



**Instituto de Biología y Genética Molecular – Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología
Universidad de Valladolid – CSIC**

***“Estudio del papel de las Lipocalinas en el crecimiento
axónico de neuronas de *Drosophila* cultivadas in vitro”***

**Trabajo Fin de Máster en Investigación Biomédica presentado
por:**

ALICIA DE SAN LUIS GONZÁLEZ

**Directores: Diego Sánchez
 M. Dolores Ganfornina**

JULIO DE 2012

INDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	3
1.1. Lipocalinas	3
1.2. Lipocalinas en artrópodos	4
1.3. Lazarillo y sus homólogos	6
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	10
1.5. Ataxias	11
1.6. Modelo de ataxia en <i>Drosophila melanogaster</i>	12
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	15
2.1. Organismo modelo	15
2.2. Cultivos primarios de neuronas de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2.2.1. Cultivos primarios de neuronas partiendo de cerebros de pupa	15
2.2.2. Cultivos primarios de neuronas partiendo de embriones	19
2.3. Inmunocitoquímica.....	21
2.4. Experimento de rescate en modelos de degeneración de motoneuronas de <i>Drosophila melanogaster</i> por acción de hATXIN1 ^{82Q}	23
<i>RESULTADOS</i>	27
3.1. Cultivo primario de neuronas de <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3.1.1. Partiendo de moscas en estadio pupa.....	27
3.1.2. Partiendo de moscas en fase embrionaria	29
3.2. Efectos de la lipocalina GLaz sobre motoneuronas de <i>Drosophila melanogaster</i> degeneradas por la acción de hATXIN1 ^{82Q}	30
<i>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</i>	32
4.1. Cultivos primarios de neuronas de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
4.2. Efectos de la lipocalina GLaz sobre motoneuronas de <i>Drosophila melanogaster</i> degeneradas por la acción de hATXIN1 ^{82Q}	32
<i>PERSPECTIVAS</i>	33
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	34

INTRODUCCIÓN

1.1. Lipocalinas

Las lipocalinas constituyen una superfamilia que cuenta con más de 40 proteínas identificadas y caracterizadas en bacterias, levaduras, plantas y animales. Fueron identificadas por primera vez en 1981 (Unterman, Lynch et al. 1981) a partir de la homología de secuencia de aminoácidos existente entre la alfa-2-microglobulina de rata y la beta-lactoglobulina bovina (revisado por Akerström, Borregaard et al. 2006).

Llama la atención su extraordinaria diversidad tanto a nivel de secuencia como de función, y su estructura altamente conservada.

La caracterización de estas proteínas se ha realizado partiendo de tres propiedades moleculares (revisado por Salier, Åkerström et al. 2004):

- La unión a sustancias hidrofóbicas pequeñas

- La unión a receptores celulares de superficie

- La formación de complejos con otras macromoléculas solubles

Las lipocalinas son proteínas de bajo peso molecular, unos 20kDa, siendo este peso variable según el patrón de glicosilación en cada caso.

Son proteínas simétricas, formadas por ocho láminas beta antiparalelas unidas a través de enlaces de hidrógeno, que dan lugar a un barril beta con estructura de cáliz dextrógiro y una cavidad interna recubierta por residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 1). Su estructura terciaria está estabilizada por hélices alfa con la participación de uno, dos o tres puentes disulfuro (revisado por Grzyb, Latowski et al. 2006).

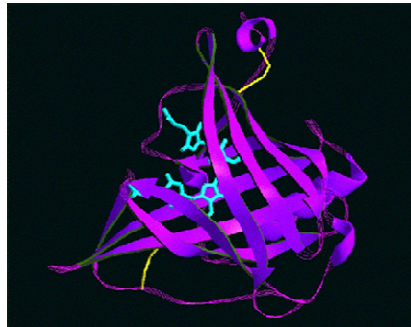


Figura 1. Estructura de una lipocalina en la que se observan las ocho láminas beta antiparalelas y un ligando hidrofóbico unido al bolsillo interno junto con los puentes disulfuro. Tomada de "Lipocalins", Akerström, Borregaard et al. 2006.

Su estructura secundaria, la terciaria y su distribución de exones-intrones están altamente conservadas (Sánchez, Ganfornina et al. 2003). Sin embargo la identidad de los aminoácidos es muy baja (15-30%), a pesar de lo cual se han encontrado pequeñas regiones en la secuencia primaria altamente conservadas (SRC), cuyo número varía entre lipocalinas y permite realizar una subdivisión entre las lipocalinas con tres SRC llamadas "kernel", y las que carecen de una o dos de dichas regiones y denominadas "outlier"(revisado por Flower 1996; revisado por Flower, North et al. 2000).

La mayoría de las lipocalinas son proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrofóbicas pequeñas. Están dirigidas al medio externo por un péptido señal localizado en el extremo amino-terminal. Este péptido es eliminado cuando la proteína llega al retículo endoplásmico para su exportación o directamente al exterior celular en el caso de las bacterias. Dentro de las lipocalinas no secretadas cabe destacar la proteína Lazarillo, la cual se encuentra anclada a la membrana plasmática de las neuronas a través de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ganforina, Sanchez et al. 1995).

