienen en la capa receptora del R8, sugiriendo esta función estabilizadora (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). En concordancia con esta hipótesis, en esta tesis se ha observado que la pérdida parcial de *Fmi* mediante RNAi en los fotorreceptores produce un 23,6% de R8 en M6 y un 6,1% de R8s post M3. Así, los R8s que perdían totalmente *Fmi* eran incapaces de reconocer su capa M3, permaneciendo en M1, aunque si lo perdían parcialmente podrían ser capaces de iniciar su movimiento hacia M3, pero al no tener los niveles suficientes de *Fmi*, el cono de crecimiento no se estabilizaría en M3 y avanzaría hacia M6.

El fenotipo post M3 producido por la pérdida parcial de *Fmi* sería similar al fenotipo post M3 provocado por la pérdida total de *Esn*, donde los R8s no serían capaces de estabilizar su cono de crecimiento en M3 o de reconocer su capa final. Una teoría que justifique porqué el 89% de R8s mutantes nulos de *esn* realiza correctamente la selección de capa, podría ser que en estos R8s otras moléculas, como *Fmi*, suplirían la pérdida *esn*. Así, *Esn* colaboraría con *Fmi* y *Gogo* en la guía axonal de R8.



Como se ha comentado anteriormente, Esn y Fmi interactúan en las neuronas de la larva a través del dominio LIM de Esn y el C-terminal de Fmi (D. Matsubara *et al.*, 2011). Este hecho, nos hizo plantear que dicha interacción también estuviese ocurriendo en el R8, siendo necesaria para la estabilización de su cono de crecimiento. Para demostrar si ambos genes funcionaban en este proceso se realizaron experimentos con el objetivo de identificar una interacción genética entre ambos genes.

Los resultados de los dos experimentos alternativos que se llevaron a cabo indicaron que Esn y Fmi interactúan genéticamente. Esto se observó al detectar un aumento fenotípico en animales mutantes donde la pérdida de *esn* y *fmi* no fue completa y en animales mutantes donde la pérdida de *esn* y *fmi* fue prácticamente completa. En la condición mutante donde la pérdida de función de *esn* y *fmi* no era completa el fenotipo post M3 aumentaba, mientras que en la condición mutante en la que la pérdida de *esn* y *fmi* era mayor aumentaba el porcentaje de R8s en M1. Esta diferencia entre los fenotipos correspondería a un reflejo del comportamiento de R8 según los niveles de actividad de Esn y Fmi. Es decir, cuando estas neuronas presentaran niveles leves de Esn y Fmi serían capaces de llegar a su capa M3, aunque no estabilizarían el cono de crecimiento. Sin embargo, si en los R8s los niveles de Esn y Fmi fueran extremadamente bajos, se producirían defectos más fuertes en el proceso de estabilización, incluso impidiendo la extensión axonal hacia la capa M3. Esto concordaba con el diferente comportamiento de los R8s según los niveles de Fmi.

La interacción genética entre Esn y Fmi podría ocurrir de forma directa (física) o indirecta en R8. Ambos interactúan físicamente en las dendritas de las neuronas en la larva a través del dominio LIM de Esn (D. Matsubara *et al.*, 2011), sugiriendo que este dominio también podría estar interactuando con Fmi en R8 para funcionar en la selección específica de capa. Por lo tanto, la primera pregunta que nos realizamos fue ¿el dominio LIM de Esn es importante para su función en R8? Para contestar esta pregunta se realizaría un experimento de rescate en animales que expresaran una forma mutante de *esn* a la que le faltase el dominio LIM (*esn<sup>ΔLIM</sup>*). Una opción sería que en estos animales no se rescatase el fenotipo de Esn, lo que confirmaría que el dominio LIM es necesario para la función de Esn en la selección de capa de R8. La siguiente cuestión sería conocer si el dominio LIM mediaría la interacción entre Esn y Fmi, al igual que ocurre en las dendritas de la larva (D. Matsubara *et al.*, 2011). Para desvelar esta hipótesis se tendrían que llevar a cabo experimentos de *ChIP*, lo cual nos confirmaría que Esn y Fmi actuarían en el mismo complejo proteico o experimentos de *Two Hybrid* para demostrar que ambas moléculas interactuarían físicamente. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la interacción entre Esn y Fmi podría ser transitoria (D. Matsubara *et al.*, 2011), pudiendo dificultar la detección de la interacción en R8. Si el dominio LIM de Esn es importante para la función de R8, pero no se identificara la interacción directa entre Esn y Fmi, se sugeriría que ambos podrían estar actuando de forma paralela.

Si Fmi y Esn formasen parte del mismo complejo proteico o interactuaran físicamente ¿cómo colaboraría Esn con Fmi y Gogo en R8? Fmi y Gogo tienen una función en R8 colaborando en su selección de capa (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). Los experimentos de sobreexpresión de Gogo junto con una forma mutada de Fmi en su dominio C-Terminal en R7 producían un fenotipo elevado de R7s en la capa M3. En cambio, la sobreexpresión de Fmi y una forma mutada de Gogo en su dominio citoplasmático causaba un fenotipo más leve de R7s en la capa M3. Estos resultados demostraban que es el dominio citoplasmático de Gogo el principal encargado de transducir la señal necesaria hacia el cono de crecimiento del R8 (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). Sin embargo, la forma mutante de Fmi defectuosa en su dominio C-Terminal no tenía afectada la región a través de la cual interactuaría con Esn. Por lo que, el fenotipo producido en R7 por la sobreexpresión de Gogo y dicha forma mutada de Fmi sería consecuencia de Gogo, pero también de Fmi, ya que Esn se uniría a su diana en una parte del dominio C-Terminal de Fmi.

Además, el fenotipo leve producido en R7 por la sobreexpresión de Fmi y la forma mutada de Gogo se daría por la implicación parcial del dominio C-Terminal de Fmi a través de Esn. Por lo tanto, se sugiere que el dominio C-terminal citoplasmático de Fmi sería, en parte, necesario para transducir la señal en R8 para así interactuar con Esn. Así, el dominio citoplasmático de Gogo transmitiría al R8 la señal principal de movilizarse hacia su capa final mediante su interacción *cis* con Fmi. Este proceso también sería favorecido por las interacciones homotípicas entre Fmi del R8 y Fmi expresado en la región diana (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2011). Pero además, el dominio C-terminal de Fmi transduciría una parte de la señal necesaria para la extensión del R8 gracias a su interacción con el dominio LIM de Esn. De esta manera, se producirían las modificaciones necesarias en el citoesqueleto del R8, permitiendo así la extensión axonal requerida para alcanzar su capa final M3.

Por otra parte, ¿cómo funcionaría Esn en R8 si su dominio LIM fuese dispensable para la selección de capa? Este hecho se confirmaría en el experimento de rescate comentado anteriormente, donde animales que expresen la forma defectuosa de Esn, *esn<sup>ΔLIM</sup>*, rescatasen el fenotipo de Esn en R8. Este resultado sugeriría que la función de Esn en R8 se llevaría a cabo a través de otro dominio proteico el cual podría estar implicado en la interacción con Fmi. No obstante, otra posibilidad se basaría en que Esn podría seguir estando implicado en la modificación del citoesqueleto del R8 gracias a su interacción indirecta con Fmi, mediada por otras moléculas. Sin embargo, Esn podría funcionar en R8 mediando otros procesos no relacionados con el citoesqueleto necesarios igualmente para la extensión axonal.





**Futuros experimentos**



## Otros genes interesantes implicados en la selección de capa de R8

### *Cyp31a1*

Este gen codifica a la enzima REDOX del citocromo P450, la cual está presente en todos los organismos (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Esta enzima fue caracterizada originalmente por sus funciones en la detoxificación de xenobióticos, sin embargo también tiene actividad catalítica en el metabolismo que muchas moléculas endógenas esenciales (Zhao *et al.*, 2002; Gilbert, 2004). En mamíferos este tipo de enzimas conservadas evolutivamente están implicadas en la detoxificación de varios compuestos, así como de la síntesis del colesterol y el metabolismo de la vitamina D. Por otro lado, las que no están muy conservadas entre especies han emergido como respuestas evolutivas a estímulos xenobióticos (Thomas, 2007).

En *Drosophila*, estudios previos mostraron que *Cyp31a1* se expresa en el intestino del embrión y de la larva, así como en la epidermis embrionaria (Chung *et al.*, 2009). Respecto a su función, está involucrada en la formación de la cutícula adulta al observar defectos en mutantes de RNAi y en líneas mutantes (Sztal *et al.*, 2012). Además de tener dicha función, se ha descrito que esta enzima interacciona genéticamente con Tau, una proteína asociada a los microtúbulos implicada en algunos tipos de demencia (Butzlaff *et al.*, 2015), como por ejemplo el Parkinson ligado al cromosoma 17 (Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). Mutaciones de la proteína Tau producen una acumulación de filamentos que causan defectos en el transporte axonal. Estos filamentos estaban formados por la hiperfosforilación de la proteína Tau, siendo característicos de varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo el Alzheimer, llamadas taupatías (Goedert *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1991). Un estudio basado en la búsqueda de genes modificadores de la toxicidad de Tau, encontró que el silenciamiento de *Cyp31a1* mediante RNAi expresado en fotorreceptores, provocaba un aumento del fenotipo provocado por la toxicidad de Tau (Butzlaff *et al.*, 2015). Por lo que, este estudio sugería que *Cyp31a1* podría estar implicado en el mantenimiento de los microtúbulos de neuronas maduras, evitando defectos en el transporte axonal.

*Cyp31a1* pertenecía al grupo de los genes enriquecidos en R8 a 40h DFP y debido a su patrón de expresión (Figura 51) formaba parte de los genes no agrupados. Según los datos del *RNA-seq*, la expresión de *Cyp31a1* era mayor en R8s a 40h DFP comparado con su expresión en R7s, donde prácticamente no se expresa durante todo el proceso (40h, 50h y 60h DFP) (Figura 51).

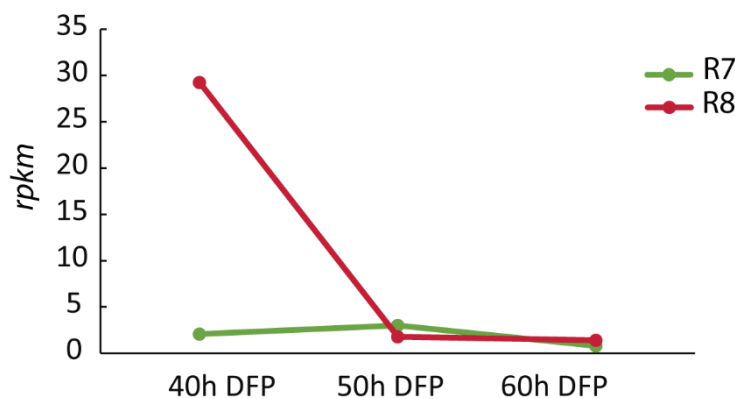


Figura 51. Patrón de expresión de *Cyp31a1* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

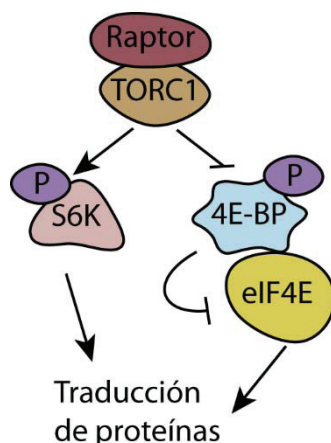
Además, el hecho de que este gen esté solo expresado a 40h en R8s, sugería que estaría haciendo su función en el inicio del proceso final de selección de capa. Los experimentos de pérdida de función realizados mostraron un fenotipo que consistía en un 3% de R8s en M6 mediante RNAi (Tabla 14, Anexo 1) y un 5,5% de R8s localizados post M3 mediante una línea mutante (Figura 34).

Para poder confirmar que Cyp31a1 tiene una función en la guía axonal del R8 sería necesario rescatar el fenotipo mutante en animales donde se reintrodujera de nuevo este gen. Así, Cyp31a1 estaría implicado en la guía axonal del R8, quizás manteniendo el transporte axonal necesario para la elongación del R8 y poder detenerse en su capa final.

## Thor

Thor (4E-BP) es una proteína la cual no debe de ser confundida con Tor. Thor se une al factor de iniciación de la traducción que es regulada por Tor. Mediante la fosforilación de Thor, este se inactivará y como consecuencia se dará la traducción, mientras que Thor será activo al desfosforilarse, inhibiendo así la traducción.

Tor es una kinasa serina-treonina, diana de la droga rapamicina y fue identificada originalmente por mutaciones que conferían resistencia a las propiedades inhibitorias de crecimiento de la rapamicina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman, Movva and Hall, 1991). Tanto en humanos como en *Drosophila*, Tor se asocia con otras proteínas en la célula formando así dos tipos de complejos, siendo el complejo 1 (TORC1) donde se encuentra haciendo su función en la regulación de la traducción junto con la kinasa S6 (S6K) (Wullschleger, Loewith and Hall, 2006) (Figura 52).



**Figura 52. Ruta de Tor.** Tor se une a Raptor para controlar la fosforilación (P) de S6K y Thor (4E-BP), el cual inhibe al factor de iniciación de la traducción (eIF4E). La liberación de eIF4E, debido a la fosforilación de Thor, produce la formación del complejo eIF4E, requerido para la traducción dependiente de cap.

La ruta de Tor tiene otras funciones independientes a la regulación del tamaño celular. Está implicada en el desarrollo del SN controlando la migración celular, crecimiento sináptico y la guía axonal (Tavazoie *et al.*, 2005; Swiech *et al.*, 2008). Se ha demostrado que el aumento en la actividad de la vía de Tor en humanos causaba la enfermedad llamada esclerosis tuberosa (Inoki, Corradetti and Guan, 2005). Esta enfermedad producía trastornos en el comportamiento de los pacientes sin embargo, la causa por la cual eran producidos era desconocida. El uso de animales modelo reveló que las alteraciones en la vía de Tor estaban detrás de estos trastornos al verse

afectada la función sináptica, la guía axonal, la arborización dendrítica y la migración celular durante el ensamblaje cortical (Neufeld, 2004; Kwon *et al.*, 2006; Meikle *et al.*, 2008; Koike-Kumagai *et al.*, 2009).

De forma específica, en *Drosophila* se ha demostrado que la sobreexpresión de la ruta de Tor producía defectos en la guía axonal de los fotorreceptores en el cerebro, déficits en la fototaxis y aumento en el tamaño e hiperactividad de la sinapsis en la unión neuromuscular (Dimitroff *et al.*, 2012). Además, como fue comentado anteriormente, Thor tenía un papel protector en Parkinson (Tain *et al.*, 2009). Se observó que los fenotipos producidos por mutantes de genes relacionados con la patogénesis del Parkinson eran suprimidos al sobreexpresar *Thor*, además la mutación nula de *Thor* también producía el mismo fenotipo neurodegenerativo que dichos mutantes.

*Thor*, que estaba enriquecido en R8 a 40h DFP, pertenecía a la categoría de los genes no agrupados debido a su patrón de expresión. Teniendo en cuenta los resultados del *RNA-seq*, *Thor* está más expresado en R8s frente a R7s a 40h DFP ( $fc > 5$ ). Al avanzar en el tiempo, se observó que su expresión se elevó levemente a 50h DFP, al igual que ocurría en R7s. A 60h DFP, la expresión *Thor* volvía a ser igual que a 40h y de forma contraria en R7s, presuntamente aumentaba exponencialmente (Figura 53).

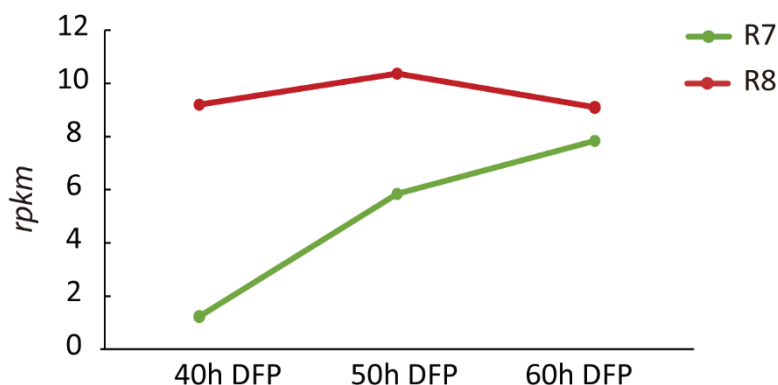


Figura 53. Patrón de expresión de *Thor* durante el proceso final de selección de capa (40h, 50h y 60h DFP).

Respecto a los experimentos realizados de pérdida de función de *Thor* en los fotorreceptores, se observó que el silenciamiento del gen con dos líneas independientes de RNAi produjo alrededor de un 3% de R8s detenidos de forma errónea en la capa M6 de la *medulla* (Tabla 14, Anexo 1). Dicho fenotipo se confirmó por medio de un mutante completamente nulo, el cual produjo un fenotipo del 4,5% de R8s post M3 (Figura 34). Para poder confirmar que este fenotipo se producía por la pérdida de función de *Thor*, sería necesario realizar un experimento en el que se rescatara el fenotipo mutante al reintroducir el DNA de *Thor*. Si esto es confirmado, se podría concluir que el aumento en la actividad de Tor a través de la pérdida de función de *Thor* produciría defectos en la selección de capa de R8.

El mantenimiento en los niveles de la vía de Tor sería necesario para la correcta selección de capa. Este planteamiento tendría sentido ya que estudios previos han demostrado que el aumento en los niveles de la vía de Tor producía defectos en la función sináptica, la guía axonal y en la arborización de las dendritas (Tavazoie *et al.*, 2005; Swiech *et al.*, 2008). La causa podría deberse a la desregulación de la síntesis de proteínas controlada por Tor ya que se ha sugerido

que este proceso es importante para dirigir el crecimiento del axón (Campbell and Holt, 2001). Algunas de estas proteínas reguladas por Tor están implicadas en la modificación del citoesqueleto y microtúbulos, estando íntimamente ligadas a la elongación del cono de crecimiento (Dent and Gertler, 2003; Piper *et al.*, 2006). Además, otras proteínas reguladas por la vía de Tor son las reguladas por rapamicina, siendo importantes para el crecimiento de las neuritas y del axón (Kinnunen *et al.*, 1998; Tursun *et al.*, 2005). Por lo tanto, la función de Thor podría ser relevante para la correcta regulación de proteínas requeridas para la elongación del axón del R8 hasta su capa final apropiada.

El hecho de que *Thor* también muestre un mecanismo protector frente a la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas (Tain *et al.*, 2009), pone de manifiesto una posible función dual de este gen. En condiciones estándar, en las que el funcionamiento de las neuronas es estable, Thor regularía la traducción de proteínas encargadas en la selección de capa del R8. En cambio, si el funcionamiento neuronal estuviese alterado debido a la disfunción de otros genes, como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, Thor mostraría una función protectora aminorando la pérdida de las neuronas.

Aunque las herramientas bioinformáticas no predijeron sitios de unión para Sens, se realizó un experimento para identificar una redundancia con genes regulados por Sens. El resultado no mostró dicha interacción, por lo que Thor realizaría su función de forma independiente a Sens y su implicación en el proceso sería parcial, debido a que su fenotipo en R8 con una línea mutante nula fue leve. Por otra parte, sería necesario confirmar, mediante *ChIP*, la presencia de los sitios de unión para Sens. Otro dato interesante fue que, *Thor* poseía sitios putativos de unión para Pros, sugiriendo que este gen podría estar reprimido en R7s en el momento previo de que R7 y R8s comenzaran a extenderse hacia su capa final. Esta represión podría estar relacionada con la inactivación del programa de R8 en R7 a través de Pros y NF-YC ya que ambos reprimen la expresión de Sens en R7, evitando que estos reconozcan como su capa final la capa receptora del R8 (Kauffmann *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008; Morey *et al.*, 2008). Experimentos de sobreexpresión de *Thor* en R7 y la comprobación de los sitios de unión para Pros, demostrarían esta hipótesis, confirmando así, que la represión de este gen en R7 sería necesaria para el proceso de selección de capa.







## **Conclusiones**



1. Ken, uno de los factores de transcripción enriquecido en R8 a 40h DFP, regularía a los genes enriquecidos en R8 que no estuvieran regulados por Sens y/o Pros, según la plataforma *i-cis Target*. Sin embargo, los estudios de pérdida de función realizados demostrarían que no estaría implicado en la selección de capa de R8. No obstante, Ken podría tener una función en la regulación de Sens, mediando la expresión de las opsinas en R8 debido a que su pérdida de función produce una disminución de la expresión de la opsina Rh6.
2. El sistema *STaR GMR-Gal4* empleado en el *screen* de los genes enriquecidos en R8 durante todo el proceso de la selección de capa, del grupo R8 y del grupo específico de R8 produce resultados falsos positivos y un fondo fenotípico mayor que el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.
3. El sistema *Rh6 GMR-Gal4* constituye un método adecuado en la realización del *screen* genético mediante RNAi. La cuantificación fenotípica es más precisa ya que se calcula como un porcentaje de R8s con fenotipo y el fondo fenotípico es leve.
4. El *screen* genético mediante RNAi de 175 genes enriquecidos en R8 ha identificado a 43 genes candidatos para tener una función en la selección de capa de R8.
5. La validación del fenotipo observado mediante RNAi, se ha realizado de 16 genes candidatos. En 5 de ellos se ha conseguido validar su fenotipo en R8: *GstE11*, *esn*, *Thor*, *Cyp31a1* y *CG14397*.
6. *GstE11* tendría una función específica en la selección de capa de R8, la cual sería independiente a su papel protector frente al estrés oxidativo.
7. *Esn* desempeña una función en la selección de capa de R8. La interacción genética entre *Esn* y *Fmi* sugieren que ambos colaboren en el proceso de la guía axonal de R8 a su capa final. Debido a que *Fmi* y *Gogo* funcionan juntos en este proceso, *Esn* podría estar colaborando con ambos mediante su interacción con *Fmi* en el cono de crecimiento de R8.



## **Bibliografía**



- Abrell, Sarah, and Herbert Jäckle. 2001. "Axon Guidance of *Drosophila* SNb Motoneurons Depends on the Cooperative Action of Muscular Krüppel and Neuronal Capricious Activities." *Mechanisms of Development* 109 (1): 3–12. doi:10.1016/S0925-4773(01)00511-1.
- Adams, M D, S E Celniker, R A Holt, C A Evans, J D Gocayne, P G Amanatides, S E Scherer, et al. 2000. "The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*." *Science (New York, N.Y.)* 287 (5461): 2185–95.
- Akin, Orkun, and S. Lawrence Zipursky. 2016. "Frazzled Promotes Growth Cone Attachment at the Source of a Netrin Gradient in the *Drosophila* Visual System." *eLife* 5 (OCTOBER2016): 1–28. doi:10.7554/eLife.20762.001.
- Allen, M. J., J. A. Drummond, D. J. Sweetman, and K. G. Moffat. 2007. "Analysis of Two P-Element Enhancer-Trap Insertion Lines That Show Expression in the Giant Fibre Neuron of *Drosophila Melanogaster*." *Genes, Brain and Behavior* 6: 347–58. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00263.x.
- Armstrong, Richard N. 1997. "Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases." *Chemical Research in Toxicology* 10 (1): 2–18. doi:10.1021/tx960072x.
- Astigarraga, Sergio, Kerstin Hofmeyer, Reza Farajian, and Jessica E Treisman. 2010. "Three *Drosophila* Liprins Interact to Control Synapse Formation." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (46): 15358–68. doi:10.1523/JNEUROSCI.1862-10.2010.
- Baker, Nicholas E., Sung Yu, and Doreen Han. 1996. "Evolution of Proneural Atonal Expression during Distinct Regulatory Phases in the Developing *Drosophila* Eye." *Current Biology* 6 (10): 1290–1302. doi:10.1016/S0960-9822(02)70715-X.
- Beall, C, C Fyrberg, S Song, and E Fyrberg. 1992. "Isolation of a *Drosophila* Gene Encoding Glutathione S-Transferase." *Biochemical Genetics* 30 (9–10): 515–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1445191>.
- Behnia, Rudy, and Claude Desplan. 2015. "Visual Circuits in Flies: Beginning to See the Whole Picture." *Current Opinion in Neurobiology* 34: 125–32. doi:10.1016/j.conb.2015.03.010.
- Bejarano, Fernando, Carlos M. Luque, Héctor Herranz, Georgina Sorrosal, Neus Rafel, Thu Thuy Pham, and Marco Milán. 2008. "A Gain-of-Function Suppressor Screen for Genes Involved in Dorsal-Ventral Boundary Formation in the *Drosophila* Wing." *Genetics* 178 (1): 307–23. doi:10.1534/genetics.107.081869.
- Berger-Müller, Sandra, Atsushi Sugie, Fumio Takahashi, Gaia Tavosanis, Satoko Hakeda-Suzuki, and Takashi Suzuki. 2013. "Assessing the Role of Cell-Surface Molecules in Central Synaptogenesis in the *Drosophila* Visual System." *PLoS ONE* 8 (12): 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0083732.
- Berger-Müller, Sandra, Atsushi Sugie, Fumio Takahashi, Gaia Tavosanis, Satoko Hakeda-Suzuki, and Takashi Suzuki. 2013. "Assessing the Role of Cell-Surface Molecules in Central Synaptogenesis in the *Drosophila* Visual System." *PLoS ONE* 8 (12).



## Bibliografia

- Berger, Jürg, Kirsten André Senti, Gabriele Senti, Timothy P. Newsome, Bengt Åsling, Barry J. Dickson, and Takashi Suzuki. 2008. "Systematic Identification of Genes That Regulate Neuronal Wiring in the *Drosophila* Visual System." *PLoS Genetics* 4 (5). doi:10.1371/journal.pgen.1000085.
- Borst, A., and J. Haag. 2002. "Neural Networks in the Cockpit of the Fly." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 188 (6): 419–37. doi:10.1007/s00359-002-0316-8.
- Bosher, Julia M., Pascale Dufourcq, Satis Sookhareea, and Michel Labouesse. 1999. "RNA Interference Can Target Pre-mRNA: Consequences for Gene Expression in a *Caenorhabditis Elegans* Operon." *Genetics* 153 (3): 1245–56.
- Braitenberg, V. 1967. "Patterns of Projection in the Visual System of the Fly. I. Retina-Lamina Projections." *Experimental Brain Research* 3 (3): 271–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6030825>.
- Brand, A H, and N Perrimon. 1993. "Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes." *Development (Cambridge, England)* 118 (2): 401–15. doi:10.1101/lm.1331809.
- Butcher, Nancy J, Anja B Friedrich, Zhiyuan Lu, Hiromu Tanimoto, and Ian A Meinertzhagen. 2012. "Different Classes of Input and Output Neurons Reveal New Features in Microglomeruli of the Adult *Drosophila* Mushroom Body Calyx." *Journal of Comparative Neurology* 520 (10): 2185–2201. doi:10.1002/cne.23037.
- Butzlaff, Malte, Shabab B. Hannan, Peter Karsten, Sarah Lenz, Josephine Ng, Hannes Voßfeldt, Katja Prüßing, et al. 2015. "Impaired Retrograde Transport by the Dynein/Dynactin Complex Contributes to Tau-Induced Toxicity." *Human Molecular Genetics* 24 (13): 3623–37. doi:10.1093/hmg/ddv107.
- Cajal, SR. 1893. "La Retine Des Vertebres." *La Cellule* 9: 17–25.
- Cajal, SR, and D Sanchez. 1915. "Contribucion Al Conocimiento de Los Centros Nerviosos Del Los Insectos." *Trab. Lab. Invest. Biol* 13: 1–167.
- Campbell, Douglas S., and Christine E. Holt. 2001. "Chemotropic Responses of Retinal Growth Cones Mediated by Rapid Local Protein Synthesis and Degradation." *Neuron* 32 (6): 1013–26. doi:10.1016/S0896-6273(01)00551-7.
- Cang, Jianhua, and David A. Feldheim. 2013. "Developmental Mechanisms of Topographic Map Formation and Alignment." *Annual Review of Neuroscience* 36 (1): 51–77. doi:10.1146/annurev-neuro-062012-170341.
- Carrillo, Robert A., Engin ??zkan, Kaushiki P. Menon, Sonal Nagarkar-Jaiswal, Pei Tseng Lee, Mili Jeon, Michael E. Birnbaum, Hugo J. Bellen, K. Christopher Garcia, and Kai Zinn. 2015. "Control of Synaptic Connectivity by a Network of *Drosophila* IgSF Cell Surface Proteins." *Cell* 163 (7): 1770–82. doi:10.1016/j.cell.2015.11.022.
- Castrillon, D. H., P. Gonczy, S. Alexander, R. Rawson, C. G. Eberhart, S. Viswanathan, S. DiNardo, and S. A. Wasserman. 1993. "Toward a Molecular Genetic Analysis of Spermatogenesis in

- Drosophila Melanogaster*: Characterization of Male-Sterile Mutants Generated by Single P Element Mutagenesis." *Genetics* 135 (2): 489–505. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.069.
- Chapman, Elisabeth J, and James C Carrington. 2007. "Specialization and Evolution of Endogenous Small RNA Pathways." *Nature Reviews. Genetics* 8 (11): 884–96. doi:10.1038/nrg2179.
- Chédotal, Alain, and Linda J. Richards. 2010. "Wiring the Brain: The Biology of Neuronal Guidance." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (6): 1–18. doi:10.1101/cshperspect.a001917.
- Chen, Pei Ling, and Thomas R. Clandinin. 2008. "The Cadherin Flamingo Mediates Level-Dependent Interactions That Guide Photoreceptor Target Choice in *Drosophila*." *Neuron* 58 (1): 26–33. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.007.
- Chen, Yi, Orkun Akin, Aljoscha Nern, C Y Kimberly Tsui, Matthew Y Pecot, and S Lawrence Zipursky. 2014. "Cell-Type-Specific Labeling of Synapses in Vivo through Synaptic Tagging with Recombination." *Neuron* 81 (2). Elsevier Inc.: 280–93. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.021.
- Chiang, Ann Shyn, Chih Yung Lin, Chao Chun Chuang, Hsiu Ming Chang, Chang Huain Hsieh, Chang Wei Yeh, Chi Tin Shih, et al. 2011. "Three-Dimensional Reconstruction of Brain-Wide Wiring Networks in *Drosophila* at Single-Cell Resolution." *Current Biology* 21 (1). Elsevier Ltd: 1–11. doi:10.1016/j.cub.2010.11.056.
- Chotard, Carole, Wendy Leung, and Iris Salecker. 2005. "Glial Cells Missing and *gcm2* Cell Autonomously Regulate Both Glial and Neuronal Development in the Visual System of *Drosophila*." *Neuron* 48 (2): 237–51. doi:10.1016/j.neuron.2005.09.019.
- Chou, W H, a Huber, J Bentreop, S Schulz, K Schwab, L V Chadwell, R Paulsen, and S G Britt. 1999. "Patterning of the R7 and R8 Photoreceptor Cells of *Drosophila*: Evidence for Induced and Default Cell-Fate Specification." *Development (Cambridge, England)* 126 (4): 607–16.
- Chung, Henry, Tamar Sztal, Shivani Pasricha, Mohan Sridhar, Philip Batterham, and Phillip J Daborn. 2009. "Characterization of *Drosophila Melanogaster* Cytochrome P450 Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14): 5731–36. doi:10.1073/pnas.0812141106.
- Clandinin, T R, and S L Zipursky. 2000. "Afferent Growth Cone Interactions Control Synaptic Specificity in the *Drosophila* Visual System." *Neuron* 28 (2): 427–36. doi:10.1016/S0896-6273(00)00122-7.
- Clandinin, Thomas R., Chi Hon Lee, Tory Herman, Roger C. Lee, Annie Y. Yang, Shake Ovasapyan, and S. Lawrence Zipursky. 2001. "*Drosophila* LAR Regulates R1-R6 and R7 Target Specificity in the Visual System." *Neuron* 32 (2): 237–48. doi:10.1016/S0896-6273(01)00474-3.
- Clandinin, Thomas R, and S Lawrence Zipursky. 2002. "Review Making Connections in the Fly Visual System Nals; Indeed, They Appear to Execute a Series of Simple Choices Defining Their Trajectory toward Their Targets (Re- Viewed in Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Flana." *Neuron* 35: 827–41. [http://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273\(02\)00876-0.pdf](http://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273(02)00876-0.pdf).

- Clark, A. G. 1990. "The Glutathione S-transferase and Resistance to Insecticide. In "Glutathione S-Transferases and Drug Resistance." (J. D. Hayes, C. B. Pickett, and T. J. Mantle, Eds.)tle." *Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia*, 369–378.
- Cook, R Kimberley, Stacey J Christensen, Jennifer A Deal, Rachel A Coburn, Megan E Deal, Jill M Gresens, Thomas C Kaufman, and Kevin R Cook. 2012. "The Generation of Chromosomal Deletions to Provide Extensive Coverage and Subdivision of the *Drosophila Melanogaster* Genome." *Genome Biology* 13 (3): R21. doi:10.1186/gb-2012-13-3-r21.
- Curtiss, J, and M Mlodzik. 2000. "Morphogenetic Furrow Initiation and Progression during Eye Development in *Drosophila*: The Roles of Decapentaplegic, Hedgehog and Eyes Absent." *Development* 127 (6): 1325–36.
- Dawid, Igor B., Joseph J. Breen, and Reiko Toyama. 1998. "LIM Domains: Multiple Roles as Adapters and Functional Modifiers in Protein Interactions." *Trends in Genetics* 14 (4): 156–62. doi:10.1016/S0168-9525(98)01424-3.
- Dejongs, Jeff L, Ralf Morgensternq, Hans Jornvallv, J W Depierreq, and Chen-pei D Tu. 1988. "Gene Expression of Rat and Human ~ I ~ R O S O M a L ~ L U T a T ~ I O N E S-Transferases\*," 8430–36.
- Dent, E W, and F B Gertler. 2003. "Cytoskeletal Dynamics and Review Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance." *Neuron* 40 (2): 209–27. doi:10.1016/S0896-6273(03)00633-0.
- Dhordain, Philippe, Richard J. Lin, Sabine Quief, Danièle Lantoine, Jean Pierre Kerckaert, Ronald M. Evans, and Olivier Albagli. 1998. "The LAZ3(BCL-6) Oncoprotein Recruits a SMRT/mSIN3A/histone Deacetylase Containing Complex to Mediate Transcriptional Repression." *Nucleic Acids Research* 26 (20): 4645–51. doi:10.1093/nar/26.20.4645.
- Dimitroff, Brian, Katie Howe, Adrienne Watson, Bridget Champion, Hyun-Gwan Lee, Na Zhao, Michael B. O'Connor, Thomas P. Neufeld, and Scott B. Selleck. 2012. "Diet and Energy-Sensing Inputs Affect TorC1-Mediated Axon Misrouting but Not TorC2-Directed Synapse Growth in a *Drosophila* Model of Tuberous Sclerosis." Edited by Edward Giniger. *PLoS ONE* 7 (2): e30722. doi:10.1371/journal.pone.0030722.
- Domínguez, María, and Ernst Hafen. 1997. "Hedgehog Directly Controls Initiation and Propagation of Retinal Differentiation in the *Drosophila* Eye." *Genes and Development* 11 (23): 3254–64. doi:10.1101/gad.11.23.3254.
- Douglass, John K., and Nicholas J. Strausfeld. 2003. "Anatomical Organization of Retinotopic Motion-Sensitive Pathways in the Optic Lobes of Flies." *Microscopy Research and Technique* 62 (2): 132–50. doi:10.1002/jemt.10367.
- Doumanis, Joanna, Koji Wada, Yoshihiro Kino, Adrian W. Moore, and Nobuyuki Nukina. 2009. "RNAi Screening in *Drosophila* Cells Identifies New Modifiers of Mutant Huntingtin Aggregation." *PLoS ONE* 4 (9). doi:10.1371/journal.pone.0007275.
- Echeverri, Christophe J., and Norbert Perrimon. 2006. "High-Throughput RNAi Screening in Cultured Cells: A User's Guide." *Nature Reviews Genetics* 7 (5): 373–84. doi:10.1038/nrg1836.

- Enayati, A. A., H. Ranson, and J. Hemingway. 2005. "Insect Glutathione Transferases and Insecticide Resistance." *Insect Molecular Biology* 14 (1): 3–8. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.
- Enya, Sora, Tomotsune Ameku, Fumihiko Igarashi, Masatoshi Iga, Hiroshi Kataoka, Tetsuro Shinoda, and Ryusuke Niwa. 2014. "A Halloween Gene Noppera-Bo Encodes a Glutathione S-Transferase Essential for Ecdysteroid Biosynthesis via Regulating the Behaviour of Cholesterol in *Drosophila*." *Scientific Reports* 4: 6586. doi:10.1038/srep06586.
- Eyles, Joanne L, and Douglas J Hilton. 2003. "Negative Regulation of the JAK / STAT Signaling Pathway," 47–52.
- Fan, Yun, Matthias Soller, Susanne Flister, Martin Hollmann, Martin Müller, Bruno Bello, Boris Egger, Kalpana White, Mireille A. Schäfer, and Heinrich Reichert. 2005. "The Egghead Gene Is Required for Compartmentalization in *Drosophila* Optic Lobe Development." *Developmental Biology* 287 (1): 61–73. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.031.
- Feoktistov, Alexander I., and Tory G. Herman. 2016. "Wallenda/DLK Protein Levels Are Temporally Downregulated by Tramtrack69 to Allow R7 Growth Cones to Become Stationary Boutons." *Development* 143 (16): 2983–93. doi:10.1242/dev.134403.
- Ferguson, Kerry, Hong Long, Scott Cameron, Wen-Tzu Chang, and Yong Rao. 2009. "The Conserved Ig Superfamily Member Turtle Mediates Axonal Tiling in *Drosophila*." *The Journal of Neuroscience* 29 (45): 14151–59. doi:10.1523/JNEUROSCI.2497-09.2009.
- Fire, A, S Xu, M K Montgomery, S A Kostas, S E Driver, and C C Mello. 1998. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 391 (6669): 806–11. doi:10.1038/35888.
- Fischbach, K. F., and A. P M Dittrich. 1989. "The Optic Lobe of *Drosophila Melanogaster*. I. A Golgi Analysis of Wild-Type Structure." *Cell and Tissue Research* 258 (3): 441–75. doi:10.1007/BF00218858.
- Fouquet, Wernher, David Oswald, Carolin Wichmann, Sara Mertel, Harald Depner, Marcus Dyba, Stefan Hallermann, Robert J. Kittel, Stefan Eimer, and Stephan J. Sigrist. 2009. "Maturation of Active Zone Assembly by *Drosophila* Bruchpilot." *The Journal of Cell Biology* 186 (1): 129–45. doi:10.1083/jcb.200812150.
- Frankfort, Benjamin J., Riitta Nolo, Zhihuan Zhang, Hugo Bellen, and Graeme Mardon. 2001. "Senseless Repression of Rough Is Required for R8 Photoreceptor Differentiation in the Developing *Drosophila* Eye." *Neuron* 32 (3): 403–14. doi:10.1016/S0896-6273(01)00480-9.
- Freeman, M. 1997. "Cell Determination Strategies in the *Drosophila* Eye." *Development (Cambridge, England)* 124 (2): 261–70. doi:10.1006/rwgn.2001.0170.
- Freeman, Matthew. 1996. "Reiterative Use of the EGF Receptor Triggers Differentiation of All Cell Types in the *Drosophila* Eye." *Cell* 87 (4): 651–60. doi:10.1016/S0092-8674(00)81385-9.
- Gao, Fen-Biao, Minoree Kohwi, Jay E. Brenman, Lily Yeh Jan, and Yuh Nung Jan. 2000. "Control of Dendritic Field Formation in *Drosophila*: The Roles of Flamingo and Competition

- between Homologous Neurons." *Neuron* 28 (1): 91–101. doi:10.1016/S0896-6273(00)00088-X.
- Gasque, Gabriel, Stephen Conway, Juan Huang, Yi Rao, and Leslie B. Vosshall. 2013. "Small Molecule Drug Screening in *Drosophila* Identifies the 5HT2A Receptor as a Feeding Modulation Target." *Scientific Reports* 3: 1–8. doi:10.1038/srep02120.
- Ghosh, Aniket, Tina Kling, Nicolas Snaidero, Julio L. Sampaio, Andrej Shevchenko, Heribert Gras, Bart Geurten, et al. 2013. "A Global In Vivo *Drosophila* RNAi Screen Identifies a Key Role of Ceramide Phosphoethanolamine for Glial Ensheathment of Axons." *PLoS Genetics* 9 (12). doi:10.1371/journal.pgen.1003980.
- Gilbert, Lawrence I. 2004. "Halloween Genes Encode P450 Enzymes That Mediate Steroid Hormone Biosynthesis in *Drosophila Melanogaster*." *Molecular and Cellular Endocrinology* 215 (1–2): 1–10. doi:10.1016/j.mce.2003.11.003.
- Glatter, Timo, Ralf B Schittenhelm, Oliver Rinner, Katarzyna Roguska, Alexander Wepf, Martin A Jünger, Katja Köhler, et al. 2011. "Modularity and Hormone Sensitivity of the *Drosophila Melanogaster* Insulin Receptor/target of Rapamycin Interaction Proteome." *Molecular Systems Biology* 7 (1): 547. doi:10.1038/msb.2011.79.
- Goedert, M., C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker, and A. Klug. 1988. "Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding a Core Protein of the Paired Helical Filament of Alzheimer Disease: Identification as the Microtubule-Associated Protein Tau." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (11): 4051–55. doi:10.1073/pnas.85.11.4051.
- Golic, K G, and S Lindquist. 1989. "The FLP Recombinase of Yeast Catalyzes Site-Specific Recombination in the *Drosophila* Genome." *Cell* 59 (3): 499–509. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509077>.
- Gubb, D., Green, C., Coulson, D., Roote, J., Huen, D., Tree, D. 2000. "The Prickle and Espinas Cognate Genes Each Encode Multiple Protein Isoforms Which Are Critical for Planar Polarity Signalling." *A. Dros. Res. Conf.* 41 : 1.
- Gubb, David, Clare Green, David Huen, Darin Coulson, Glynnis Johnson, David Tree, Simon Collier, and John Roote. 1999. "The Balance between Isoforms of the Prickle LIM Domain Protein Is Critical for Planar Polarity in *Drosophila* Imaginal Discs." *Genes and Development* 13 (17): 2315–27. doi:10.1101/gad.13.17.2315.
- Hadjieconomou, Dafni, Katarina Timofeev, and Iris Salecker. 2011. "A Step-by-Step Guide to Visual Circuit Assembly in *Drosophila*." *Current Opinion in Neurobiology* 21 (1). Elsevier Ltd: 76–84. doi:10.1016/j.conb.2010.07.012.
- Hakeda-Suzuki, Satoko, Sandra Berger-Müller, Tatiana Tomasi, Tadao Usui, Shin-Ya Horiuchi, Tadashi Uemura, and Takashi Suzuki. 2011. "Golden Goal Collaborates with Flamingo in Conferring Synaptic-Layer Specificity in the Visual System." *Nature Neuroscience* 14 (3). Nature Publishing Group: 314–23. doi:10.1038/nn.2756.
- Hakeda, Satoko, and Takashi Suzuki. 2013. "Golden Goal Controls Dendrite Elongation and Branching of Multidendritic Arborization Neurons in *Drosophila*." *Genes to Cells* 18 (11): 960–73. doi:10.1111/gtc.12089.

- Hamanaka, Yoshitaka, and Ian A. Meinertzhagen. 2010. "Immunocytochemical Localization of Synaptic Proteins to Photoreceptor Synapses of *Drosophila Melanogaster*." *Journal of Comparative Neurology* 518 (7): 1133–55. doi:10.1002/cne.22268.
- Harada, T.; Harada, Parada, Luis F. 2007. "Molecular Regulation of Visual System Development : More than Meets the Eye." *Genes & Development* 21 (4): 367–78. doi:10.1101/gad.1504307.toderm.
- Hay, B A, R Maile, and G M Rubin. 1997. "P Element Insertion-Dependent Gene Activation in the *Drosophila* Eye." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (10): 5195–5200. doi:10.1073/pnas.94.10.5195.
- Hay, Nissim, and Nahum Sonenberg. 2004. "Upstream and Downstream of mTOR." *Genes & Development* 18 (16): 1926–45. doi:10.1101/gad.1212704.
- Hayes, John D., and David J. Pulford. 1995. "The Glut Athione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Lsoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30 (6): 445–520. doi:10.3109/10409239509083491.
- Hein, Irina, Takashi Suzuki, and Ilona C. Grunwald Kadow. 2013. "Gogo Receptor Contributes to Retinotopic Map Formation and Prevents R1-6 Photoreceptor Axon Bundling." *PLoS ONE* 8 (6): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0066868.
- Heitman, J., N. Movva, and M. Hall. 1991. "Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast." *Science* 253 (5022): 905–9. doi:10.1126/science.1715094.
- Hoef, Diana L van de, Julia M Bonner, and Gabrielle L Boulianne. 2013. "FKBP14 Is an Essential Gene That Regulates Presenilin Protein Levels and Notch Signaling in *Drosophila*." *Development (Cambridge, England)* 140 (4): 810–19. doi:10.1242/dev.081356.
- Hofbauer, Alois, and Jos?? A. Campos-Ortega. 1990. "Proliferation Pattern and Early Differentiation of the Optic Lobes in *Drosophila Melanogaster*." *Roux's Archives of Developmental Biology* 198 (5): 264–74. doi:10.1007/BF00377393.
- Hofmeyer, Kerstin, Corinne Maurel-Zaffran, Helen Sink, and Jessica E Treisman. 2006. "Liprin-Alpha Has LAR-Independent Functions in R7 Photoreceptor Axon Targeting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (31): 11595–600. doi:10.1073/pnas.0604766103.
- Hofmeyer, Kerstin, and Jessica E Treisman. 2009. "The Receptor Protein Tyrosine Phosphatase LAR Promotes R7 Photoreceptor Axon Targeting by a Phosphatase-Independent Signaling Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (46): 19399–404. doi:10.1073/pnas.0903961106.
- Hong, Weizhe, Timothy J. Mosca, and Liqun Luo. 2012. "Teneurins Instruct Synaptic Partner Matching in an Olfactory Map." *Nature* 484 (7393). Nature Publishing Group: 201–7. doi:10.1038/nature10926.
- Hsiung, Frank, and Kevin Moses. 2002. "Retinal Development in *Drosophila*: Specifying the First



- Neuron." *Human Molecular Genetics* 11 (10): 1207–14. doi:10.1093/hmg/11.10.1207.
- Huang, X., J. T. Warren, J. Buchanan, L. I. Gilbert, and M. P. Scott. 2007. "Drosophila Niemann-Pick Type C-2 Genes Control Sterol Homeostasis and Steroid Biosynthesis: A Model of Human Neurodegenerative Disease." *Development* 134 (20): 3733–42. doi:10.1242/dev.004572.
- Huang, Z, S Kunes, J. Alcedo, M. Ayzenzon, T. Von Ohlen, M. Noll, J. E. Hooper, et al. 1998. "Signals Transmitted along Retinal Axons in Drosophila: Hedgehog Signal Reception and the Cell Circuitry of Lamina Cartridge Assembly." *Development (Cambridge, England)* 125 (19): 3753–64. doi:10.1016/s0092-8674(00)80094-x.
- Huang, Zhen, and Samuel Kunes. 1996. "Hedgehog, Transmitted along Retinal Axons, Triggers Neurogenesis in the Developing Visual Centers of the Drosophila Brain." *Cell* 86 (3): 411–22. doi:10.1016/S0092-8674(00)80114-2.
- Huber, Armin, Simone Schulz, Joachim Bontrop, Christine Groell, Uwe Wolfrum, and Reinhard Paulsen. 1997. "Molecular Cloning of Drosophila Rh6 Rhodopsin: The Visual Pigment of a Subset of R8 Photoreceptor Cells." *FEBS Letters* 406 (1–2). Federation of European Biochemical Societies: 6–10. doi:10.1016/S0014-5793(97)00210-X.
- Huberman, Andrew D., Thomas R. Clandinin, and Herwig Baier. 2010. "Molecular and Cellular Mechanisms of Lamina-Specific Axon Targeting." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3): 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a001743.
- Huynh, K D, and V J Bardwell. 1998. "The BCL-6 POZ Domain and Other POZ Domains Interact with the Co-Repressors N-CoR and SMRT." *Oncogene* 17 (19): 2473–84. doi:10.1038/sj.onc.1202197.
- Hynes, Richard O, and Qi Zhao. 2000. "Analysis The Evolution of Cell Adhesion 7." *Cell* 150 (2): 89–95. doi:10.1086/279520.
- Inoki, Ken, Michael N Corradetti, and Kun-Liang Guan. 2005. "Dysregulation of the TSC-mTOR Pathway in Human Disease." *Nature Genetics* 37 (1): 19–24. doi:10.1038/ng1494.
- Issigonis, Melanie, and Erika Matunis. 2012. "The Drosophila BCL6 Homolog Ken and Barbie Promotes Somatic Stem Cell Self-Renewal in the Testis Niche." *Developmental Biology* 368: 181–92. doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.034.
- Ivanov, Andrej I, Alessandra C Rovescalli, Paola Pozzi, Siuk Yoo, Brian Mozer, Hsi-Ping Li, Shu-Hua Yu, et al. 2004. "Genes Required for Drosophila Nervous System Development Identified by RNA Interference." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (46): 16216–21. doi:10.1073/pnas.0407188101.
- Jackson, Aimee L, Julja Burchard, Janell Schelter, B Nelson Chau, Michele Cleary, Lee Lim, and Peter S Linsley. 2006. "Widespread siRNA off-Target" Transcript Silencing Mediated by Seed Region Sequence Complementarity." *Rna* 12 (7): 1179–87. doi:10.1261/rna.25706.
- Jakobsson, Per-Johan, Ralf Morgenstern, Joseph Mancini, Anthony Ford-Hutchinson, and Bengt Persson. 1999. "Common Structural Features of MAPEG - A Widespread Superfamily of Membrane Associated Proteins with Highly Divergent Functions in Eicosanoid and

- Glutathione Metabolism." *Protein Science* 8 (3): 689–92. doi:10.1110/ps.8.3.689.
- Jarman, A. P., E. H. Grell, L. Ackerman, L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 1994. "Atonal Is the Proneural Gene for Drosophila Photoreceptors." *Nature* 369: 398–400. doi:10.1038/369398a0.
- Jarman, Andrew P., Yan Sun, L. Y. Jan, and Yuh Nung Jan. 1995. "Role of the Proneural Gene, Atonal, in Formation of Drosophila Chordotonal Organs and Photoreceptors." *Development* 121 (7): 2019–30. doi:10.1016/0168-9525(91)90220-k.
- Jenett, Arnim, Gerald M. Rubin, Teri T B Ngo, David Shepherd, Christine Murphy, Heather Dionne, Barret D. Pfeiffer, et al. 2012. "A GAL4-Driver Line Resource for Drosophila Neurobiology." *Cell Reports* 2 (4). The Authors: 991–1001. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.011.
- Jennings, Barbara H. 2011. "Drosophila-a Versatile Model in Biology & Medicine." *Materials Today* 14 (5). Elsevier Ltd: 190–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70113-4.
- Johnston, Robert J., Yoshiaki Otake, Pranidhi Sood, Nina Vogt, Rudy Behnia, Daniel Vasilias, Elizabeth McDonald, et al. 2011. "Interlocked Feedforward Loops Control Cell-Type-Specific Rhodopsin Expression in the Drosophila Eye." *Cell* 145 (6). Elsevier Inc.: 956–68. doi:10.1016/j.cell.2011.05.003.
- Karres, Janina S., Valérie Hilgers, Ines Carrera, Jessica Treisman, and Stephen M. Cohen. 2007. "The Conserved microRNA MiR-8 Tunes Atrophin Levels to Prevent Neurodegeneration in Drosophila." *Cell* 131 (1): 136–45. doi:10.1016/j.cell.2007.09.020.
- Katz, L. C., and C. J. Shatz. 1996. "Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits." *Science* 274 (5290): 1133–38. doi:10.1126/science.274.5290.1133.
- Kauffmann, Rachele C, Songhui Li, Paulette A Gallagher, Jianjun Zhang, and W C Richard. 1999. "Competence in the R7 Cell of Drosophila," 2167–78.
- Kazemi-Esfarjani, P, and S Benzer. 2000. "Genetic Suppression of Polyglutamine Toxicity in Drosophila." *Science (New York, N.Y.)* 287 (5459): 1837–40. doi:10.1126/science.287.5459.1837.
- Kim, Kiyoung, Song Hee Kim, Jaekwang Kim, Heuijong Kim, and Jeongbin Yim. 2012. "Glutathione S-Transferase Omega 1 Activity Is Sufficient to Suppress Neurodegeneration in a Drosophila Model of Parkinson Disease." *Journal of Biological Chemistry* 287 (9): 6628–41. doi:10.1074/jbc.M111.291179.
- Kim, Kiyoung, and Jeongbin Yim. 2013. "Glutathione S-Transferase Omega Suppresses the Defective Phenotypes Caused by PINK1 Loss-of-Function in Drosophila." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 437 (4). Elsevier Inc.: 615–19. doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.011.
- Kinnunen, T., M. Kaksonen, J. Saarinen, N. Kalkkinen, H. B. Peng, and H. Rauvala. 1998. "Cortactin-Src Kinase Signaling Pathway Is Involved in N-Syndecan-Dependent Neurite Outgrowth." *Journal of Biological Chemistry* 273 (17): 10702–8. doi:10.1074/jbc.273.17.10702.



- Kirschfeld, K. 1967. "[The Projection of the Optical Environment on the Screen of the Rhabdomere in the Compound Eye of the Musca]." *Experimental Brain Research* 3 (3): 248–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6067693>.
- Kittel, Robert J, Carolin Wichmann, Tobias M Rasse, Wernher Fouquet, Manuela Schmidt, Andreas Schmid, Dhananjay A Wagh, et al. 2006. "Bruchpilot Promotes Active Zone Assembly, Ca<sup>2+</sup> Channel Clustering, and Vesicle Release." *Science (New York, N.Y.)* 312 (5776): 1051–54. doi:10.1126/science.1126308.
- Kniss, J. S., S. Holbrook, and T. G. Herman. 2013. "R7 Photoreceptor Axon Growth Is Temporally Controlled by the Transcription Factor Ttk69, Which Inhibits Growth in Part by Promoting Transforming Growth Factor- $\beta$ /Activin Signaling." *Journal of Neuroscience* 33 (4): 1509–20. doi:10.1523/JNEUROSCI.2023-12.2013.
- Koike-Kumagai, Makiko, Kei-ichiro Yasunaga, Rei Morikawa, Takahiro Kanamori, and Kazuo Emoto. 2009. "The Target of Rapamycin Complex 2 Controls Dendritic Tiling of Drosophila Sensory Neurons through the Tricornered Kinase Signalling Pathway." *The EMBO Journal* 28 (24). Nature Publishing Group: 3879–92. doi:10.1038/emboj.2009.312.
- Koizumi, Keita, Haruhiro Higashida, Siuk Yoo, Mohamad Saharul Islam, Andrej I Ivanov, Vicky Guo, Paola Pozzi, et al. 2007. "RNA Interference Screen to Identify Genes Required for Drosophila Embryonic Nervous System Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (13): 5626–31. doi:10.1073/pnas.0611687104.
- Kolodkin, Alex L., and P. Robin Hiesinger. 2017. "Wiring Visual Systems: Common and Divergent Mechanisms and Principles." *Current Opinion in Neurobiology* 42. Elsevier Ltd: 128–35. doi:10.1016/j.conb.2016.12.006.
- Kolodkin, Alex L., and Marc Tessier-Lavigne. 2011. "Mechanisms and Molecules of Neuronal Wiring: A Primer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (6): 1–14. doi:10.1101/cshperspect.a001727.
- Kölzer, Stefan, Bernhard Fuss, Michael Hoch, and Thomas Klein. 2003. "Defective Proventriculus Is Required for Pattern Formation along the Proximodistal Axis, Cell Proliferation and Formation of Veins in the Drosophila Wing." *Development (Cambridge, England)* 130 (17): 4135–47. doi:10.1242/dev.00608.
- Kremer, Malte C., Christophe Jung, Sara Batelli, Gerald M. Rubin, and Ulrike Gaul. 2017. "The Glia of the Adult Drosophila Nervous System." *Glia* 65 (4): 606–38. doi:10.1002/glia.23115.
- Krishnaswamy, Arjun, Masahito Yamagata, Xin Duan, Y. Kate Hong, and Joshua R. Sanes. 2015. "Sidekick 2 Directs Formation of a Retinal Circuit That Detects Differential Motion." *Nature* 524 (7566): 466–70. doi:10.1038/nature14682.
- Kühnlein, Ronald P., Chao Kung Chen, and Reinhard Schuh. 1998. "A Transcription Unit at the Ken and Barbie Gene Locus Encodes a Novel Drosophila Zinc Finger Protein." *Mechanisms of Development* 79 (1–2): 161–64. doi:10.1016/S0925-4773(98)00183-X.
- Kulkarni, Abhishek, Deniz Ertekin, Chi Hon Lee, and Thomas Hummel. 2016. "Birth Order Dependent Growth Cone Segregation Determines Synaptic Layer Identity in the Drosophila

- Visual System." *eLife* 5 (MARCH2016): 1–22. doi:10.7554/eLife.13715.
- Kulkarni, Meghana M, Matthew Booker, Serena J Silver, Adam Friedman, Pengyu Hong, Norbert Perrimon, and Bernard Mathey-Prevot. 2006. "Evidence of off-Target Effects Associated with Long dsRNAs in *Drosophila Melanogaster* Cell-Based Assays." *Nature Methods* 3 (10): 833–38. doi:10.1038/nmeth935.
- Kumar, J P, M Tio, F Hsiung, S Akopyan, L Gabay, R Seger, B Z Shilo, and K Moses. 1998. "Dissecting the Roles of the *Drosophila* EGF Receptor in Eye Development and MAP Kinase Activation." *Development (Cambridge, England)* 125 (19): 3875–85.
- Kwon, Chang Hyuk, Bryan W. Luikart, Craig M. Powell, Jing Zhou, Sharon A. Matheny, Wei Zhang, Yanjiao Li, Suzanne J. Baker, and Luis F. Parada. 2006. "Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice." *Neuron* 50 (3): 377–88. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.023.
- Lai, Sen-Lin, and Tzumin Lee. 2006. "Genetic Mosaic with Dual Binary Transcriptional Systems in *Drosophila*." *Nature Neuroscience* 9 (5): 703–9. doi:10.1038/nn1681.
- Langen, Marion, Egemen Agi, Dylan J. Altschuler, Lani F. Wu, Steven J. Altschuler, and Peter Robin Hiesinger. 2015. "The Developmental Rules of Neural Superposition in *Drosophila*." *Cell* 162 (1). Elsevier Inc.: 120–33. doi:10.1016/j.cell.2015.05.055.
- Lawrence Zipursky, S., and Wesley B. Grueber. 2013. "The Molecular Basis of Self-Avoidance." *Annual Review of Neuroscience* 36 (1): 547–68. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150414.
- Lee, Chi Hon, Tory Herman, Thomas R. Clandinin, Roger Lee, and S. Lawrence Zipursky. 2001. "N-Cadherin Regulates Target Specificity in the *Drosophila* Visual System." *Neuron* 30 (2): 437–50. doi:10.1016/S0896-6273(01)00291-4.
- Lee, R C, T R Clandinin, C H Lee, P L Chen, I A Meinertzhagen, and S L Zipursky. 2003. "The Protocadherin Flamingo Is Required for Axon Target Selection in the *Drosophila* Visual System." *Nat Neurosci* 6 (6): 557–63. doi:10.1038/nn1063.
- Lee, So Yeon, In-Ae Lim, Ga-Un Kang, Sun-Joo Cha, Volodya Altanbyek, Hyung-Jun Kim, Seongsoo Lee, Kiyoun Kim, and Jeongbin Yim. 2015. "Protective Effect of *Drosophila* Glutathione Transferase Omega 1 against Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Toxicity." *Gene* 568 (2): 203–10. doi:10.1016/j.gene.2015.05.058.
- Lee, Tzumin, and Liqun Luo. 1999. "Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis." *Neuron* 22: 451–61. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300807011>.
- Lee, V M, B J Balin, L Otvos, and J Q Trojanowski. 1991. "A68: A Major Subunit of Paired Helical Filaments and Derivatized Forms of Normal Tau." *Science (New York, N.Y.)* 251: 675–78. doi:10.1126/science.1899488.
- Lefebvre, Julie L., Dimitar Kostadinov, Weisheng V. Chen, Tom Maniatis, and Joshua R. Sanes. 2012. "Protocadherins Mediate Dendritic Self-Avoidance in the Mammalian Nervous System." *Nature* 488 (7412). Nature Publishing Group: 517–21. doi:10.1038/nature11305.

## Bibliografia

- Li, Jinghong, Wenjun Li, Healani C. Calhoun, Fan Xia, Fen Biao Gao, and Willis X. Li. 2003. "Patterns and Functions of STAT Activation during *Drosophila* Embryogenesis." *Mechanisms of Development* 120 (12): 1455–68. doi:10.1016/j.mod.2003.09.004.
- Lin, David M., Fan Wang, Graeme Lowe, Geoffrey H. Gold, Richard Axel, John Ngai, and Lisa Brunet. 2000. "Formation of Precise Connections in the Olfactory Bulb Occurs in the Absence of Odorant-Evoked Neuronal Activity." *Neuron* 26 (1): 69–80. doi:10.1016/S0896-6273(00)81139-3.
- Lukacsovich, T, Z Asztalos, N Juni, W Awano, and D Yamamoto. 1999. "The *Drosophila* *Melanogaster* 60A Chromosomal Division Is Extremely Dense with Functional Genes: Their Sequences, Genomic Organization, and Expression." *Genomics* 57 (1): 43–56. doi:S0888-7543(99)95746-4 [pii]\n10.1006/geno.1999.5746.
- Lukacsovich, Tamas, Kazuya Yuge, Wakae Awano, Zoltan Asztalos, Shunzo Kondo, Naoto Juni, and Daisuke Yamamoto. 2003. "The Ken and Barbie Gene Encoding a Putative Transcription Factor with a BTB Domain and Three Zinc Finger Motifs Functions in Terminalia Development of *Drosophila*." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54: 77–94. doi:10.1002/arch.10105.
- Ma, Jingqun, Kaelan J Brennan, Mitch R D 'aloia, Pete E Pascuzzi, and Vikki M Weake. 2017. "Transcriptome Profiling Identifies Multiplexin as a Target of SAGA Deubiquitinase Activity in Glia Required for Precise Axon Guidance During *Drosophila* Visual Development." Accessed April 28. <http://www.g3journal.org/content/ggg/6/8/2435.full.pdf>.
- Ma, Yong, Adrian Creanga, Lawrence Lum, and Philip A Beachy. 2006. "Prevalence of off-Target Effects in *Drosophila* RNA Interference Screens." *Nature* 443 (7109): 359–63. doi:10.1038/nature05179.
- Maisak, Matthew S, Juergen Haag, Georg Ammer, Etienne Serbe, Matthias Meier, Aljoscha Leonhardt, Tabea Schilling, et al. 2013. "A Directional Tuning Map of *Drosophila* Elementary Motion Detectors." *Nature* 500 (7461). Nature Publishing Group: 212–16. doi:10.1038/nature12320.
- Mann, K., M. Wang, S.-H. Luu, S. Ohler, S. Hakeda-Suzuki, and T. Suzuki. 2012. "A Putative Tyrosine Phosphorylation Site of the Cell Surface Receptor Golden Goal Is Involved in Synaptic Layer Selection in the Visual System." *Development* 139 (4): 760–71. doi:10.1242/dev.074104.
- Mannervik, B, and U H Danielson. 1988. "Glutathione Transferases--Structure and Catalytic Activity." *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 23 (3): 283–337. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3069329>.
- Mast, Joshua D., Saurabh Prakash, Pei Ling Chen, and Thomas R. Clandinin. 2006. "The Mechanisms and Molecules That Connect Photoreceptor Axons to Their Targets in *Drosophila*." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 17 (1): 42–49. doi:10.1016/j.semcd.2005.11.004.
- Matsubara, D., S.-y. Horiuchi, K. Shimono, T. Usui, and T. Uemura. 2011. "The Seven-Pass Transmembrane Cadherin Flamingo Controls Dendritic Self-Avoidance via Its Binding to a LIM Domain Protein, Espinas, in *Drosophila* Sensory Neurons." *Genes & Development* 25

- (18): 1982–96. doi:10.1101/gad.16531611.
- Matsubara, Daisuke, Shin Ya Horiuchi, Kohei Shimono, Tadao Usui, and Tadashi Uemura. 2011. “The Seven-Pass Transmembrane Cadherin Flamingo Controls Dendritic Self-Avoidance via Its Binding to a LIM Domain Protein, Espinas, in *Drosophila* Sensory Neurons.” *Genes and Development* 25 (18): 1982–96. doi:10.1101/gad.16531611.
- Maurel-Zaffran, Corinne, Takashi Suzuki, Gabriele Gahmon, Jessica E. Treisman, and Barry J. Dickson. 2001. “Cell-Autonomous and -Nonautonomous Functions of LAR in R7 Photoreceptor Axon Targeting.” *Neuron* 32 (2): 225–35. doi:10.1016/S0896-6273(01)00471-8.
- McGuire, S. E. 2003. “Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*.” *Science* 302 (5651): 1765–68. doi:10.1126/science.1089035.
- McGuire, S E, P T Le, and R L Davis. 2001. “The Role of *Drosophila* Mushroom Body Signaling in Olfactory Memory.” *Science (New York, N.Y.)* 293 (5533): 1330–33. doi:10.1126/science.1062622.
- Meikle, L., K. Pollizzi, A. Egnor, I. Kramvis, H. Lane, M. Sahin, and D. J. Kwiatkowski. 2008. “Response of a Neuronal Model of Tuberous Sclerosis to Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors: Effects on mTORC1 and Akt Signaling Lead to Improved Survival and Function.” *Journal of Neuroscience* 28 (21): 5422–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.0955-08.2008.
- Meinertzhagen, I. A., and S. D. O’Neil. 1991. “Synaptic Organization of Columnar Elements in the Lamina of the Wild Type in *Drosophila Melanogaster*.” *Journal of Comparative Neurology* 305 (2): 232–63. doi:10.1002/cne.903050206.
- Meinertzhagen, I A. 1972. “Erroneous Projection of Retinula Axons beneath a Dislocation in the Retinal Equator of *Calliphora*.” *Brain Res* 8 (41): 39–49.
- Meinertzhagen, I A, and T E Hansen. 1993. “The Development of the Optic Lobe.” In *The Development of *Drosophila Melanogaster**, edited by M Bate and A Martinez-Arias, 1363–1491. CSHL Press.
- Meinertzhagen, I A, and K E Sorra. 2001. “Synaptic Organization in the Fly’s Optic Lamina: Few Cells, Many Synapses and Divergent Microcircuits.” *Progress in Brain Research* 131: 53–69.
- Mencarelli, Chiara, and Franck Pichaud. 2015. “Orthodenticle Is Required for the Expression of Principal Recognition Molecules That Control Axon Targeting in the *Drosophila* Retina.” *PLoS Genetics* 11 (6): e1005303. doi:10.1371/journal.pgen.1005303.
- Miller, Adam C, Heather Seymour, Christopher King, and Tory G Herman. 2008. “Loss of Seven-up from *Drosophila* R1/R6 Photoreceptors Reveals a Stochastic Fate Choice That Is Normally Biased by Notch.” *Development (Cambridge, England)* 135 (4): 707–15. doi:10.1242/dev.016386.
- Morante, Javier, and Claude Desplan. 2008. “The Color-Vision Circuit in the Medulla of *Drosophila*.” *Current Biology* 18 (8): 553–65. doi:10.1016/j.cub.2008.02.075.

## Bibliografia

- Morante, Javier, Claude Desplan, and Arzu Celik. 2007. "Generating Patterned Arrays of Photoreceptors." *Current Opinion in Genetics and Development* 17 (4): 314–19. doi:10.1016/j.gde.2007.05.003.
- Morey, Marta, Susan K Yee, Tory Herman, Aljoscha Nern, Enrique Blanco, and S Lawrence Zipursky. 2008. "Coordinate Control of Synaptic-Layer Specificity and Rhodopsins in Photoreceptor Neurons." *Nature* 456 (7223): 795–99. doi:10.1038/nature07419.
- Morris, K V, S W Chan, S E Jacobsen, and D J Looney. 2004. "Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells." *Science* 305 (5688): 1289–92. doi:10.1126/science.1101372.
- Mu, L., K. Ito, J. P. Bacon, and N. J. Strausfeld. 2012. "Optic Glomeruli and Their Inputs in Drosophila Share an Organizational Ground Pattern with the Antennal Lobes." *Journal of Neuroscience* 32 (18): 6061–71. doi:10.1523/JNEUROSCI.0221-12.2012.
- Müller, Dominik, Sabrina J. Kugler, Anette Preiss, Dieter Maier, and Anja C. Nagel. 2005. "Genetic Modifier Screens on Hairless Gain-of-Function Phenotypes Reveal Genes Involved in Cell Differentiation, Cell Growth and Apoptosis in Drosophila Melanogaster." *Genetics* 171 (3): 1137–52. doi:10.1534/genetics.105.044453.
- Neriec, Nathalie, and Claude Desplan. 2016. "From the Eye to the Brain. Development of the Drosophila Visual System." *Current Topics in Developmental Biology* 116: 247–71. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.11.032.
- Nern, Aljoscha, Louis-Vu T Nguyen, Tory Herman, Saurabh Prakash, Thomas R Clandinin, and S Lawrence Zipursky. 2005. "An Isoform-Specific Allele of Drosophila N-Cadherin Disrupts a Late Step of R7 Targeting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12944–49. doi:10.1073/pnas.0502888102.
- Nern, Aljoscha, Yan Zhu, and S. Lawrence Zipursky. 2008. "Local N-Cadherin Interactions Mediate Distinct Steps in the Targeting of Lamina Neurons." *Neuron* 58: 34–41. doi:10.1016/j.neuron.2008.03.022.
- Neufeld, T P. 2004. "Genetic Analysis of TOR Signaling in Drosophila." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 279: 139–52.
- Neumüller, Ralph A., Constance Richter, Anja Fischer, Maria Novatchkova, Klaus G. Neumüller, and Juergen A. Knoblich. 2011. "Genome-Wide Analysis of Self-Renewal in Drosophila Neural Stem Cells by Transgenic RNAi." *Cell Stem Cell* 8 (5): 580–93. doi:10.1016/j.stem.2011.02.022.
- Newsome, T P, B Asling, and B J Dickson. 2000. "Analysis of Drosophila Photoreceptor Axon Guidance in Eye-Specific Mosaics." *Development (Cambridge, England)* 127 (4): 851–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648243>.
- Ni, Jian-Quan, Michele Markstein, Richard Binari, Barret Pfeiffer, Lu-Ping Liu, Christians Villalta, Matthew Booker, Lizabeth Perkins, and Norbert Perrimon. 2017. "Vector and Parameters for Targeted Transgenic RNA Interference in Drosophila Melanogaster." Accessed June 6. doi:10.1038/NMETH1146.

- Ni, Jian-Quan, Rui Zhou, Benjamin Czech, Lu-Ping Liu, Laura Holderbaum, Donghui Yang-Zhou, Hye-Seok Shim, et al. 2011. "A Genome-Scale shRNA Resource for Transgenic RNAi in *Drosophila*." *Nature Methods* 8 (5): 405–7. doi:10.1038/nmeth.1592.
- Ni, Jian Quan, Lu Ping Liu, Richard Binari, Robert Hardy, Hye Seok Shim, Amanda Cavallaro, Matthew Booker, et al. 2009. "A *Drosophila* Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics." *Genetics* 182 (4): 1089–1100. doi:10.1534/genetics.109.103630.
- Nicolas, Celine S, Mascia Amici, Zuner a Bortolotto, Andrew Doherty, Zsolt Csaba, Assia Fafouri, Pascal Dournaud, Pierre Gressens, Graham L Collingridge, and Stephane Peineau. 2013. "The Role of JAK-STAT Signaling within the CNS." *Jak-Stat* 2 (1): e22925. doi:10.4161/jkst.22925.
- Nolo, Riitta, Lois A. Abbott, and Hugo J. Bellen. 2001. "Drosophila Lyra Mutations Are Gain-of-Function Mutations of Senseless." *Genetics* 157 (1): 307–15.
- O'Donnell, Michael, Rebecca K. Chance, and Greg J. Bashaw. 2009. "Axon Growth and Guidance: Receptor Regulation and Signal Transduction." *Annual Review of Neuroscience* 32 (1): 383–412. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135614.
- Ohler, Stephan, Satoko Hakeda-Suzuki, and Takashi Suzuki. 2011. "Hts, the *Drosophila* Homologue of Adducin, Physically Interacts with the Transmembrane Receptor Golden Goal to Guide Photoreceptor Axons." *Developmental Dynamics* 240 (1): 135–48. doi:10.1002/dvdy.22515.
- Ohsawa, Ryosuke, and Ryoichiro Kageyama. 2008. "Regulation of Retinal Cell Fate Specification by Multiple Transcription Factors." *Brain Research* 1192: 90–98. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.014.
- Omar Trujillo-Cenóz, J Melamed. 1966. "Compound Eye of Dipterans: Anatomical Basis for Integration—an Electron Microscope Study." *Journal of Ultrastructure Research* 16: 395–98.
- Otsuna, H, and I Kei. 2006. "Systematic Analysis of the Visual Projection Neurons of *Drosophila Melanogaster*. I. Lobula-Specific Pathways." *J Comp Neurol* 497: 928–58. doi:10.1002/cne.
- Otsuna, Hideo, Kazunori Shinomiya, and Kei Ito. 2014. "Parallel Neural Pathways in Higher Visual Centers of the *Drosophila* Brain That Mediate Wavelength-Specific Behavior." *Frontiers in Neural Circuits* 8 (February): 1–12. doi:10.3389/fncir.2014.00008.
- Özel, Mehmet Neset, Marion Langen, Bassem A. Hassan, and P. Robin Hiesinger. 2015. "Filopodial Dynamics and Growth Cone Stabilization in *Drosophila* Visual Circuit Development." *eLife* 4 (OCTOBER2015): 1–21. doi:10.7554/eLife.10721.
- Panser, Karin, Laszlo Tirian, Florian Schulze, Santiago Villalba, Gregory S.X.E. Jefferis, Katja Böhler, and Andrew D. Straw. 2016. "Automatic Segmentation of *Drosophila* Neural Compartments Using GAL4 Expression Data Reveals Novel Visual Pathways." *Current Biology* 26 (15): 1943–54. doi:10.1016/j.cub.2016.05.052.
- Pappu, Kartik S, Marta Morey, Aljoscha Nern, Bettina Spitzweck, Barry J Dickson, and S L Zipursky. 2011. "Robo-3--Mediated Repulsive Interactions Guide R8 Axons during



- Drosophila Visual System Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (18): 7571–76. doi:10.1073/pnas.1103419108.
- Pazos Obregón, Flavio, Cecilia Papalardo, Sebastián Castro, Gustavo Guerberoff, and Rafael Cantera. 2015. "Putative Synaptic Genes Defined from a Drosophila Whole Body Developmental Transcriptome by a Machine Learning Approach." *BMC Genomics* 16 (1). BMC Genomics: 694. doi:10.1186/s12864-015-1888-3.
- Pecot, Matthew Y., Yi Chen, Orkun Akin, Zhenqing Chen, C. Y Kimberly Tsui, and S. Lawrence Zipursky. 2014. "Sequential Axon-Derived Signals Couple Target Survival and Layer Specificity in the Drosophila Visual System." *Neuron* 82 (2). Elsevier Inc.: 320–33. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.045.
- Pecot, Matthew Y., Wael Tadros, Aljoscha Nern, Maya Bader, Yi Chen, and S. Lawrence Zipursky. 2013. "Multiple Interactions Control Synaptic Layer Specificity in the Drosophila Visual System." *Neuron* 77 (2): 299–310. doi:10.1016/j.neuron.2012.11.007.
- Peple, Kathryn L, Mardelle Atkins, Koen Venken, Kari Wellnitz, Mark Harding, Benjamin Frankfort, and Graeme Mardon. 2008. "Two-Step Selection of a Single R8 Photoreceptor : A Bistable Loop between Senseless and Rough Locks in R8 Fate" 4079: 4071–79. doi:10.1242/dev.028951.
- Petrovic, Milan, and Thomas Hummel. 2008. "Temporal Identity in Axonal Target Layer Recognition." *Nature* 456 (7223): 800–803. doi:10.1038/nature07407.
- Pfeiffer, B. D., A. Jenett, A. S. Hammonds, T.-T B. Ngo, S. Misra, C. Murphy, A. Scully, et al. 2008. "Tools for Neuroanatomy and Neurogenetics in Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (28): 9715–20. doi:10.1073/pnas.0803697105.
- Pichaud, Franck, and Claude Desplan. 2002. "Pax Genes and Eye Organogenesis." *Current Opinion in Genetics and Development* 12 (4): 430–34. doi:10.1016/S0959-437X(02)00321-0.
- Pignoni, F, and S L Zipursky. 1997. "Induction of Drosophila Eye Development by Decapentaplegic." *Development (Cambridge, England)* 124 (2): 271–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053304>.
- Pineiro, C., C. S. Lopes, and F. Casares. 2014. "A Conserved Transcriptional Network Regulates Lamina Development in the Drosophila Visual System." *Development* 141 (14): 2838–47. doi:10.1242/dev.108670.
- Piper, Michael, Richard Anderson, Asha Dwivedy, Christine Weinl, Francis Van Horck, Kin Mei Leung, Emily Cogill, and Christine Holt. 2006. "Signaling Mechanisms Underlying Slit2-Induced Collapse of Xenopus Retinal Growth Cones." *Neuron* 49 (2): 215–28. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.008.
- Poeck, Burkhard, Susanne Fischer, Dorian Gunning, S. Lawrence Zipursky, and Iris Salecker. 2001. "Glial Cells Mediate Target Layer Selection of Retinal Axons in the Developing Visual System of Drosophila." *Neuron* 29 (1): 99–113. doi:10.1016/S0896-6273(01)00183-0.
- Poorkaj, P, T D Bird, E Wijsman, E Nemens, R M Garruto, L Anderson, a Andreadis, W C

- Wiederholt, M Raskind, and G D Schellenberg. 1998. "Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia." *Annals of Neurology* 43 (6): 815–25. doi:10.1002/ana.410430617.
- Prokop, Andreas, and Ian A. Meinertzhagen. 2006. "Development and Structure of Synaptic Contacts in *Drosophila*." *Seminars in Cell and Developmental Biology*. doi:10.1016/j.semcdb.2005.11.010.
- Ranson, H, L Rossiter, F Orтели, B Jensen, X Wang, C W Roth, F H Collins, and J Hemingway. 2001. "Identification of a Novel Class of Insect Glutathione S-Transferases Involved in Resistance to DDT in the Malaria Vector *Anopheles Gambiae*." *The Biochemical Journal* 359 (Pt 2): 295–304. doi:10.1042/0264-6021:3590295.
- Reiter, Lawrence T., Lorraine Potocki, Sam Chien, Michael Gribskov, and Ethan Bier. 2001. "A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences in *Drosophila Melanogaster*." *Genome Research* 11 (6): 1114–25. doi:10.1101/gr.169101.
- Rivera-Alba, Marta, Shiv N. Vitaladevuni, Yuriy Mischenko, Zhiyuan Lu, Shin Ya Takemura, Lou Scheffer, Ian A. Meinertzhagen, Dmitri B. Chklovskii, and Gonzalo G. De Polavieja. 2011. "Wiring Economy and Volume Exclusion Determine Neuronal Placement in the *Drosophila* Brain." *Current Biology* 21 (23). Elsevier Ltd: 2000–2005. doi:10.1016/j.cub.2011.10.022.
- Roignant, Jean-Yves, and Jessica E. Treisman. 2009. "Pattern Formation in the *Drosophila* Eye Disc." *The International Journal of Developmental Biology* 53 (5–6): 795–804. doi:10.1387/ijdb.072483jr.
- Roman, G, K Endo, L Zong, and R L Davis. 2001. "[Switch], a System for Spatial and Temporal Control of Gene Expression in *Drosophila Melanogaster*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (22): 12602–7. doi:10.1073/pnas.221303998.
- Roman, Gregg, Gregg Roman, Ronald L Davis, and Ronald L Davis. 2001. "Molecular Biology and Anatomy of." *BioEssays*, 571–81.
- Roote, John, and Steven Russell. 2012. "Toward a Complete *Drosophila* Deficiency Kit." *Genome Biology* 13 (3): 149. doi:10.1186/gb-2012-13-3-149.
- Ryan, M D, and J Drew. 1994. "Foot-and-Mouth Disease Virus 2A Oligopeptide Mediated Cleavage of an Artificial Polyprotein." *The EMBO Journal* 13 (4): 928–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112307>.
- Saisawang, Chonticha, Jantana Wongsantichon, and Albert J Ketterman. 2012. "A Preliminary Characterization of the Cytosolic Glutathione Transferase Proteome from *Drosophila Melanogaster*." *The Biochemical Journal* 442 (1): 181–90. doi:10.1042/BJ20111747.
- Salmeron, J M, K K Leuther, and S A Johnston. 1990. "GAL4 Mutations That Separate the Transcriptional Activation and GAL80-Interactive Functions of the Yeast GAL4 Protein." *Genetics* 125 (1): 21–27.
- Sánchez-García, I, and T H Rabbitts. 1994. "The LIM Domain: A New Structural Motif Found in Zinc-Finger-like Proteins." *Trends in Genetics : TIG* 10 (9): 315–20.



- Sanes, Joshua R., and Masahito Yamagata. 2009. "Many Paths to Synaptic Specificity." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (1): 161–95. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175402.
- Sanes, Joshua R., and S. Lawrence Zipursky. 2010. "Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems." *Neuron* 66 (1). Elsevier Inc.: 15–36. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.018.
- Sawicki, Rafał, Sharda P Singh, Ashis K Mondal, Helen Benes, and Piotr Zimniak. 2003. "Cloning, Expression and Biochemical Characterization of One Epsilon-Class (GST-3) and Ten Delta-Class (GST-1) Glutathione S-Transferases from *Drosophila Melanogaster*, and Identification of Additional Nine Members of the Epsilon Class." *The Biochemical Journal* 370 (Pt 2): 661–69. doi:10.1042/BJ20021287.
- Schmid, Aloisia, Benno Schindelholz, and Kai Zinn. 2002. "Combinatorial RNAi: A Method for Evaluating the Functions of Gene Families in *Drosophila*." *Trends in Neurosciences* 25 (2): 71–74. doi:10.1016/S0166-2236(02)02034-9.
- Schmitt, Adam M, Jun Shi, Alex M Wolf, Chin-Chun Lu, Leslie a King, and Yimin Zou. 2006. "Wnt-Ryk Signalling Mediates Medial-Lateral Retinotectal Topographic Mapping." *Nature* 439 (7072): 31–37. doi:10.1038/nature04334.
- Schmitz, Caroline, Parag Kinge, and Harald Hutter. 2007. "Axon Guidance Genes Identified in a Large-Scale RNAi Screen Using the RNAi-Hypersensitive *Caenorhabditis Elegans* Strain *Nre-1(hd20) Lin-15b(hd126)*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (3): 834–39. doi:10.1073/pnas.0510527104.
- Schwabe, Tina, Jolanta A. Borycz, Ian A. Meinertzhagen, and Thomas R. Clandinin. 2014. "Differential Adhesion Determines the Organization of Synaptic Fascicles in the *Drosophila* Visual System." *Current Biology* 24 (12). Elsevier Ltd: 1304–13. doi:10.1016/j.cub.2014.04.047.
- Schwabe, Tina, Helen Neuert, and Thomas R. Clandinin. 2013. "XA Network of Cadherin-Mediated Interactions Polarizes Growth Cones to Determine Targeting Specificity." *Cell* 154 (2). Elsevier Inc.: 351–64. doi:10.1016/j.cell.2013.06.011.
- Seinen, Erwin, Johannes G M Burgerhof, Ritsert C. Jansen, and Ody C M Sibon. 2011. "RNAi-Induced off-Target Effects in *Drosophila Melanogaster*: Frequencies and Solutions." *Briefings in Functional Genomics* 10 (4): 206–14. doi:10.1093/bfgp/elr017.
- Senti, KA, T Usui, K Boucke, U Greber, T Uemura, and BJ Dickson. 2003. "Flamingo Regulates R8 Axon-Axon and Axon-Target Interactions in the *Drosophila* Visual System." *Current Biology* 13: 828–32.
- Senti, Kirsten-André, Tadao Usui, Karin Boucke, Urs Greber, Tadashi Uemura, and Barry J Dickson. 2003. "Flamingo Regulates R8 Axon-Axon and Axon-Target Interactions in the *Drosophila* Visual System." *Current Biology* 13: 828–32. doi:10.1016/S.
- Sepp, Katharine J., Pengyu Hong, Sofia B. Lizarraga, Judy S. Liu, Luis A. Mejia, Christopher A. Walsh, and Norbert Perrimon. 2008. "Identification of Neural Outgrowth Genes Using Genome-Wide RNAi." *PLoS Genetics* 4 (7). doi:10.1371/journal.pgen.1000111.

- Shen, Kang, and Cornelia I. Bargmann. 2003. "The Immunoglobulin Superfamily Protein SYG-1 Determines the Location of Specific Synapses in *C. Elegans*." *Cell* 112 (5): 619–30. doi:10.1016/S0092-8674(03)00113-2.
- Shen, Kang, Richard D. Fetter, and Cornelia I. Bargmann. 2004. "Synaptic Specificity Is Generated by the Synaptic Guidepost Protein SYG-2 and Its Receptor, SYG-1." *Cell* 116 (6): 869–81. doi:10.1016/S0092-8674(04)00251-X.
- Shih, Hsiang-Wen, and Ann-Shyn Chiang. 2011. "Anatomical Characterization of Thermosensory AC Neurons in the Adult *Drosophila* Brain." *Journal of Neurogenetics* 25 (1–2): 1–6. doi:10.3109/01677063.2011.571323.
- Shinza-Kameda, Makiko, Etsuko Takasu, Kayoko Sakurai, Shigeo Hayashi, and Akinao Nose. 2006. "Regulation of Layer-Specific Targeting by Reciprocal Expression of a Cell Adhesion Molecule, Capricious." *Neuron* 49 (2): 205–13. doi:10.1016/j.neuron.2005.11.013.
- Shishido, E, M Takeichi, and a Nose. 1998. "Drosophila Synapse Formation: Regulation by Transmembrane Protein with Leu-Rich Repeats, CAPRICIOUS." *Science (New York, N.Y.)* 280 (5372): 2118–21. doi:10.1126/science.280.5372.2118.
- Silies, Marion, Darylm Gohl, YvetteE Fisher, Limor Freifeld, DamonA Clark, and ThomasR R. Clandinin. 2013. "Modular Use of Peripheral Input Channels Tunes Motion-Detecting Circuitry." *Neuron* 79 (1). Elsevier: 111–27. doi:10.1016/j.neuron.2013.04.029.
- Singh, Sharda P., Julia A. Coronella, Helen Beneš, Bruce J. Cochrane, and Piotr Zimniak. 2001. "Catalytic Function of *Drosophila Melanogaster* Glutathione S-Transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in Conjugation of Lipid Peroxidation End Products." *European Journal of Biochemistry* 268 (10): 2912–23. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02179.x.
- Spillantini, M.G., R.A. Crowther, W. Kamphorst, P. Heutink, and J.C. van Swieten. 1998. "Tau Pathology in Two Dutch Families with Mutations in the Microtubule-Binding Region of Tau." *The American Journal of Pathology* 153 (5). American Society for Investigative Pathology: 1359–63. doi:10.1016/S0002-9440(10)65721-5.
- State, The Pennsylvania. 1986. "Rat Glutathione & Transferases Supergene Family" 261 (29): 13793–99.
- Strausfeld, Nicholas James. 1976. *Atlas of an Insect Brain*. Springer Berlin Heidelberg.
- Sugie, A., D. Umetsu, T. Yasugi, K.-F. Fischbach, and T. Tabata. 2010. "Recognition of Pre- and Postsynaptic Neurons via nephrin/NEPH1 Homologs Is a Basis for the Formation of the *Drosophila* Retinotopic Map." *Development* 137 (19): 3303–13. doi:10.1242/dev.047332.
- Sugie, Atsushi, Satoko Hakeda-Suzuki, Emiko Suzuki, Marion Silies, Mai Shimoazono, Christoph M??hl, Takashi Suzuki, and Gaia Tavosanis. 2015. "Molecular Remodeling of the Presynaptic Active Zone of *Drosophila* Photoreceptors via Activity-Dependent Feedback." *Neuron* 86 (3): 711–26. doi:10.1016/j.neuron.2015.03.046.
- Suh, Greg S B, Burkhard Poeck, Tanguy Chouard, Efrat Oron, Daniel Segal, Daniel a Chamovitz, and S Lawrence Zipursky. 2002. "Drosophila JAB1 / CSN5 Acts in Photoreceptor Cells to Induce Glial Cells." *Neuron* 33: 35–46.

- Suzuki, Takumi, and Makoto Sato. 2014. "Neurogenesis and Neuronal Circuit Formation in the *Drosophila* Visual Center." *Development Growth and Differentiation* 56 (7): 491–98. doi:10.1111/dgd.12151.
- Swiech, Lukasz, Malgorzata Perycz, Anna Malik, and Jacek Jaworski. 2008. "Role of mTOR in Physiology and Pathology of the Nervous System." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1784 (1): 116–32. doi:10.1016/j.bbapap.2007.08.015.
- Sztal, Tamar, Henry Chung, Silke Berger, Peter D. Currie, Philip Batterham, and Phillip J. Daborn. 2012. "A Cytochrome p450 Conserved in Insects Is Involved in Cuticle Formation." *PLoS ONE* 7 (5): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0036544.
- Tain, Luke S, Heather Mortiboys, Ran N Tao, Elena Ziviani, Oliver Bandmann, and Alexander J Whitworth. 2009. "Rapamycin Activation of 4E-BP Prevents Parkinsonian Dopaminergic Neuron Loss." *Nature Neuroscience* 12 (9): 1129–35. doi:10.1038/nn.2372.
- Takemura, Shin-ya, Arjun Bharioke, Zhiyuan Lu, Aljoscha Nern, Shiv Vitaladevuni, Patricia K. Rivlin, William T. Katz, et al. 2013. "A Visual Motion Detection Circuit Suggested by *Drosophila* Connectomics." *Nature* 500 (7461). Nature Publishing Group: 175–81. doi:10.1038/nature12450.
- Takemura, Shin-ya, C. Shan Xu, Zhiyuan Lu, Patricia K. Rivlin, Toufiq Parag, Donald J. Olbris, Stephen Plaza, et al. 2015. "Synaptic Circuits and Their Variations within Different Columns in the Visual System of *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (44): 13711–16. doi:10.1073/pnas.1509820112.
- Takemura, Shin Ya, Zhiyuan Lu, and Ian A. Meinertzhagen. 2008. "Synaptic Circuits of the *Drosophila* Optic Lobe: The Input Terminals to the Medulla." *Journal of Comparative Neurology* 509 (5): 493–513. doi:10.1002/cne.21757.
- Tan, Liming, Kelvin Xi Zhang, Matthew Y. Pecot, Sonal Nagarkar-Jaiswal, Pei Tseng Lee, Shin Ya Takemura, Jason M. McEwen, et al. 2015. "Ig Superfamily Ligand and Receptor Pairs Expressed in Synaptic Partners in *Drosophila*." *Cell* 163 (7). Elsevier Ltd: 1756–69. doi:10.1016/j.cell.2015.11.021.
- Taniguchi, H, E Shishido, M Takeichi, and A Nose. 2000. "Functional Dissection of *Drosophila* Capricious: Its Novel Roles in Neuronal Pathfinding and Selective Synapse Formation." *Journal of Neurobiology* 42 (1): 104–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623905>.
- Tavazoie, Sohail F, Veronica A Alvarez, Dennis A Ridenour, David J Kwiatkowski, and Bernardo L Sabatini. 2005. "Regulation of Neuronal Morphology and Function by the Tumor Suppressors Tsc1 and Tsc2." *Nature Neuroscience* 8 (12): 1727–34. doi:10.1038/nn1566.
- Taylor, T. D. 2004. "Compartmentalization of Visual Centers in the *Drosophila* Brain Requires Slit and Robo Proteins." *Development* 131 (23): 5935–45. doi:10.1242/dev.01465.
- Tee, Andrew R., and John Blenis. 2005. "mTOR, Translational Control and Human Disease." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16 (1): 29–37. doi:10.1016/j.semcd.2004.11.005.
- Teleman, Aurelio A., Ya Wen Chen, and Stephen M. Cohen. 2005. "4E-BP Functions as a

- Metabolic Brake Used under Stress Conditions but Not during Normal Growth.” *Genes and Development* 19 (16): 1844–48. doi:10.1101/gad.341505.
- The, I N, Orderly Growth, O F Nerve, Fiber Patterns, and B Y R W Sperry. 1963. “CHEMOAFFINITY IN THE ORDERLY GROWTH OF NERVE,” 703–10.
- Thibault, S T, M A Singer, W Y Miyazaki, B Milash, N A Dompe, C M Singh, R Buchholz, et al. 2004. “A Complementary Transposon Tool Kit for *Drosophila Melanogaster* Using P and piggyBac.” *Nat Genet* 36 (3): 283–87. doi:10.1038/ng1314.
- Thomas, James H. 2007. “Rapid Birth-Death Evolution Specific to Xenobiotic Cytochrome P450 Genes in Vertebrates.” *PLoS Genetics* 3 (5): 720–28. doi:10.1371/journal.pgen.0030067.
- Timofeev, Katarina, Willy Joly, Dafni Hadjieconomou, and Iris Salecker. 2012. “Localized Netrins Act as Positional Cues to Control Layer-Specific Targeting of Photoreceptor Axons in *Drosophila*.” *Neuron* 75 (1). Elsevier Inc.: 80–93. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.037.
- Ting, C Y, S Yonekura, P Chung, S N Hsu, H M Robertson, A Chiba, and C H Lee. 2005. “*Drosophila* N-Cadherin Functions in the First Stage of the Two-Stage Layer-Selection Process of R7 Photoreceptor Afferents.” *Development* 132 (5): 953–63. doi:10.1242/dev.01661.
- Ting, Chun-Yuan, Shinichi Yonekura, Phoung Chung, Shu-Ning Hsu, Hugh M Robertson, Akira Chiba, and Chi-Hon Lee. 2005. “*Drosophila* N-Cadherin Functions in the First Stage of the Two-Stage Layer-Selection Process of R7 Photoreceptor Afferents.” *Development (Cambridge, England)* 132: 953–63. doi:10.1242/dev.01661.
- Ting, Chun Yuan, Tory Herman, Shinichi Yonekura, Shuying Gao, Jian Wang, Mihaela Serpe, Michael B. O’Connor, S. Lawrence Zipursky, and Chi Hon Lee. 2007. “Tiling of R7 Axons in the *Drosophila* Visual System Is Mediated Both by Transduction of an Activin Signal to the Nucleus and by Mutual Repulsion.” *Neuron* 56 (5): 793–806. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.033.
- Ting, Chun Yuan, Philip G. McQueen, Nishith Pandya, Tzu Yang Lin, Meiluen Yang, O. Venkateswara Reddy, Michael B. O’Connor, Matthew McAuliffe, and Chi Hon Lee. 2014. “Photoreceptor-Derived Activin Promotes Dendritic Termination and Restricts the Receptive Fields of First-Order Interneurons in *Drosophila*.” *Neuron* 81 (4). Elsevier Inc.: 830–46. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.012.
- Tomasi, Tatiana, Satoko Hakeda-Suzuki, Stephan Ohler, Alexander Schleiffer, and Takashi Suzuki. 2008. “The Transmembrane Protein Golden Goal Regulates R8 Photoreceptor Axon-Axon and Axon-Target Interactions.” *Neuron* 57 (5): 691–704. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.012.
- Triplett, Jason W., and David A. Feldheim. 2012. “Eph and Ephrin Signaling in the Formation of Topographic Maps.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 23 (1). Elsevier Ltd: 7–15. doi:10.1016/j.semdb.2011.10.026.
- Tu, Chen Pei D, and Bünyamin Akgül. 2005. “*Drosophila* Glutathione S-Transferases.” *Methods in Enzymology* 401: 204–26. doi:10.1016/S0076-6879(05)01013-X.
- Tursun, Baris, Anne Schlüter, Marvin A. Peters, Birte Viehweger, Heather P. Ostendorff, Juliana

- Soosairajah, Alexander Drung, et al. 2005. "Erratum: The Ubiquitin Ligase Rnf6 Regulates Local LIM Kinase 1 Levels in Axonal Growth Cones (Genes and Development (2005) 19 (2307-2319))." *Genes and Development* 19 (21): 2643. doi:10.1101/gad.1340605.filin.
- Tuthill, John C., Aljoscha Nern, Stephen L. Holtz, Gerald M. Rubin, and Michael B. Reiser. 2013. "Contributions of the 12 Neuron Classes in the Fly Lamina to Motion Vision." *Neuron* 79 (1). Elsevier Inc.: 128–40. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.024.
- Umetsu, D. 2006. "The Highly Ordered Assembly of Retinal Axons and Their Synaptic Partners Is Regulated by Hedgehog/Single-Minded in the Drosophila Visual System." *Development* 133 (5): 791–800. doi:10.1242/dev.02253.
- Usui, Tadao, Yasuyuki Shima, Yuko Shimada, Shinji Hirano, Robert W Burgess, Thomas L Schwarz, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. 1999. "Flamingo, a Seven-Pass Transmembrane Cadherin, Regulates Planar Cell Polarity under the Control of Frizzled." *Cell* 98: 585–95. [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(00\)80046-X.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(00)80046-X.pdf).
- Waddell, Scott, and William G Quinn. 2001. "F Lies , G Enes , and L Earning." *Analysis*, no. 3: 460–67. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1283.
- Wagh, Dhananjay A, Tobias M Rasse, Esther Asan, Alois Hofbauer, Isabell Schwenkert, Heike Dürrbeck, Sigrid Buchner, et al. 2006. "Bruchpilot, a Protein with Homology to ELKS/CAST, Is Required for Structural Integrity and Function of Synaptic Active Zones in Drosophila." *Neuron* 49 (6): 833–44. doi:10.1016/j.neuron.2006.02.008.
- Walkinshaw, Erica, Yunchao Gai, Caitlin Farkas, Daniel Richter, Eric Nicholas, Krystyna Keleman, and Ronald L. Davis. 2015. "Identification of Genes That Promote or Inhibit Olfactory Memory Formation in Drosophila." *Genetics* 199 (4): 1173–82. doi:10.1534/genetics.114.173575.
- Ward, Alex, Weizhe Hong, Vincenzo Favaloro, and Liqun Luo. 2015. "Toll Receptors Instruct Axon and Dendrite Targeting and Participate in Synaptic Partner Matching in a Drosophila Olfactory Circuit." *Neuron* 85 (5). Elsevier Inc.: 1013–28. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.003.
- Werck-Reichhart, Danièle, and René Feyereisen. 2000. "Cytochromes P450: A Success Story." *Genome Biology* 1 (6): reviews3003.1-reviews3003.9. doi:10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003.
- Wernet, Mathias F., and Claude Desplan. 2015. "Brain Wiring in the Fourth Dimension." *Cell* 162 (1). Elsevier Inc.: 20–22. doi:10.1016/j.cell.2015.06.040.
- Wernet, Mathias F., Thomas Labhart, Franziska Baumann, Esteban O. Mazzoni, Franck Pichaud, and Claude Desplan. 2003. "Homothorax Switches Function of Drosophila Photoreceptors from Color to Polarized Light Sensors." *Cell* 115 (3): 267–79. doi:10.1016/S0092-8674(03)00848-1.
- Wernet, Mathias F., Mariel M. Velez, Damon A. Clark, Franziska Baumann-Klausener, Julian R. Brown, Martha Klovstad, Thomas Labhart, and Thomas R. Clandinin. 2012. "Genetic Dissection Reveals Two Separate Retinal Substrates for Polarization Vision in Drosophila." *Current Biology* 22 (1). Elsevier: 12–20. doi:10.1016/j.cub.2011.11.028.

- Wernet, Mathias F, Esteban O Mazzoni, Arzu Celik, Dianne M Duncan, Ian Duncan, and Claude Desplan. 2006. "Stochastic Spineless Expression Creates the Retinal Mosaic for Colour Vision." *Nature* 440 (7081): 174–80. doi:10.1038/nature04615.
- Williams, Megan E., Joris de Wit, and Anirvan Ghosh. 2010. "Molecular Mechanisms of Synaptic Specificity in Developing Neural Circuits." *Neuron* 68 (1). Elsevier Inc.: 9–18. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.007.
- Wu, Ming, Aljoscha Nern, W. Ryan Williamson, Mai M. Morimoto, Michael B. Reiser, Gwyneth M. Card, and Gerald M. Rubin. 2016. "Visual Projection Neurons in the *Drosophila* Lobula Link Feature Detection to Distinct Behavioral Programs." *eLife* 5 (DECEMBER2016): 1–43. doi:10.7554/eLife.21022.
- Wullschleger, Stephan, Robbie Loewith, and Michael N Hall. 2006. "TOR Signaling in Growth and Metabolism." *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016.
- Xie, Baotong, Mark Charlton-Perkins, Elizabeth McDonald, Brian Gebelein, and Tiffany Cook. 2007. "Senseless Functions as a Molecular Switch for Color Photoreceptor Differentiation in *Drosophila*." *Development (Cambridge, England)* 134 (23): 4243–53. doi:10.1242/dev.012781.
- Xu, Tian, and Gerald M Rubin. 1993. "Analysis of Genetic Mosaics in Developing and Adult *Drosophila* Tissues" 1237: 1223–37.
- Yamagata, Masahito, and Joshua R Sanes. 2012. "Expanding the Ig Superfamily Code for Laminar Specificity in Retina: Expression and Role of Contactins." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (41): 14402–14. doi:10.1523/JNEUROSCI.3193-12.2012.
- Yamagata, Masahito, and Joshua R. Sanes. 2008. "Dscam and Sidekick Proteins Direct Lamina-Specific Synaptic Connections in Vertebrate Retina." *Nature* 451 (7177): 465–69. doi:10.1038/nature06469.
- Yasuyama, Kouji, Ian A Meinertzhagen, and Friedrich-Wilhelm Schürmann. 2003. "Synaptic Connections of Cholinergic Antennal Lobe Relay Neurons Innervating the Lateral Horn Neuropile in the Brain of *Drosophila Melanogaster*." *The Journal of Comparative Neurology* 466 (3): 299–315. doi:10.1002/cne.10867.
- Yonekura, Shinichi, Chun-Yuan Ting, Guilherme Neves, Kimberly Hung, Shu-Ning Hsu, Akira Chiba, Andrew Chess, and Chi-Hon Lee. 2006. "The Variable Transmembrane Domain of *Drosophila* N-Cadherin Regulates Adhesive Activity." *Molecular and Cellular Biology* 26 (17): 6598–6608. doi:10.1128/MCB.00241-06.
- Zhang, Kelvin Xi, Liming Tan, Matteo Pellegrini, S. Lawrence Zipursky, and Jason M. McEwen. 2016. "Rapid Changes in the Transcriptome during the Conversion of Growth Cones to Synaptic Terminals." *Cell Reports* 14 (5). The Authors: 1258–71. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.102.
- Zhao, Yunde, Anna K. Hull, Joseph R Ecker, Jennifer Normanly, Joanne Chory, and John L Celenza. 2002. "Trp-Dependent Auxin Biosynthesis in." *Genes & Development*, 3100–3112. doi:10.1101/gad.1035402.5.

## Bibliografia

Zipursky, S. Lawrence, and Joshua R. Sanes. 2010. "Chemoaffinity Revisited: Dscams, Protocadherins, and Neural Circuit Assembly." *Cell* 143 (3). Elsevier Inc.: 343–53. doi:10.1016/j.cell.2010.10.009.







**Anexos**



## Anexo 1: Resultados del *screen* mediante RNAi de los genes enriquecidos en R8 procedentes del enfoque no sesgado

*Screen* mediante el sistema *STaR GMR-Gal4* de los genes enriquecidos en R8 a 40h, 50h y 60h DFP.

		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Controles		Promedio		Promedio		Promedio	
GD		0		12,3± 4,3		3,3± 3,5	
KK		0,33± 0,5		9,4± 3,05		4,1± 1,15	
ISO		0		7,6± 3,07		8± 2	
		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Gen	Líneas RNAi	Promedio	Fc	Promedio	Fc	Promedio	Fc
<i>CG43462*</i>	18706 GD	1,33± 1,33	1,33	0,00± 0,00	0,00	0,00± 0,00	0,00
	109847 KK	2,67± 8,00	<b>8,00</b>	13,67± 5,92	1,45	17,00± 7,73	<b>4,15</b>
	102322 KK	3,67± 0,33	0,33	6,00± 7,46	0,64	8,33± 4,32	2,03
<i>Ssl2 **</i>	4417 GD	0,00± 0,00	0,00	19,67± 5,51	<b>1,60</b>	0,00± 0,00	0,00
	102870 KK	0,00± 0,00	0,00	31,33± 13,01	<b>3,33</b>	1,00± 1,00	0,24
<i>CG12589*</i>	107499 KK	0,33± 1,00	1,00	2,33± 1,53	0,25	2,33± 1,15	0,57
	35672 GD	0,00± 0,00	0,00	3,67± 2,08	0,30	8,00± 6,56	<b>2,42</b>
<i>AlphaPS5*</i>	6647 GD	1,33± 1,33	<b>1,33</b>	3,33± 3,51	0,27	4,33± 4,04	1,31
	100120 KK	1,33± 4,00	<b>4,00</b>	7,33± 1,53	0,78	6,67± 4,04	1,63
<i>nemy*</i>	7909 GD	0,00± 0,00	0,00	4,67± 5,03	0,38	7,67± 3,79	<b>2,32</b>
	40803 GD	0,00± 0,00	0,00	12,67± 5,13	1,03	11,00± 8,00	<b>3,33</b>
<i>CR31044*</i>	28653 V10	0,33± 0,33	0,33	3,67± 2,52	0,48	12,67± 3,79	1,67
<i>CG14490*</i>	17660 GD	0,33± 0,33	0,33	6,00± 3,00	0,49	6,00± 0,00	<b>1,82</b>
	106662 KK	1,67± 5,00	<b>5,00</b>	4,33± 0,58	0,46	3,67± 1,15	0,89
<i>CG13033*</i>	103248 KK	1,33± 4,00	<b>4,00</b>	6,00± 2,65	0,64	8,67± 3,51	<b>2,11</b>
	14250 GD	1,00± 1,00	<b>1,00</b>	4,00± 0,00	0,33	5,67± 3,51	1,72
<i>CG13532*</i>	105696 KK	1,67± 5,00	<b>5,00</b>	1,33± 0,58	0,14	6,00± 3,61	1,46
	28643 V10	0,00± 0,00	0,00	2,67± 2,31	0,35	7,33± 5,51	0,92
<i>5-HT1B*</i>	33418 V20	3,67± 3,67	<b>3,67</b>	13,33± 7,77	1,75	10,33± 5,86	1,29
	51842 V20	7,00± 7,00	<b>7,00</b>	4,67± 2,08	0,61	3,67± 2,52	0,48
<i>CG2983</i>	107015 KK	1,33± 4,00	4,00	0,00± 0,00	0,00	0,00± 0,00	0,00

	<b>849 GD</b>	0,67± 0,67	0,67	0,00± 0,00	0,00	0,00± 0,00	0,00
<b>CG5883</b>	<b>15961 GD</b>	0,33± 0,33	0,33	8,00± 6,24	0,65	4,33± 3,51	1,31
<b>CG5550</b>	<b>103982 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	14,00± 1,73	1,49	0,33± 0,58	0,08
	<b>31001 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	17,67± 3,51	1,44	0,67± 1,15	0,20
<b>CG33914</b>	<b>102904 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	1,00± 0,00	0,11	2,67± 2,08	0,65
<b>CG3259</b>	<b>46163 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	3,33± 3,51	0,27	4,33± 4,04	1,31
<b>CG31954</b>	<b>105988 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	10,00± 2,65	1,06	10,33± 4,04	2,52
	<b>53674 V20</b>	1,00± 0,00	0,00	8,67± 9,81	1,14	8,33± 1,15	1,04
<b>CG1561</b>	<b>106503 KK</b>	0,33± 1,00	1,00	5,67± 1,15	0,60	9,33± 7,57	2,28
	<b>50927 V20</b>	0,33± 0,33	0,33	6,00± 2,65	0,79	6,33± 4,93	0,79
<b>CG2269</b>	<b>100231 KK</b>	1,00± 3,00	3,00	5,67± 4,04	0,60	2,67± 3,06	0,65

**Tabla 11. Screen mediante RNAi de los genes enriquecidos en R8 a 40h, 50h y 60h DFP.** La tabla representa la media obtenida para fenotipo y su desviación típica para cada control, según la línea de RNAi empleada (GD, KK o en moscas ISO para las líneas procedentes de la librería TRiP). También se indican los genes pertenecientes a este grupo, las líneas de RNAi empleadas (VDRC: KK o GD; TRiP: V10 o V20), el promedio de cada fenotipo en los tres cerebros analizados y el *fc* con respecto a sus controles correspondientes. Con respecto al fenotipo en M1, se seleccionaron aquellos genes que mostraron este fenotipo en los 3 cerebros analizados al menos en una de las líneas de RNAi testadas. El promedio del fenotipo se calculó para cada línea de RNAi, en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180µm en cada cerebro. Los números resaltados en negrita indican los genes con fenotipo con un  $fc \geq 1,6$  para los fenotipos post M3 y/o en M6, o los genes con fenotipo en M1 en los 3 cerebros analizados al menos en una de las líneas de RNAi testadas. \*: Genes seleccionados, \*\*: Genes seleccionados para el *re-screen*.

#### Screen mediante el sistema *STaR GMR-Gal4* del grupo de genes R8.

		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Controles		Promedio		Promedio		Promedio	
GD		0,00		12,3± 4,3		3,3± 3,5	
KK		0,33± 0,5		9,4± 3,05		4,1± 1,15	
ISO		0,00		7,6± 3,07		8± 2	
		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Gen	Líneas RNAi	Promedio	Fc	Promedio	Fc	Promedio	Fc
<b>CG43462*</b>	<b>102322 KK</b>	3,67± 3,01	0,33	6,00± 7,46	0,64	8,33± 4,32	<b>2,03</b>
	<b>109847 KK</b>	0,11± 0,33	0,33	13,67± 5,92	1,45	17,00± 7,73	<b>4,15</b>
	<b>110101 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	14,33± 2,52	1,52	7,33± 0,58	1,79
<b>CG13532*</b>	<b>28643 V10</b>	0,00± 0,00	0,00	17,67± 11,85	<b>2,32</b>	15,33± 10,50	<b>1,92</b>
	<b>105696 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	8,67± 4,04	0,92	6,33± 4,16	1,54
<b>Osi16*</b>	<b>5761 GD</b>	0,33± 0,58	0,33	5,00± 4,00	0,41	8,00± 4,00	<b>2,42</b>
	<b>100479 KK</b>	0,67± 1,15	2,00	7,00± 2,83	0,74	10,67± 13,61	2,60
<b>CG6398*</b>	<b>9146 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	9,33± 4,93	0,76	9,33± 1,53	<b>2,83</b>
	<b>107646 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	5,00± 2,00	0,53	11,00± 1,00	<b>2,68</b>

<i>CG13116*</i>	44250 GD	0,67± 1,15	0,67	6,33± 1,53	0,51	11,33± 2,08	<b>3,43</b>
	101563 KK	0,33± 0,58	1,00	3,33± 2,08	0,35	12,33± 5,13	<b>3,01</b>
<i>ImpE3*</i>	16403 GD	0,00± 0,00	0,00	10,67± 1,53	0,87	10,00± 6,24	<b>3,03</b>
<i>IA-2*</i>	110595 KK	0,67± 1,15	2,00	3,00± 3,00	0,32	14,00± 4,58	<b>3,41</b>
<i>CG7227*</i>	108059 KK	0,00± 0,00	0,00	6,00± 3,00	0,64	10,33± 1,53	<b>2,52</b>
	50613 V20	0,00± 0,00	0,00	9,00± 7,00	1,18	4,33± 1,15	0,54
<i>Ppn*</i>	16523 GD	2,33± 2,31	<b>2,33</b>	2,67± 2,31	0,22	6,33± 0,58	<b>1,92</b>
	108005 KK	0,00± 0,00	0,00	6,33± 3,06	0,67	13,67± 3,51	<b>3,33</b>
<i>blot*</i>	101083 KK	0,00± 0,00	0,00	11,00± 6,24	1,17	12,67± 6,66	<b>3,09</b>
	5296 GD	0,00± 0,00	0,00	10,67± 5,51	0,87	3,67± 1,53	1,11
<i>Coop**</i>	108055 KK	1,33± 1,15	<b>4,00</b>	5,33± 3,51	0,57	9,33± 2,89	2,28
	29350 V10	0,00± 0,00	0,00	6,67± 1,53	0,88	15,67± 3,79	1,96
<i>CG14490*</i>	17660 GD	0,33± 0,58	0,33	4,33± 3,79	0,35	4,00± 1,73	1,21
	106662 KK	0,00± 0,00	0,00	7,33± 2,31	0,78	13,00± 3,46	<b>3,17</b>
<i>CG12880**</i>	1313 GD	0,00± 0,00	0,00	5,67± 2,08	0,46	15,00± 6,93	<b>4,55</b>
	106407 KK	0,00± 0,00	0,00	4,33± 1,53	0,46	12,33± 4,16	<b>3,01</b>
<i>CG31202*</i>	43523 GD	0,67± 1,15	0,67	4,00± 1,00	0,33	8,00± 2,00	<b>2,42</b>
	109700 KK	0,67± 0,58	2,00	4,33± 3,21	0,46	5,67± 1,15	1,38
<i>CG3961*</i>	107281 KK	0,33± 0,58	1,00	5,00± 4,58	0,53	13,00± 5,20	<b>3,17</b>
<i>MtnA**</i>	46120 GD	0,00± 0,00	0,00	11,00± 0,00	0,89	6,00± 1,73	<b>1,82</b>
	105011 KK	0,33± 0,58	1,00	8,67± 2,08	0,92	17,33± 5,13	<b>4,23</b>
<i>CG9782*</i>	102259 KK	1,67± 1,15	<b>5,00</b>	3,33± 3,51	0,00	8,33± 2,31	2,03
<i>CG3259*</i>	46183 GD	0,00± 0,00	0,00	11,67± 3,51	0,95	11,33± 2,31	<b>3,43</b>
<i>CG14132**</i>	106561 KK	0,00± 0,00	0,00	14,00± 6,08	1,49	20,00± 5,29	<b>4,88</b>
	43494 GD	0,00± 0,00	0,00	7,00± 5,00	0,57	6,67± 3,21	<b>2,02</b>
<i>CG31808**</i>	101864 KK	0,00± 0,00	0,00	6,67± 4,93	0,71	14,67± 2,08	<b>3,58</b>
<i>CG14110*</i>	14077 GD	0,67± 0,58	0,67	5,67± 2,52	0,46	12,33± 4,62	<b>3,74</b>
	110053 KK	0,00± 0,00	0,00	9,33± 4,51	0,99	6,67± 2,08	1,63
<i>CG7330**</i>	101836 KK	0,00± 0,00	0,00	4,67± 2,08	0,50	13,67± 5,03	<b>3,33</b>
	35620 V22	0,00± 0,00	0,00	10,00± 3,00	1,32	18,67± 2,08	<b>2,33</b>
<i>CG6421**</i>	15805 GD	2,00± 1,00	<b>2,00</b>	6,33± 1,53	0,51	17,33± 5,69	<b>5,25</b>
	100892 KK	1,00± 1,00	<b>3,00</b>	12,67± 2,31	1,35	13,67± 2,31	<b>3,33</b>
<i>CG7126*</i>	33357 GD	0,00± 0,00	0,00	7,00± 1,00	0,57	3,67± 2,08	1,11
	102555 KK	0,00± 0,00	0,00	10,00± 1,73	1,06	13,67± 2,08	<b>3,33</b>
<i>Ssl2**</i>	102870 KK	0,00± 0,00	0,00	5,67± 3,21	0,60	20,00± 6,00	<b>4,88</b>
	4417 GD	1,33± 1,53	1,33	10,33± 2,89	0,84	13,33± 4,93	<b>4,04</b>
<i>CG13062**</i>	48760 GD	0,00± 0,00	0,00	12,67± 4,51	1,03	13,67± 1,53	<b>4,14</b>

	<b>101832 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	15,33± 5,03	1,63	28,00± 2,65	<b>6,83</b>
<i>Twdf1*</i>	<b>18903 GD</b>	1,00± 1,73	1,00	13,00± 6,24	1,06	12,33± 4,04	<b>3,74</b>
<i>CG31371*</i>	<b>18431 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	7,33± 4,73	0,60	12,33± 2,08	<b>3,74</b>
	<b>110252 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	5,33± 3,21	0,57	12,67± 2,52	<b>3,09</b>
<i>CR31044*</i>	<b>28653 V10</b>	1,67± 1,53	<b>1,67</b>	15,00± 7,55	1,97	0,67± 1,15	0,08
<i>amd*</i>	<b>39707 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	12,33± 2,31	1,00	3,00± 3,00	0,91
	<b>105871 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	8,00± 2,65	0,85	12,00± 3,61	<b>2,93</b>
<i>CG43366*</i>	<b>109932 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	10,67± 7,23	1,13	11,67± 0,58	<b>2,85</b>
	<b>101186 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	12,67± 3,21	1,35	3,00± 2,65	0,73
<i>c-cup*</i>	<b>9282 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	7,67± 7,09	0,62	8,67± 1,15	<b>2,63</b>
<i>CG12581*</i>	<b>21331 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	13,33± 3,21	1,08	8,67± 3,06	<b>2,63</b>
	<b>109871 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	4,67± 4,04	0,50	5,00± 1,00	1,22
<i>CG31462*</i>	<b>18706 GD</b>	1,67± 1,53	<b>1,67</b>	3,00± 2,65	0,24	2,00± 1,00	0,61
<i>Nplp3</i>	<b>105584 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	5,67± 4,04	0,60	6,33± 3,21	1,54
	<b>28760 V10</b>	0,33± 0,58	0,33	12,00± 4,00	1,58	5,67± 0,58	0,71
<i>beat-IIIc</i>	<b>29607 V10</b>	0,67± 1,15	0,67	3,67± 1,53	0,48	4,67± 3,51	0,58
	<b>27137GD</b>	0,00± 0,00	0,00	3,00± 3,00	0,24	3,67± 1,53	1,11
	<b>109015 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	6,33± 4,93	0,67	5,00± 2,65	1,22
<i>egr</i>	<b>55276 V20</b>	0,33± 0,58	0,33	5,33± 1,53	0,70	8,33± 1,53	1,04
	<b>108814 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	5,00± 4,36	0,53	7,67± 2,08	1,87
<i>ninaB</i>	<b>104683 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	3,00± 2,65	0,32	6,67± 0,58	1,63
	<b>34994 V20</b>	0,67± 1,15	0,67	6,33± 2,52	0,83	7,00± 3,00	0,88
<i>retn</i>	<b>100579 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	0,00± 0,00	0,00	6,50± 6,36	1,59
	<b>35688 V21</b>	0,00± 0,00	0,00	5,33± 2,08	0,70	10,67± 4,62	1,33
<i>CG2269</i>	<b>100231 KK</b>	1,00± 0,00	3,00	5,33± 2,31	0,57	7,33± 3,06	1,79
<i>Cpn</i>	<b>101962 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	12,00± 1,73	1,28	10,67± 5,86	2,60
	<b>31881 V10</b>	0,00± 0,00	0,00	8,33± 2,89	1,10	8,00± 2,00	1,00

**Tabla 12. Screen mediante RNAi del grupo R8.** La tabla representa la media obtenida para cada fenotipo y su desviación típica para cada control, según la línea de RNAi empleada (GD, KK o en moscas ISO, para las líneas procedentes de la librería TRiP). Se indican los genes del grupo R8, las líneas de RNAi empleadas (VDRC: KK o GD; TRiP: V10 o V20), el promedio de cada fenotipo en los tres cerebros analizados y el *fc* con respecto a sus controles correspondientes. El promedio del fenotipo se calculó para cada línea de RNAi, en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180µm en cada cerebro. Los números resaltados en negrita indican los genes con fenotipo con un  $fc \geq 1,8$  o los genes con fenotipo en M1 en los 3 cerebros analizados al menos en una de las líneas de RNAi testadas \*: Genes seleccionados, \*\*: Genes seleccionados para el *re-screen*.

Screen mediante el sistema *STaR GMR-Gal4* del grupo de genes específico de R8.

		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Controles		Promedio		Promedio		Promedio	
GD		0,00		12,3± 4,3		3,3± 3,5	
KK		0,33± 0,5		9,4± 3,05		4,1± 1,15	
ISO		0,00		7,6± 3,07		8± 2	
		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Gen	Líneas RNAi	Promedio	Fc	Promedio	Fc	Promedio	Fc
<i>Syb</i> *	39067 V20	0,00± 0,00	0,00	18,67± 9,87	<b>2,46</b>	9,67± 4,62	1,21
	102922 KK	6,00± 8,72	<b>18,00</b>	4,67± 4,51	0,50	2,67± 3,06	0,65
<i>trol</i> *	38298 V20	2,00± 3,46	<b>2,00</b>	3,67± 1,15	0,48	2,67± 1,15	0,33
	110494 KK	0,67± 0,58	<b>2,00</b>	7,33± 3,51	0,78	6,67± 4,62	1,63
	24549 GD	0,00± 0,00	0,00	8,67± 7,23	0,70	9,33± 3,51	<b>2,83</b>
<i>Tsf1</i> *	14666 GD	0,33± 0,58	0,33	12,33± 3,21	1,00	1,33± 1,15	0,40
	55936 V20	4,67± 1,15	<b>4,67</b>	2,00± 1,00	0,26	0,33± 0,58	0,04
	106479 KK	0,00± 0,00	0,00	9,33± 6,11	0,99	2,33± 2,08	0,57
<i>CG34247</i> *	103200 KK	1,33± 1,15	<b>4,00</b>	12,00± 3,61	1,28	4,67± 2,08	1,14
<i>CG13737</i> *	42886 V20	1,67± 0,58	<b>1,67</b>	5,33± 4,04	0,70	1,33± 1,15	0,17
	103036 KK	0,33± 0,58	<b>1,00</b>	7,67± 4,51	0,82	1,67± 2,08	0,41
<i>GstE11</i> **	38243 GD	0,00± 0,00	0,00	32,00± 3,46	<b>2,60</b>	15,00± 6,00	<b>4,55</b>
	100175 KK	0,00± 0,00	0,00	10,00± 2,00	1,06	2,33± 3,21	0,57
<i>CG17121</i> *	54830 V20	0,67± 1,15	0,67	6,00± 3,46	0,79	0,67± 1,15	0,08
	100051 KK	1,00± 1,00	<b>3,00</b>	8,67± 3,06	0,92	3,33± 0,58	0,81
<i>CG34398</i> *	103861 KK	1,33± 1,53	<b>4,00</b>	4,67± 3,79	0,50	3,00± 4,36	0,73
<i>CG17265</i> **	101468 KK	0,00± 0,00	0,00	20,33± 2,52	2,16	11,00± 1,00	<b>2,68</b>
	36687 V20	0,67± 0,58	0,67	10,67± 4,04	1,40	1,00± 1,73	0,13
<i>ImpL1</i>	30288 GD	0,00± 0,00	0,00	10,00± 2,00	0,81	2,00± 2,00	0,61
	55387 V20	0,67± 0,58	0,67	11,00± 3,00	1,45	3,67± 0,58	0,46
<i>CG32354</i>	50693 V20	0,33± 0,58	0,33	7,00± 2,65	0,92	4,00± 2,00	0,50
<i>ImpE2</i>	100148 KK	0,00± 0,00	0,00	7,33± 1,53	0,78	5,67± 1,53	1,38
	55380 V20	0,33± 0,58	0,33	7,00± 2,00	0,92	6,67± 4,04	0,83
<i>CG10311</i>	37503 GD	0,00± 0,00	0,00	10,33± 4,04	0,84	4,67± 0,58	1,41
<i>Inx3</i>	30501 V10	0,00± 0,00	0,00	5,67± 4,16	0,75	3,33± 3,21	0,42
	108913 KK	0,00± 0,00	0,00	8,67± 2,52	0,92	11,00± 5,00	2,68
<i>Tmhs</i>	43386 GD	0,00± 0,00	0,00	9,00± 1,41	0,73	0,00± 0,00	0,00
	102005 KK	0,00± 0,00	0,00	7,67± 2,08	0,82	4,00± 3,00	0,98
<i>babos</i>	36304 GD	0,00± 0,00	0,00	11,33± 4,51	0,92	2,33± 2,52	0,71
<i>Gp150</i>	100134 KK	0,33± 0,58	1,00	11,33± 0,58	1,21	4,67± 1,15	1,14
<i>pip</i>	34613 V20	0,00± 0,00	0,00	15,00± 5,20	1,97	6,33± 2,52	0,79
	102352 KK	0,00± 0,00	0,00	11,33± 1,15	1,21	5,67± 1,15	1,38
<i>CG5639</i>	1306 GD	0,00± 0,00	0,00	5,33± 3,21	0,43	4,67± 2,08	1,41
<i>Gef64C</i>	105252 KK	0,67± 0,58	2,00	4,67± 2,08	0,50	6,67± 3,51	1,63



	<b>31130 V1</b>	0,00± 0,00	0,00	13,00± 3,61	1,71	3,00± 1,41	0,38
<b>CG4324</b>	<b>37212 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	13,33± 4,73	1,08	3,33± 2,31	1,01
	<b>109433 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	14,67± 6,81	1,56	10,00± 5,57	2,44
<b>CG7675</b>	<b>3046 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	16,33± 7,51	1,33	3,33± 2,08	1,01
	<b>107833 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	7,67± 5,03	0,82	2,67± 0,58	0,65
<b>CG9689</b>	<b>7828 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	7,67± 3,51	0,62	2,67± 1,15	0,81
	<b>13050 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	5,00± 2,00	0,41	0,67± 0,58	0,20
<b>CG5390</b>	<b>38034 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	4,33± 2,08	0,35	3,67± 3,06	1,11
	<b>101263 KK</b>	0,50± 0,71	1,50	10,00± 5,66	1,06	6,00± 1,41	1,46
	<b>52875V20</b>	0,33± 0,58	0,33	8,33± 2,52	1,10	0,00± 0,00	0,00
<b>CG6118</b>	<b>102587 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	15,00± 8,72	1,60	2,67± 1,53	0,65
<b>CG1561</b>	<b>106503 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	11,67± 2,08	1,24	5,33± 6,66	1,30
<b>CG13028</b>	<b>48357 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	9,67± 2,08	0,79	1,00± 1,73	0,30
<b>CG8547</b>	<b>40714 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	5,00± 2,00	0,41	3,00± 1,00	0,91
	<b>110523 KK</b>	1,00± 1,73	3,00	15,33± 4,51	1,63	8,50± 3,54	2,07
<b>CG14291</b>	<b>16897 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	10,67± 0,58	0,87	1,67± 0,58	0,51
	<b>107384 KK</b>	0,67± 1,15	2,00	5,33± 2,52	0,57	1,33± 1,53	0,33
<b>CG17224</b>	<b>41177 GD</b>	1,00± 1,00	1,00	9,67± 2,89	0,79	0,33± 0,58	0,10
	<b>101772 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	13,33± 3,51	1,42	7,67± 3,06	1,87
<b>Cyp4e1</b>	<b>4018 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	9,00± 8,49	0,73	0,50± 0,71	0,15
	<b>103324 KK</b>	0,33± 0,58	1,00	14,33± 3,79	1,52	6,00± 5,20	1,46

**Tabla 13. Screen mediante RNAi del grupo específico de R8.** La tabla representa la media obtenida para cada fenotipo y su desviación típica en cada control, según la línea de RNAi empleada (GD, KK o en moscas ISO, para las líneas procedentes de la librería TRiP). También se indican los genes de dicho grupo, las líneas de RNAi empleadas (VDRC: KK o GD; TRiP: V10 o V20), el promedio de cada fenotipo en los tres cerebros analizados y el *fc* con respecto a sus controles correspondientes. El promedio del fenotipo se calculó para cada línea de RNAi, en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180µm en cada cerebro. Los números resaltados en negrita indican los genes con fenotipo con un  $fc \geq 2,4$  y con fenotipo en los 3 cerebros, o los genes con fenotipo en M1 en los 3 cerebros analizados al menos en una de las líneas de RNAi testadas. \*: Genes seleccionados, \*\*: Genes seleccionados para el *re-screen*.

#### Screen mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4* del grupo de genes no agrupados.

		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Controles		%		%		%	
GD		1,42± 5,76		3,1± 1,62		1,2± 1,35	
KK		0,1± 0,22		3,8± 1,58		1,55± 0,98	
TRiP		0,98± 1,42		2,01± 1,49		1,46± 0,93	
		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Gen	Líneas ARNi	%	<i>Fc</i>	%	<i>Fc</i>	%	<i>Fc</i>
<b>CG9444*</b>	<b>43275 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	2,50± 0,43	0,82	10,20± 7,96	<b>8,23</b>
	<b>104529 KK</b>	0,21± 0,36	0,21	2,64± 2,79	1,31	7,28± 0,84	4,98
<b>CG11069*</b>	<b>51367 GD</b>	1,09± 1,18	0,76	1,90± 1,27	0,62	4,29± 1,79	<b>3,46</b>
	<b>101080 KK</b>	2,47± 3,78	2,50	1,90± 0,32	0,94	1,89± 2,37	1,29

<i>dve*</i>	26225 V10	7,31± 6,55	<b>12,37</b>	2,05± 0,76	0,81	2,29± 1,90	1,58
	109538 KK	0,00± 0,00	0,00	5,52± 1,92	2,73	6,79± 1,61	<b>4,64</b>
<i>Thor*</i>	36667 V20	0,51± 0,89	0,87	1,09± 0,62	0,43	1,12± 1,17	0,77
	35439 GD	0,00± 0,00	0,00	1,07± 0,68	0,35	2,99± 1,70	<b>2,41</b>
	100739 KK	0,35± 0,61	0,36	3,43± 0,46	1,70	3,78± 0,76	<b>2,59</b>
<i>CG30154*</i>	8823 GD	0,15± 0,26	0,10	4,99± 2,44	1,63	6,82± 4,63	<b>5,50</b>
	104636 KK	0,00± 0,00	0,00	2,07± 0,59	1,03	4,82± 1,39	<b>3,29</b>
<i>Tpr2*</i>	26077 GD	0,00± 0,00	0,00	1,90± 0,41	0,62	1,94± 0,66	1,57
	107813 KK	0,00± 0,00	0,00	2,72± 1,04	1,34	3,54± 1,97	<b>2,42</b>
<i>CG2016*</i>	28771 V10	0,13± 0,22	0,22	5,24± 1,18	<b>2,08</b>	1,43± 0,67	0,99
	102436 KK	0,17± 0,30	0,18	2,26± 1,56	1,12	2,69± 1,42	1,84
<i>CG32137*</i>	37870 GD	0,00± 0,00	0,00	3,22± 2,24	1,05	2,86± 0,68	<b>2,31</b>
<i>CG10126*</i>	57780 V20	0,00± 0,00	0,00	3,22± 1,32	1,28	2,46± 1,10	1,70
	44103 GD	1,36± 1,01	0,96	1,17± 1,14	0,38	1,55± 0,82	1,25
	102435 KK	1,63± 1,77	1,65	4,25± 0,35	2,10	4,51± 1,20	<b>3,08</b>
<i>CG5653*</i>	14064 GD	0,00± 0,00	0,00	3,63± 0,28	1,18	1,67± 0,69	1,34
	104121 KK	0,00± 0,00	0,00	2,42± 0,58	1,20	5,82± 2,53	<b>3,98</b>
<i>Fkbp13*</i>	12864 GD	0,00± 0,00	0,00	1,35± 0,76	0,44	5,00± 1,42	<b>4,04</b>
<i>CG17777*</i>	23551 GD	0,00± 0,00	0,00	1,69± 1,92	0,55	3,28± 2,67	<b>2,65</b>
	105327 KK	0,00± 0,00	0,00	2,09± 0,99	1,03	2,50± 0,63	1,71
<i>esn*</i>	34371 V20	0,00± 0,00	0,00	1,15± 0,49	0,46	4,77± 1,04	<b>3,30</b>
	32037 GD	0,00± 0,00	0,00	2,24± 1,98	0,73	6,57± 4,00	<b>5,30</b>
<i>CG14567*</i>	101284 KK	0,73± 0,72	0,74	0,79± 0,75	0,39	4,18± 0,51	<b>2,86</b>
<i>CG8420*</i>	28635 GD	0,57± 0,99	0,40	2,02± 1,55	0,66	0,82± 0,36	0,66
	104679 KK	0,25± 0,42	0,25	0,77± 0,03	0,38	5,10± 0,28	<b>3,49</b>
<i>Npc2b*</i>	101233 KK	0,00± 0,00	0,00	3,90± 0,61	1,93	6,67± 2,79	<b>4,56</b>
	38238 V20	4,00± 5,96	<b>6,78</b>	1,86± 0,60	0,74	1,94± 0,61	1,34
	42914 V20	0,00± 0,00	0,00	1,18± 0,39	0,47	1,23± 0,53	0,85
<i>CG11836*</i>	43308 V20	1,11± 1,43	1,88	2,19± 1,08	0,87	6,34± 1,83	<b>4,38</b>
	109470 KK	0,00± 0,00	0,00	3,03± 0,74	1,50	2,08± 1,40	1,42
<i>Cyp301a1*</i>	26989 GD	0,37± 0,32	0,26	3,75± 1,75	1,22	3,03± 1,38	<b>2,45</b>
	109771 KK	0,36± 0,63	0,37	0,72± 0,63	0,36	2,59± 2,53	1,77
<i>CG33178*</i>	49464 GD	0,00± 0,00	0,00	2,65± 1,13	0,86	2,67± 1,62	<b>2,15</b>
	104603 KK	0,31± 0,53	0,31	3,16± 1,10	1,57	3,20± 1,09	<b>2,19</b>
<i>CG14397*</i>	104851 KK	0,20± 0,35	0,21	2,91± 0,93	1,44	7,35± 4,22	<b>5,02</b>
<i>CG40485*</i>	15492 GD	0,00± 0,00	0,00	1,89± 0,42	0,61	6,08± 5,96	<b>4,91</b>
	106439 KK	0,00± 0,00	0,00	2,43± 1,51	1,20	4,32± 0,71	<b>2,95</b>
<i>CG32521*</i>	43699 GD	0,00± 0,00	0,00	4,45± 1,50	1,45	4,36± 1,66	<b>3,52</b>
	110002 KK	0,33± 0,57	0,33	4,33± 1,71	2,14	3,11± 0,64	2,13
<i>CG6218*</i>	13359 GD	0,00± 0,00	0,00	3,83± 3,26	1,25	4,93± 4,56	<b>3,98</b>
	35069 GD	0,12± 0,21	0,09	1,75± 0,47	0,57	1,71± 1,49	1,38
	106638 KK	0,00± 0,00	0,00	2,38± 1,06	1,18	9,41± 5,05	<b>6,43</b>
<i>CG8306*</i>	58146 V20	0,58± 0,63	0,59	1,87± 0,60	0,92	1,41± 2,04	0,96
	23134 GD	0,00± 0,00	0,00	3,21± 1,28	1,04	4,20± 1,66	<b>3,39</b>
	102921 KK	0,00± 0,00	0,00	4,74± 1,58	1,24	2,61± 1,33	1,68

<i>CG13117*</i>	39751 GD	0,00± 0,00	0,00	1,73± 1,20	0,56	3,56± 1,37	<b>2,87</b>
	106941 KK	0,00± 0,00	0,00	1,57± 1,57	0,41	1,81± 1,02	1,16
<i>CG1722*</i>	39940 GD	0,24± 0,41	0,17	1,53± 1,41	0,50	2,09± 0,81	1,69
	105537 KK	0,19± 0,32	0,27	5,10± 3,25	1,34	4,64± 3,06	<b>2,98</b>
<i>Cpr49Ae*</i>	109968 KK	0,00± 0,00	0,00	3,80± 1,68	1,00	3,98± 1,05	<b>2,55</b>
	35428 GD	0,00± 0,00	0,00	5,22± 0,81	1,70	4,15± 1,27	<b>3,35</b>
<i>Scp2*</i>	31916 GD	0,00± 0,00	0,00	2,62± 1,80	0,85	4,71± 2,77	<b>3,80</b>
<i>Clect27*</i>	3202 GD	0,39± 0,36	0,28	2,18± 1,25	0,71	3,58± 1,12	<b>2,89</b>
	105562 KK	0,60± 1,03	7,01	4,46± 0,31	1,17	3,83± 1,68	<b>2,46</b>
<i>CG11686*</i>	19774 GD	0,40± 0,35	0,28	1,22± 0,57	0,40	3,13± 1,41	<b>2,53</b>
	107754 KK	0,00± 0,00	0,00	1,96± 1,60	0,51	3,14± 2,20	<b>2,02</b>
<i>GstE14*</i>	54836 V20	0,69± 0,65	0,70	0,69± 0,65	0,34	3,71± 1,87	<b>2,54</b>
	40316 GD	0,00± 0,00	0,00	5,45± 1,03	1,78	1,64± 0,30	1,32
	101884 KK	0,00± 0,00	0,00	2,97± 1,92	0,78	4,59± 0,35	<b>2,94</b>
<i>CG5883*</i>	55970 V20	0,87± 1,18	0,88	1,46± 0,31	0,72	1,88± 0,57	1,29
	15961 GD	0,00± 0,00	0,00	3,40± 1,12	1,11	1,32± 0,85	1,06
	58207* V20	1,54± 0,32	<b>2,53</b>	1,47± 1,51	0,73	1,48± 0,87	1,01
<i>CG32052*</i>	36763 V20	0,35± 0,60	0,35	2,95± 1,42	1,46	0,68± 0,59	0,47
	105824 KK	3,42± 0,49	<b>40,23</b>	1,69± 1,17	0,44	0,70± 0,77	0,45
<i>CG6026*</i>	108139 KK	0,36± 0,63	4,29	2,28± 0,60	0,60	4,92± 3,85	<b>3,16</b>
<i>laccase2*</i>	22959 GD	0,00± 0,00	0,00	1,48± 1,06	0,48	3,16± 1,83	<b>2,55</b>
	100070 KK	0,00± 0,00	0,00	2,39± 1,73	0,63	3,28± 1,45	2,10
	101687 KK	0,00± 0,00	0,00	3,00± 0,65	0,79	6,65± 1,79	<b>4,26</b>
<i>CG7236</i>	27505 V20	0,60± 0,63	1,01	0,89± 0,70	0,35	1,10± 0,46	0,76
<i>v</i>	107798 KK	0,00± 0,00	0,00	3,13± 1,81	0,82	3,66± 1,87	2,35
	50641 V20	3,44± 1,11	3,48	1,24± 0,61	0,61	2,87± 3,46	1,96
<i>rdhB</i>	42712 GD	0,18± 0,31	0,13	1,25± 1,52	0,41	1,16± 1,57	0,94
	102434 KK	0,19± 0,33	0,19	2,81± 0,03	1,39	4,52± 1,48	3,09
<i>Slob</i>	55879 V20	0,86± 1,03	1,45	2,77± 2,08	1,10	3,05± 0,87	2,11
	102868 KK	0,32± 0,55	0,32	1,23± 0,44	0,61	3,07± 2,23	2,10
<i>Pka-C3</i>	55860 V20	1,27± 1,35	2,16	2,37± 0,29	0,94	0,46± 0,43	0,32
	39050 V20	0,69± 0,24	1,17	1,25± 0,88	0,50	4,89± 0,96	3,38
<i>gfA</i>	51049 V20	4,54± 2,45	7,69	1,41± 0,85	0,56	2,18± 0,69	1,51
	11329 GD	1,48± 1,96	1,04	2,22± 1,96	0,72	4,31± 2,77	3,48
<i>Pen</i>	27692 V10	0,00± 0,00	0,00	3,76± 2,55	1,49	5,15± 1,21	3,56
	34265 GD	0,00± 0,00	0,00	1,17± 0,74	0,38	1,99± 1,45	1,61
<i>Vha68-2</i>	110600 KK	0,00± 0,00	0,00	4,06± 1,05	2,01	4,86± 3,11	3,32
<i>CG13426</i>	8821 GD	0,00± 0,00	0,00	1,00± 0,52	0,33	0,82± 0,74	0,66
<i>vri</i>	40862 V20	0,00± 0,00	0,00	2,19± 1,49	0,87	2,26± 2,44	1,56
	5650 GD	0,00± 0,00	0,00	1,28± 1,18	0,42	1,54± 1,04	1,25
<i>Vdup1</i>	15203 GD	0,00± 0,00	0,00	2,88± 0,34	0,94	1,14± 0,76	0,92
<i>CG11997</i>	36753 V20	0,45± 0,45	0,76	2,64± 0,81	1,05	0,73± 0,25	0,51
	107882 KK	0,14± 0,25	0,14	1,77± 0,43	0,88	0,97± 1,04	0,67
<i>CG2082</i>	19120 GD	2,36± 2,18	1,66	1,47± 0,23	0,48	1,82± 2,04	1,47
	102438 KK	0,69± 1,20	0,70	4,58± 3,71	2,27	3,80± 3,46	2,60

<b>CG13082</b>	<b>109511 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	5,31± 0,90	2,63	3,38± 2,12	2,31
<b>CG4893</b>	<b>38287 V20</b>	0,00± 0,00	0,00	2,80± 1,73	1,01	1,00± 0,16	0,69
	<b>109957 KK</b>	3,98± 6,89	4,03	2,55± 2,36	1,26	4,64± 4,12	3,17
<b>sano</b>	<b>24606 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	1,85± 1,40	0,60	0,65± 0,67	0,52
	<b>104288 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	2,45± 2,37	1,21	2,21± 1,91	1,51
<b>bou</b>	<b>5443 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	1,80± 0,31	0,59	2,89± 1,54	2,33
	<b>107102 KK</b>	0,37± 0,33	0,38	2,05± 1,25	1,01	5,18± 3,77	3,55
<b>CG17786</b>	<b>19270 GD</b>	1,00± 0,51	0,70	1,34± 0,28	0,44	1,87± 0,84	1,51
	<b>107400 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	2,36± 0,87	1,17	3,44± 1,15	2,35
<b>CG32368</b>	<b>28606 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	2,92± 0,23	0,95	1,60± 1,21	1,29
	<b>103313 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	2,72± 1,44	1,35	2,14± 1,51	1,46
<b>Spn100A</b>	<b>14504 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	3,27± 0,58	1,07	2,43± 0,55	1,96
	<b>100398 KK</b>	0,17± 0,30	0,17	3,14± 2,20	1,55	2,48± 1,94	1,69
<b>TwdlE</b>	<b>31963 V10</b>	0,18± 0,31	0,30	3,10± 1,06	1,23	3,19± 2,79	2,21
	<b>107483 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	4,39± 1,60	2,17	2,01± 1,48	1,37
<b>CG7337</b>	<b>53242 V22</b>	0,13± 0,23	0,22	2,08± 1,13	0,83	1,10± 0,28	0,76
	<b>110764 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	2,74± 0,66	1,36	1,71± 0,19	1,17
<b>CG9134</b>	<b>108295 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	1,64± 0,94	0,81	2,04± 0,56	1,40
<b>nemy</b>	<b>7909 GD</b>	0,15± 0,27	0,11	2,65± 0,89	0,86	2,31± 1,57	1,86
	<b>40803 GD</b>	0,37± 0,65	0,26	2,50± 2,46	0,81	1,78± 1,35	1,43
<b>CG31710</b>	<b>102131 KK</b>	0,29± 0,50	0,29	2,09± 0,60	1,03	2,70± 0,68	1,85
<b>fa2h</b>	<b>110538 KK</b>	0,57± 0,59	0,58	1,48± 0,81	0,73	2,46± 0,97	1,68
<b>Cpr72Ea</b>	<b>53878 V20</b>	0,34± 0,59	0,57	1,49± 0,73	0,59	2,33± 0,91	1,61
	<b>14241 GD</b>	0,14± 0,23	0,10	1,17± 0,12	0,38	1,65± 0,73	1,33
<b>CG13856</b>	<b>14474 GD</b>	0,15± 0,27	0,11	1,75± 1,64	0,57	2,66± 1,59	2,14
<b>CG18735</b>	<b>53375 V20</b>	0,15± 0,27	0,26	3,20± 1,69	1,27	1,35± 1,39	0,93
	<b>30914 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	1,89± 1,02	0,62	1,14± 1,03	0,92
<b>CG43394</b>	<b>2793 GD</b>	0,18± 0,31	0,12	2,29± 1,53	0,75	2,19± 1,10	1,77
<b>CG12811</b>	<b>101055 KK</b>	1,72± 1,60	1,74	2,65± 1,69	1,31	1,58± 0,09	1,08
<b>CG10283</b>	<b>101168 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	2,81± 1,91	0,74	2,64± 2,67	1,69
<b>dsx-c73A</b>	<b>53964 V20</b>	0,00± 0,00	0,00	2,11± 0,86	1,05	0,70± 0,74	0,48
	<b>42489 GD</b>	0,41± 0,71	0,29	2,44± 0,83	0,79	0,95± 1,32	0,77
<b>GstD3</b>	<b>48849 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	3,73± 1,24	1,21	2,05± 0,77	1,65
	<b>106287 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	4,11± 0,80	1,08	3,55± 1,79	2,28
<b>Msr-110</b>	<b>5033 GD</b>	0,86± 1,50	0,61	0,89± 0,80	0,29	2,61± 0,93	2,11
	<b>51034 V20</b>	0,52± 0,53	0,52	1,71± 0,85	0,85	2,20± 0,28	1,50
<b>Csas</b>	<b>54843 V20</b>	2,01± 1,77	2,04	1,16± 0,31	0,58	2,14± 0,22	1,47
	<b>101396 KK</b>	1,64± 2,07	19,33	2,67± 1,75	0,70	1,67± 1,45	1,07
<b>CG34296</b>	<b>104895 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	4,78± 1,84	1,25	2,91± 2,54	1,87
<b>wus</b>	<b>58265 V20</b>	0,00± 0,00	0,00	2,20± 0,77	0,72	1,12± 0,46	0,76
<b>CG6357</b>	<b>8782 GD</b>	0,32± 0,28	0,22	3,34± 0,44	1,09	3,23± 1,86	2,60
	<b>43151 V22</b>	0,24± 0,42	0,25	1,67± 1,03	0,83	1,21± 0,42	0,83
<b>CG6426</b>	<b>8805 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	2,52± 1,09	0,82	1,59± 1,32	1,29
	<b>102243 KK</b>	0,24± 0,42	2,82	1,30± 0,76	0,34	1,71± 1,80	1,10
<b>pdgy</b>	<b>55272 V20</b>	0,38± 0,66	0,39	1,92± 0,70	0,95	1,14± 1,98	0,78

	<b>100411 KK</b>	0,47± 0,81	5,49	2,05± 0,64	0,54	1,58± 0,83	1,01
<i>ckd</i>	<b>103528 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	4,39± 2,31	1,15	3,81± 1,39	2,44
	<b>55967 V20</b>	0,00± 0,00	0,00	2,15± 1,09	1,07	1,41± 0,47	0,97
<b>CG31559</b>	<b>33967 GD</b>	0,52± 0,90	0,37	2,67± 0,92	0,87	0,86± 0,79	0,69
<i>sprt</i>	<b>107873 KK</b>	0,22± 0,38	2,58	5,12± 3,40	1,34	3,72± 3,24	2,38
<b>CG9312</b>	<b>16646 GD</b>	0,19± 0,33	0,13	1,72± 0,95	0,56	1,76± 1,55	1,42
<i>KFase</i>	<b>45622 GD</b>	0,82± 1,42	0,57	0,20± 0,35	0,07	1,35± 1,19	1,09
	<b>109675 KK</b>	0,59± 1,02	6,97	2,49± 1,84	0,65	1,83± 1,63	1,17
<b>CG13077</b>	<b>51496 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	3,87± 1,46	1,26	2,52± 0,87	2,04
	<b>105526 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	4,98± 3,40	1,30	1,99± 0,32	1,28
<i>hebe</i>	<b>32665 GD</b>	0,40± 0,69	0,28	2,33± 1,24	0,76	1,40± 1,19	1,13
	<b>107655 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	2,46± 1,67	0,64	1,55± 1,09	0,99
<b>CG15080</b>	<b>106073 KK</b>	0,23± 0,40	2,74	5,14± 1,46	1,35	2,80± 0,60	1,80
<b>CG6234</b>	<b>51527 GD</b>	0,30± 0,52	0,21	1,49± 0,38	0,48	2,46± 0,70	1,99
	<b>101649 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	3,96± 1,13	1,04	2,64± 1,49	1,70
<b>CG15629</b>	<b>49077 GD</b>	0,27± 0,47	0,19	2,85± 2,10	0,93	2,27± 1,21	1,83
	<b>108604 KK</b>	0,25± 0,42	2,89	2,69± 1,45	0,71	1,13± 0,45	0,73
<b>CG5731</b>	<b>15543 GD</b>	0,21± 0,36	0,15	2,60± 1,60	0,85	1,59± 0,52	1,28
<b>CG7548</b>	<b>16991 GD</b>	0,16± 0,28	0,11	4,22± 1,24	1,37	2,96± 0,08	2,39
	<b>101214 KK</b>	0,00± 0,00	0,00	1,98± 0,38	0,52	1,98± 1,65	1,27
<b>CG5873</b>	<b>14374 GD</b>	0,00± 0,00	0,00	1,77± 1,55	0,58	1,36± 1,32	1,10
<b>CG31728</b>	<b>55628 V20</b>	0,95± 0,45	0,96	3,03± 1,94	1,50	1,20± 0,59	0,82
<i>Reg-5</i>	<b>101140 KK</b>	0,15± 0,26	1,79	3,34± 1,87	0,88	1,93± 1,64	1,24
<b>CG12589</b>	<b>35672 GD</b>	2,36± 1,90	1,66	1,73± 1,02	0,56	0,73± 0,80	0,59
	<b>107499 KK</b>	0,50± 0,44	5,86	2,59± 0,98	0,68	2,81± 0,84	1,80

**Tabla 14. Screen mediante RNAi de los genes no agrupados.** La tabla representa el porcentaje medio obtenido para cada fenotipo y su desviación típica en cada control, según la línea de RNAi empleada (GD, KK, en este caso para el control TRiP se empleó un control específico, aunque el resultado no variaba con respecto a las moscas ISO utilizadas en los grupos anteriores). También se indican los genes de dicho grupo, las líneas de RNAi empleadas (VDRC: KK o GD; TRiP: V10 o V20), el promedio de cada fenotipo en los tres cerebros analizados y el *fc* con respecto a sus controles correspondientes. El promedio del fenotipo se calculó para cada línea de RNAi, en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180µm en cada cerebro. Los números resaltados en negrita indican los genes con fenotipo con un *fc*≥2 y con fenotipo en los 3 cerebros, o los genes con fenotipo en M1 en los 3 cerebros analizados al menos en una de las líneas de RNAi testadas. \*: Genes seleccionados.

#### Re-screen mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.

	R8s en M1	R8s Post M3	R8s en M6
Controles	%	%	%
GD	1,42± 5,76	3,1± 1,62	1,2± 1,35
KK	0,1± 0,22	3,8± 1,58	1,55± 0,98
TRiP	0,98± 1,42	2,01± 1,49	1,46± 0,93

Genes	Líneas RNAi	R8s en M1		R8s Post M3		R8s en M6	
		%	Fc	%	Fc	%	Fc
<i>GstE11</i> *	38243 GD	0,00± 0,00	0,00	14,45± 2,80	<b>4,71</b>	10,24± 4,61	<b>8,26</b>
<i>Tsf1</i> *	55936 V20	7,85± 2,83	<b>11,32</b>	0,67± 1,15	0,33	1,67± 2,89	1,14
<i>AlphaPS5</i> *	100120 KK	0,47± 0,61	5,53	4,11± 3,16	1,08	5,85± 2,74	<b>3,75</b>
	6647 GD	3,93± 5,71	2,76	1,76± 1,72	0,57	4,59± 2,09	<b>3,70</b>
<i>5-HT1B</i>	51842 V20	5,48± 2,53	<b>5,55</b>	1,01± 0,85	0,50	1,49± 1,11	1,02
	33418 V20	1,76± 1,25	1,78	1,37± 0,85	0,68	3,45± 1,55	<b>2,36</b>
<i>Ppn</i> *	16523 GD	5,37± 4,56	<b>3,77</b>	1,46± 1,10	0,48	1,59± 1,42	1,28
<i>CG43462</i> *	109847 KK	0,29± 0,59	3,46	6,10± 4,35	1,60	5,82± 1,67	3,73
	102322 KK	2,71± 1,72	<b>31,90</b>	0,47± 0,65	0,12	2,56± 2,30	1,65
	18706 GD	5,52± 1,80	<b>3,88</b>	0,62± 1,24	0,20	3,24± 2,25	<b>2,61</b>
<i>CG13033</i> *	14250 GD	2,33± 3,24	1,63	1,47± 1,09	0,48	6,34± 2,69	<b>5,12</b>
<i>CG6421</i> *	100892 KK	7,12± 3,44	<b>83,84</b>	3,16± 2,26	0,83	4,40± 3,92	2,82
<i>CG17265</i>	101468 KK	1,67± 1,55	19,71	3,46± 2,43	0,91	1,53± 1,93	0,98
<i>CG12880</i>	1313 GD	0,05± 0,33	0,03	4,75± 2,71	1,55	1,66± 1,37	1,34
<i>CG13062</i>	101832 KK	0,00± 0,00	0,00	5,38± 2,93	1,41	1,80± 0,75	1,15
<i>Ssl2</i>	102870 KK	0,00± 0,00	0,00	4,14± 0,34	1,08	1,73± 0,91	1,11
<i>CG7330</i>	35620 V22	0,00± 0,00	0,00	3,09± 1,47	0,96	0,67± 1,15	0,35
<i>Mtn A</i>	105011 KK	0,00± 0,00	0,00	4,05± 1,76	1,06	2,80± 1,51	1,80
<i>CG14132</i>	106561 KK	0,00± 0,00	0,00	2,93± 1,99	0,77	1,64± 1,60	1,05
<i>CG31808</i>	101864 KK	0,00± 0,00	0,00	2,74± 1,01	0,72	1,27± 0,98	0,82
<i>Coop</i>	29350 V10	0,00± 0,00	0,00	3,00± 1,30	0,93	4,22± 2,19	2,18
<i>CG9782</i>	102259 KK	1,93± 2,26	22,69	0,74± 1,27	0,19	3,48± 2,33	2,23
<i>CG13532</i>	105696 KK	0,80± 0,81	9,38	2,61± 2,12	0,68	2,47± 1,92	1,58

**Tabla 15. Re-screen mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.** En la tabla se indica el porcentaje medio obtenido para cada fenotipo y su desviación típica en cada control, según la línea de RNAi empleada (GD, KK, en este caso para el control TRiP se empleó un control específico, aunque el resultado no variaba con respecto a las moscas ISO utilizadas en los grupos anteriores). La tabla representa los genes seleccionados para su *re-screen* mediante el sistema *Rh6 GMR-Gal4*, las líneas de RNAi empleadas (VDRC, KK o GD; TRiP, V10 o V20), el porcentaje medio de cada fenotipo en los cerebros analizados y el *fc* con respecto a sus controles correspondientes. Los números resaltados en negrita indican los genes con fenotipo con un  $fc > 2$  y con fenotipo en todos los cerebros en al menos una de las líneas de RNAi testadas. Con respecto al fenotipo en M1, es relevante mencionar que se observan *fc* elevados debido a que la media obtenida de este fenotipo en los controles, es bastante baja. Por lo que al hacer el cociente para obtener el *fc*, resulta en un número relativamente elevado, el cual no es el reflejo de un fenotipo. El porcentaje promedio del fenotipo se calculó para cada línea de RNAi en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180  $\mu\text{m}$  en cada cerebro. Los genes que presentan un  $fc > 2$  y no han sido seleccionados, no mostraron el fenotipo en todos los cerebros observados en al menos una línea de RNAi. Cerebros analizados, n= 4-10, \*: Genes con fenotipo con el sistema *STaR GMR-Gal4* y con el sistema *Rh6 GMR-Gal4*.

**Re-screen con *ey.3.5-Gal4* + *GMR-Gal4*.**

		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Controles		%		%		%	
GD		0,00± 0,00		9,10± 2,73		3,17± 2,59	
KK		0,00± 0,00		10,31± 2,57		3,20± 1,91	
		R8s en M1		R8s post M3		R8s en M6	
Gen	Líneas RNAi	%	Fc	%	Fc	%	Fc
<b>CG17265</b>	<b>101468 KK</b>	0,00± 0,00	0	8,18± 2,78	0,79	2,68± 1,25	0,84
<b>CG12880</b>	<b>1313 GD</b>	0,00± 0,00	0	15,73± 5,40	1,73	6,69± 2,26	2,11
<b>CG6421</b>	<b>15805 GD</b>	0,20± 0,20	0,2	7,26± 2,70	0,80	1,24± 1,09	0,39
<b>CG13062 *</b>	<b>101832 KK</b>	Las moscas permanecen dentro de la pupa con cabeza o con una pequeña cabeza sin ojos					
<b>GstE11 *</b>	<b>38243 GD</b>						

**Tabla 16. Re-screen mediante el sistema *ey3.5-Gal4* + *GMR-Gal4*.** La tabla representa los genes seleccionados, las líneas de RNAi empleadas (VDRC, KK o GD; TriP, V10 o V20), el porcentaje medio de cada fenotipo en los tres cerebros analizados y la desviación típica, y el *fc* con respecto a sus controles correspondientes. El porcentaje promedio del fenotipo se calculó para cada línea de RNAi, en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180µm en cada cerebro. Cerebros analizados, n= 10, \*: Genes con una función temprana en el desarrollo.



## Anexo 2: Genes candidatos con función desconocida o sin líneas mutantes disponibles

Genes	Fenotipo R8	Grupo de procedencia	SU Sens	SU Pros	Categoría funcional
<i>Clect27</i>	M6	No agrupados	X	X	MSC
<i>CG9444</i>	M6	No agrupados		X	MSC
<i>CG5883</i>	M1	No agrupados			MSC
<i>CG11069</i>	M6	No agrupados		X	MSC
<i>Tsf1</i>	M1	Específico de R8			MSC
<i>CG13033</i>	M6	Enriquecidos en todos los tiempos		X	MSC
<i>CG32137</i>	M6	No agrupados	X	X	Citoesqueleto
<i>CG40485</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>CG5653</i>	M6	No agrupados			REDOX
<i>CG6421</i>	M1/M6	R8			Enzimas
<i>Scp2</i>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<i>CG30154</i>	M6	No agrupados		X	Otros
<i>Cpr49Ae</i>	M6	No agrupados	X	X	Otros
<i>CG10126</i>	M6	No agrupados			Otros
<i>CG17777</i>	M6	No agrupados			Otros
<i>CG14567</i>	M6	No agrupados			Otros
<i>CG13117</i>	M6	No agrupados			Otros
<i>CG1722</i>	M6	No agrupados			Otros

**Tabla 17. Genes candidatos del *screen* mediante RNAi, con función desconocida o sin líneas mutantes disponibles.** La tabla indica el tipo de fenotipo que produjo cada gen, el grupo de procedencia, la presencia de sitios putativos de unión para Sens y/o Pros y la categoría biológica a la que pertenecían. MSC: moléculas de superficie celular, REDOX: procesos de oxidación-reducción.





## Anexo 3: Validación del fenotipo con líneas mutantes viables

Gen	Mutante	% R8s post M3
<b>Tpr2</b>	<i>Tpr2<sup>Mi11295</sup>/Df</i>	3,74± 2,72
	<i>Tpr2<sup>Mi11295</sup>/+</i>	0,00± 0,00
	<i>Df/+</i>	1,45± 1,1
<b>Npc2b</b>	<i>Npc2b<sup>19</sup>/Df</i>	2,05± 2,04
	<i>Npc2b<sup>19</sup>/+</i>	0,80± 0,58
	<i>Df/+</i>	0,20± 0,20
<b>CG6026</b>	<i>CG6026<sup>M11998</sup>/Df</i>	0,00± 0,02
	<i>CG6026<sup>M11998</sup>/+</i>	0,01± 0,00
	<i>Df/+</i>	0,02± 0,02
<b>alphaPS5</b>	<i>alphaPS5<sup>MI01533</sup>/Df</i>	2,57± 2,05
	<i>alphaPS5<sup>MI01533</sup>/+</i>	0,11± 0,26
	<i>Df/+</i>	1,01± 0,92
<b>CG33178*</b>	<i>CG33178<sup>KG1042</sup></i>	0,67± 0,36
	<i>CG33178<sup>KG1042</sup>/+</i>	0,00± 0,00
<b>CG32521*</b>	<i>CG32521<sup>MI11815</sup></i>	1,22± 0,76
	<i>CG32521<sup>MI11815</sup>/+</i>	0,09± 0,20
<b>CG11686**</b>	<i>CG11686<sup>Mae-UAS.6.11.LA00195</sup>/Df</i>	0,80± 1,86
<b>CG2016**</b>	<i>CG2016<sup>MI04995</sup>/Df</i>	0,18± 0,42
<b>5-HT1B**</b>	<i>5-HT1B<sup>ΔIII</sup>/Df</i>	1,05± 0,88
<b>CG6218**</b>	<i>CG6218<sup>KG09249</sup>/Df</i>	1,07± 1,12
<b>CG32052**</b>	<i>CG32052<sup>MI02380</sup>/Df</i>	0,84± 0,56

**Tabla 18. Validación fenotípica de los genes candidatos mediante mutantes viables.** La tabla representa los genes que al validar el fenotipo con líneas mutantes no reprodujeron el fenotipo RNAi. Se indica el porcentaje medio del fenotipo post M3 y la desviación típica de la condición experimental (*Mutante/Df*), el control del mutante en heterocigosis (*Mutate/+*) y el control de la deficiencia en heterocigosis (*Df/+*). El porcentaje promedio del fenotipo se calculó en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180 μm en cada cerebro. \*: Genes localizados en el cromosoma X, por lo que su condición experimental consistía en machos que portaban la mutación en homocigosis y el control fueron hembras, estando así la mutación en heterocigosis. \*\*: Genes analizados en una primera ronda inicial, en los que al no haber detectado un fenotipo en la condición experimental, no se emplearon los controles de la mutación en heterocigosis ni el de la deficiencia en heterocigosis. Cerebros analizados, n= 6-8. Test estadístico: Kruskal-Wallis y T-Student, p-valor= 0,05.



## Anexo 4: Interacción genética con Sens

Gen	Genotipo	% R8s post M3
<b>esn</b>	<i>esn</i> <sup>f0047</sup> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	1,4± 0,59
	<i>Df 1 esn</i> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	2,3± 1,06
	<i>esn</i> <sup>f0047</sup> / <i>Df</i> ; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	4,6± 1,2
	<i>esn</i> <sup>f0047</sup> / <i>Df 1 esn</i>	4,5± 2,18
<b>AlphaPS5</b>	<i>alphaPS5</i> <sup>Mi01533</sup> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	0,9± 0,7
	<i>Df alphaPS5</i> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	3,4± 1,08
	<i>alpha</i> <sup>Mi01533</sup> / <i>Df</i> ; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	3,6± 0,78
	<i>alphaPS5</i> <sup>Mi01533</sup> / <i>Df alphaPS5</i>	2,6± 2,05
<b>Tpr2</b>	<i>Tpr2</i> <sup>Mi11295</sup> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	0,1± 0,28
	<i>Df Tpr2</i> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	2,6± 1,12
	<i>Tpr2</i> <sup>Mi11295</sup> / <i>Df</i> ; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	2,6± 1,71
	<i>Tpr2</i> <sup>Mi11295</sup> / <i>Df Tpr2</i>	3,7± 2,72
<b>Cyp31a1</b>	<i>Cyp31a1</i> <sup>f02301</sup> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	1,7± 1,12
	<i>Df Cyp31a1</i> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	0,8± 0,68
	<i>Cyp31a1</i> <sup>f02301</sup> / <i>Df</i> ; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	6,4± 2,05
	<i>Cyp31a1</i> <sup>f02301</sup> / <i>Df Cyp31a1</i>	5,5± 3,01
<b>Thor</b>	<i>Thor</i> <sup>2</sup> /+; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	0,59± 0,6
	<i>Thor</i> <sup>2</sup> ; <i>sens</i> <sup>E1</sup> /+	6,4± 3,24
	<i>Thor</i> <sup>2</sup> / <i>Df Thor</i>	4,5± 1,8

**Tabla 19. Interacción genética con Sens y los genes validados.** En la tabla se indican los genes validados y dos genes extra (*Tpr2* y *AlphaPS5*) en los que se testó la interacción genética con Sens. También se representan las moscas controles empleadas en cada caso, el fenotipo post M3 detectado en R8s (% promedio de R8s) y la desviación típica observada. El porcentaje promedio del fenotipo se calculó en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180µm en cada cerebro. Cerebros analizados, n= 4-7. Test estadístico: T-Student, p-valor= 0,05.



## Anexo 5: Interacción genética Esn-Fmi Opción 2

	% R8 en M1	% R8s post M3	% R8s en M6
<b><i>GMR</i></b>	1,4± 5,76	3,1± 1,62	1,2± 1,35
<b><i>esn<sup>KO6</sup>/Df 1; GMR</i></b>	1,4± 5,76	16,1± 2,9	7,5± 3,03
<b><i>GMR&gt;RNAi fmi</i></b>	65,6± 6,03	6,1± 3,43	23,6± 5,19
<b><i>esn<sup>KO6</sup>/+; GMR&gt;RNAi fmi</i></b>	80,5± 6,2	2,8± 1,02	12,4± 5,48
<b><i>Df 1/+; GMR&gt;RNAi fmi</i></b>	57,8± 16,81	1,5± 1,44	7,6± 3,68
<b><i>esn<sup>KO6</sup>/Df 1; GMR&gt;RNAi fmi</i></b>	78,7± 6,63	4,1± 2,57	13,1± 3,41

**Tabla 20. Interacción genética entre Esn y Fmi.** La tabla representa las moscas controles empleadas y las experimentales. Se indica el porcentaje promedio de cada fenotipo observado y la desviación típica. El porcentaje promedio del fenotipo se calculó en una cantidad de tejido comprendida entre 160 y 180  $\mu$ m en cada cerebro. Cerebros analizados, n= 6-8. Test estadístico: T-Student, p-valor= 0,05.



## Anexo 6: Genotipos

### RESULTADOS

**Figura 24. A.** *ken<sup>11035</sup>/+; w; ken<sup>11035</sup>/+; sens-Gal4,UAS-utrGFP/+ . ken<sup>11035</sup>/Df(2R)ken; w; ken<sup>11035</sup>/Df(2R)Chi[g230];sens-Gal4,UAS-utrGFP/+*. **B.** *ken<sup>11035</sup>/+; sens<sup>E1</sup>; w; ken<sup>11035</sup>/+; sens-Gal4, UAS-utrGFP/sens<sup>E1</sup> . ken<sup>11035</sup>/Df(2R)ken; sensE1: w; ken<sup>11035</sup>/Df(2R)Chi[g230];sens-Gal4,UAS-utrGFP/sens<sup>E1</sup>*.

**Figura 25. A.** *R8 WT: ey3.5flp(g5d); FRT-42B,Act5C-Gal80/FRT-42B ;sens-Gal4,UAS-utr-GFP/+ . R8 ken<sup>11035</sup>: ey3.5flp(g5d); FRT-42B,Act5C-Gal80/ken<sup>11035</sup>;sens-Gal4,UAS-utr-GFP/+*. **B.** *R8 WT: sens<sup>E1</sup>: ey3.5flp(g5d); FRT-42B,Act5C-Gal80/FRT-42B ;sens-Gal4,UAS-utr-GFP/sens<sup>E1</sup> . R8 ken<sup>11035</sup>: sens<sup>E1</sup>: ey3.5flp(g5d); FRT-42B,Act5C-Gal80/ken<sup>11035</sup>;sens-Gal4,UAS-utr-GFP/sens<sup>E1</sup>*.

**Figura 26. A.** *WT: 20C11FLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/CyO; GMR-Gal4,UAS-Dcr2/+*. **B.** *GMR>ken: 20C11FLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/CyO; GMR-Gal4,UAS-Dcr2/UAS-ken*.

**Figura 26. B.** Imagen izquierda: *sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/CyO; GMR-Gal4,UAS-Dcr2/10XUAS-mCD8GFP*. Imagen derecha: *w; Bl/CyO;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/10XUAS-mCD8GFP*. **D.** *w; Bl/CyO; LongGMR-Gal4/10XUAS-mCD8GFP*.

**Figura 28. A.** *Control: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/+;GMR-Gal4,UAS-Dcr2/+ . GMR>RNAi fra: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/+;GMR-Gal4,UAS-Dcr2/UAS-RNAifra(29909GD)*. **B.** *No Dcr2: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/+;GMR-Gal4 /UAS-RNAifra(29909GD)*.

**Figura 30.** *Control GD: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/UAS-WT;GMR-Gal4,UAS-Dcr2/UAS-WT*. *Control KK: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/UAS-WT;GMR-Gal4,UAS-Dcr2/UAS-WT*.

**Figura 31.** *Control GD Sistema Rh6 GMR-Gal4: w; +/CyO;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+*. *Control KK Sistema Rh6 GMR-Gal4: w; +/CyO;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+*. *Control GD Sistema STaR GMR-Gal4: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/+;GMR-Gal4,UAS-Dcr2/+*. *Control KK Sistema STaR GMR-Gal4: sensFLP(g5d); BRP-FSF-V5-LexA,LexAOp-myr-tdtom/+;GMR-Gal4,UAS-Dcr2/+*.

**Figura 34.** *WT: w; +/+; Rh6-GFP/+ . Esn Control Df: w; Df(2R) Df(2R)BSC262/+; Rh6-GFP/+ . Esn Control Mutante: w; esn<sup>KO6</sup>/+;Rh6-GFP/+ . Esn Mutante/Df: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; Rh6-GFP/+ . Cyp31a1 Control Df: w; Df(2R)BSC880/+; Rh6-GFP/+ . Cyp31a1 Control Mutante: w; Cyp301a1<sup>f02301</sup>/+;Rh6-GFP/+ . Cyp31a1 Mutante/Df: w; Df(2R)BSC880/Cyp301a1<sup>f02301</sup>; Rh6-GFP/+ . Thor Control Df: w; Df(2L)BSC292/+; Rh6-lacZ/+ . Thor Control Mutante: w; Thor<sup>2</sup>/+; Rh6-lacZ /+ . Thor Mutante/Df: w; Thor<sup>2</sup>/Df(2L)BSC292; Rh6-lacZ /+ . CG14397 Control Df: w; Df(2L)Exel7080/+; Rh6-GFP/+ . CG14397 Control Mutante: w; CG14397<sup>M104470</sup>/+; Rh6-GFP/+ . CG14397 Mutante/Df: w; CG14397<sup>M104470</sup>/Df(2L)Exel7080; Rh6-GFP/+*.

**Figura 36.** *CG14397<sup>M104470</sup>/+; sens<sup>E1</sup>/+; w; CG14397<sup>M104470</sup>/+; Rh6-GFP/sens<sup>E1</sup> . Df /+; sens<sup>E1</sup>/+; w; Df(2L)Exel7080/+; Rh6-GFP/sens<sup>E1</sup> . CG14397<sup>M104470</sup>/Df; sens<sup>E1</sup>/+; w; CG14397<sup>M104470</sup>/Df(2L)Exel7080; Rh6-GFP/sens<sup>E1</sup> . CG14397<sup>M104470</sup>/Df; w; CG14397<sup>M104470</sup>/Df(2L)Exel7080; Rh6-GFP/+*.



**Figura 40.** GstE11<sup>d06699</sup>: w; GstE11<sup>d06699</sup>/ GstE11<sup>d06699</sup>; Rh6-lacZ/+. GstE11<sup>d06699</sup>/+; w; GstE11<sup>d06699</sup>/+; Rh6-lacZ/+. Df a/+; w; Df(2R)BSC399/+; Rh6-lacZ/+. GstE11<sup>d06699</sup>/Df a; w; GstE11<sup>d06699</sup>/ Df(2R)BSC399; Rh6-lacZ/+. Df b/+; w; Df(2R)ED3683/+; Rh6-lacZ/+. GstE11<sup>d06699</sup>/Df b; w; GstE11<sup>d06699</sup>/ Df(2R)ED3683; Rh6-lacZ/+.

**Figura 44. A,B.** GMR>RNAi GstE11: w; UAS-RNAi GstE11(32843GD)/CyO;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. GMR>RNAi GstE11, Df GstE11: w; UAS-RNAi GstE11(32843GD)/Df(2R)BSC399;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. GMR>RNAi GstE11, GstE11<sup>d06699</sup>,Df GstE11: w; UAS-RNAi GstE11(32843GD), GstE11<sup>d06699</sup>/Df(2R)BSC399;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. **C. Control**: w; ap-Gal4/+; tub-Gal80<sup>TS</sup>/+. RNAi GstE11: w; ap-Gal4/UAS-RNAi GstE11(32843GD); tub-Gal80<sup>TS</sup>/+.

**Figura 47.** WT: w; +/+; Rh6-GFP/+. esn<sup>f00447</sup>/Df 1; Rh6-GFP: w; esn<sup>f00447</sup>/ Df(2R)BSC262; Rh6-GFP/+. esn<sup>KO6</sup>/Df 1;Rh6-GFP: w; esn<sup>KO6</sup>/ Df(2R)BSC262; Rh6-GFP/+. esn<sup>KO6</sup>/Df 1; Rh6-lacZ: w; esn<sup>KO6</sup>/ Df(2R)BSC262; Rh6-lacZ /+. esn<sup>KO6</sup>/Df 2; Rh6-lacZ: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)Exel6283; Rh6-lacZ /+.

**Figura 48.** GMR: w;+; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. esn<sup>KO6</sup>/Df 1: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; Rh6-lacZ /+. esn<sup>KO6</sup>/Df 1; esn: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; Rh6-lacZ /UAS-esn. esn<sup>KO6</sup>/Df 1; GMR: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. esn<sup>KO6</sup>/Df 1; GMR>esn: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ /UAS-esn.

**Figura 49.** GMR: w;+; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. fmi<sup>E59</sup>/+; w; Rh6-lacZ/+; fmi<sup>E59</sup>/+; fmi<sup>E59</sup>/+; GMR: w; +/+; fmi<sup>E59</sup>/GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ. GMR>RNAi esn: w; UAS-RNAi esn(32037GD)/CyO;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. GMR>RNAi esn; fmi<sup>E59</sup>/+; w; UAS-RNAi esn(32037GD)/CyO;GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/fmi<sup>E59</sup>.

**Figura 50.** GMR: w;+; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. GMR, esn<sup>KO6</sup>/Df 1: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/+. GMR>RNAi fmi: w; CyO/+; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/UAS-RNAi fmi. GMR>RNAi fmi, esn<sup>KO6</sup>/Df 1: w; esn<sup>KO6</sup>/Df(2R)BSC262; GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/UAS-RNAi fmi.

## ANEXOS

### Anexo 3

**Tabla 18.** Tpr2<sup>Mi11295</sup>/Df: w; Tpr2<sup>Mi11295</sup>/Df(2L)Exel7066; Rh6-GFP/+. Tpr2<sup>Mi11295</sup>/+; w; Tpr2<sup>Mi11295</sup>/+; Rh6-GFP/+. Df/+; w; Df(2L)Exel7066/+; Rh6-GFP/+. Npc2b<sup>19</sup>/Df: w; Rh6-GFP/+; Npc2b<sup>19</sup> /Df(3R)BSC616. Npc2b<sup>19</sup>/+; w; Rh6-GFP/+; Npc2b<sup>19</sup> /+; Df/+; w; Rh6-GFP/+; Df(3R)BSC616/+. CG6026<sup>M11998</sup>/Df: w; Rh6-lacZ/+; CG6026<sup>M11998</sup> /Df(3R)Exel6183. CG6026<sup>M11998</sup>/+; w; Rh6-lacZ/+; CG6026<sup>M11998</sup> /+; Df/+; w; Rh6-lacZ/+; Df(3R)Exel6183/+. alphaPS5<sup>Mi01533</sup>/Df: w; alphaPS5<sup>Mi01533</sup>/Df(2R)BSC785; Rh6-GFP/+. alphaPS5<sup>Mi01533</sup>/+; w; alphaPS5<sup>Mi01533</sup>/+; Rh6-GFP/+. Df/+; w; Df(2R)BSC785/+; Rh6-GFP/+. CG33178<sup>KG1042</sup>: CG33178<sup>KG1042</sup>/CG33178<sup>KG1042</sup>; Rh6-GFP/+. CG33178<sup>KG1042</sup>/+; CG33178<sup>KG1042</sup>/Y; Rh6-GFP/+;+. CG32521<sup>Mi11815</sup>. CG32521<sup>Mi11815</sup>/ CG32521<sup>Mi11815</sup>, Rh6-GFP/+. CG32521<sup>Mi11815</sup>/+; CG32521<sup>Mi11815</sup>/Y; Rh6-GFP/+;+. CG11686<sup>Mae-UAS.6.11.LA00195</sup>/Df: w; Rh6-GFP/+; CG11686<sup>Mae-UAS.6.11.LA00195</sup>/Df(3R)Exel8158. CG2016<sup>Mi04995</sup>/Df: w; Rh6-GFP/+; CG2016<sup>Mi04995</sup>/ Df(3R)Exel6143. 5-HT1B<sup>ΔIII</sup>/Df: w; HT1B<sup>ΔIII</sup>/Df(2R)Exel6068; Rh6-GFP/+. CG6218<sup>KG09249</sup>/Df: w; Rh6-GFP/+; CG6218<sup>KG09249</sup>/Df(3R)Exel6174. CG32052<sup>Mi02380</sup>/Df: w; Rh6-GFP/+; CG32052<sup>Mi02380</sup>/ Df(3L)BSC673.

### Anexo 4

**Tabla 19.** *esn*<sup>f0047</sup>/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *esn*<sup>f00447</sup>/ +; Rh6-GFP/ *sens*<sup>E1</sup>. *Df 1* *esn*/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Df*(2R)BSC262/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *esn*<sup>f0047</sup>/*Df*; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *esn*<sup>f00447</sup>/*Df*(2R)BSC262; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *esn*<sup>f0047</sup>/*Df 1* *esn*; w; *esn*<sup>f00447</sup>/*Df*(2R)BSC262; Rh6-GFP/+. *alphaPS5*<sup>MiO1533</sup>/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *alphaPS5*<sup>MiO1533</sup>/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Df alphaPS5*/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Df*(2R)BSC785/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *alpha*<sup>MiO1533</sup>/*Df*; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Df*(2R)BSC785/ *alphaPS5*<sup>MiO1533</sup>; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *alphaPS5*<sup>MiO1533</sup>/*Df alphaPS5*; w; *alphaPS5*<sup>MiO1533</sup>/*Df*(2R)BSC785; Rh6-GFP/+. *Tpr2*<sup>Mi11295</sup>/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Tpr2*<sup>Mi11295</sup>/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Df Tpr2*/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Df*(2L)Exel7066/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Tpr2*<sup>Mi11295</sup>/*Df*; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Tpr2*<sup>Mi11295</sup>/*Df*(2L)Exel7066; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Tpr2*<sup>Mi11295</sup>/*Df Tpr2*; w; *Tpr2*<sup>Mi11295</sup>/*Df*(2L)Exel7066; Rh6-GFP/+. *Cyp31a1*<sup>f02301</sup>/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Cyp31a1*<sup>f02301</sup>/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Df Cyp31a1*/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Df*(2R)BSC880/+; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Cyp31a1*<sup>f02301</sup>/*Df*; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Cyp31a1*<sup>f02301</sup>/*Df*(2R)BSC880; Rh6-GFP/*sens*<sup>E1</sup>. *Cyp31a1*<sup>f02301</sup>/*Df Cyp31a11*; *Cyp31a1*<sup>f02301</sup>/*Df*(2R)BSC880; Rh6-GFP/+. *Thor*<sup>2</sup>/+; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Thor*<sup>2</sup>/+; *sens*<sup>E1</sup>/Rh6-lacZ. *Thor*<sup>2</sup>; *sens*<sup>E1</sup>/+; w; *Thor*<sup>2</sup>/*Thor*<sup>2</sup>; *sens*<sup>E1</sup>/Rh6-lacZ. *Thor*<sup>2</sup>/*Df Thor*; w; *Thor*<sup>2</sup>/*Df*(2L)BSC292; Rh6-lacZ /+.

## Anexo 5

**Tabla 20.** *GMR*; w/+; *GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ*/+. *esn*<sup>KO6</sup>/*Df 1*; *GMR*; w; *esn*<sup>KO6</sup>/*Df*(2R)BSC262; *GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ*/+. *GMR*>*RNAi fmi*; w; *CyO*/+; *GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/UAS-RNAi fmi*. *esn*<sup>KO6</sup>/+; *GMR*>*RNAi fmi*; w; *esn*<sup>KO6</sup>/+; *GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/UAS-RNAi fmi*. *Df 1*/+; *GMR*>*RNAi fmi*; w; *Df*(2R)BSC262/+; *GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/UAS-RNAi fmi*. *esn*<sup>KO6</sup>/*Df 1*; *GMR*>*RNAi fmi*; w; *esn*<sup>KO6</sup>/*Df*(2R)BSC262; *GMR-Gal4,UAS-Dcr2,Rh6-lacZ/UAS-RNAi fmi*.