Las lipocalinas tienen estructuras tridimensionales similares, sin embargo sus funciones son distintas debido principalmente a las diferencias en la cavidad interna a la que se une un ligando. De esta manera se pueden distinguir las siguientes funciones (revisado por Flower 1996; revisado por Akerström, Borregaard et al. 2006).

Inmunidad: La glicoproteína ácida (“acid glycoprotein”, AGP) es una lipocalina abundante en el plasma que se expresa en el hígado y se acumula en los lugares en los que se produce inflamación. Tiene diversas propiedades inmunoregulatoras, como por ejemplo la inhibición de la formación de agregados de plaquetas, de la activación de neutrófilos, y de la fagocitosis.

Unión a odorantes: Las “olfactory binding proteins” (OBPs) se unen a moléculas odorantes con una alta especificidad. Estas proteínas están relacionadas con el funcionamiento de epitelios olfatorios.

Unión a colorantes: La proteína unidora de bilinas (“bilin binding protein”, BBP), aparte de su función de pigmentación, actúa en la fotorrecepción y en la protección frente a radicales libres fotoinducidos.

Unión a feromonas: Las “mouse major urinary proteins” (MUP) se sintetizan en el hígado. Su expresión en dicho órgano influye en el desarrollo y control hormonal de diferentes tejidos, estimulando la producción de andrógenos. Las feromonas se unen a las MUPs y se segregan a la orina donde se desnaturalizan.

Actividad enzimática: La sintasa de prostaglandina D (PDGS) se sintetiza en el cerebro. Es la responsable de catalizar la conversión de prostaglandina H₂ a prostaglandina D₂. Se localiza en el plexo coroideo, en las meninges y en los oligodendrocitos y forma parte del fluido cerebroespinal. Dentro de los oligodendrocitos está asociada al retículo endoplásmico rugoso y a la membrana nuclear externa.

Unión a retinol: La “retinol binding protein” (RBP) transporta el retinol por el plasma desde los lugares de almacenamiento y producción como el hígado hasta los tejidos periféricos. Además controla la secreción de retinol y lo protege frente a la oxidación.

Señalización intercelular: Lazarillo neural (NLaz) regula la vía de señalización de la insulina aumentando la actividad de PI3K en las células del cuerpo graso (Hull-Thompson, Muffat et al. 2009).

1.2. Lipocalinas en artrópodos

Al igual que en mamíferos, en artrópodos también se distinguen varios tipos de lipocalinas. Todas ellas tienen una estructura común, son proteínas de una sola cadena polipeptídica que contiene aproximadamente 200 aminoácidos formando un barril beta en cuyo centro aparece

un bolsillo al cual se unen moléculas hidrofóbicas pequeñas. Habitualmente tienen dos hélices alfa, una en cada extremo, que se sitúan hacia el exterior del barril. Sin embargo, hay importantes diferencias entre unos tipos de lipocalinas y otros (Capítulo 6 revisado por Ganfornina, Kayser et al. 2006).

Al hacer un alineamiento de los aminoácidos se puede observar que los lazos L1, L4 y L6 del barril beta están altamente conservados, sin embargo el resto sufren variaciones significativas en su tamaño, lo cual repercute en la función desempeñada por cada lipocalina. Por ejemplo los lazos L3, L5 y L7 forman parte de la entrada hacia el bolsillo interno de la proteína, por lo que las variaciones en su tamaño condicionan las propiedades de unión de la lipocalina. En el caso del lazo L2 sus cambios pueden influir en las interacciones proteína-proteína ya que se encuentra en la parte cerrada del barril beta.

También existen variaciones en la longitud de los segmentos carboxilo y amino terminal. Partiendo de esta variabilidad la mayoría de las lipocalinas se pueden clasificar en tres grupos que difieren en la longitud del segmento carboxilo terminal que se encuentra tras el último residuo de cisteína. Las secuencias terminales más largas tienen una longitud que es aproximadamente igual a la señal de anclaje de la cola GPI presente en la proteína Lazarillo.

Existe también una gran variabilidad tanto en la longitud de los lazos como de las regiones terminales en las lipocalinas de artrópodos (Capítulo 6 revisado por Ganfornina, Kayser et al. 2006).

Comparando las secuencias de aminoácidos se ha construido un árbol filogenético (Figura 2) de las lipocalinas de artrópodos, incluyendo en él tanto las lipocalinas de cordados más relacionadas, como las lipocalinas pertenecientes a otros reinos como plantas u hongos (Capítulo 6 revisado por Ganfornina, Kayser et al. 2006).

En la base de este árbol se encuentra el grupo de proteínas relacionadas con Lazarillo, las cuales son las más cercanas a la apolipoproteína D de cordados y que representan a un extenso rango de especies. Un ejemplo representativo son las lipocalinas Lazarillo Neural y Lazarillo Glial de *Drosophila*, la primera expresada en un subconjunto de neuronas y neuroblastos y la segunda expresada en glía. A parte de este grupo de lipocalinas se pueden diferenciar otros cuatro:

- 1) Las lipocalinas presentes en garrapatas, con estructura muy similar a la de Lazarillo neural de *Drosophila*, que se expresan en glándulas salivares.
- 2) Las lipocalinas presentes en crustáceos, encontradas en langostas y cangrejos.
- 3) Las biliproteínas presentes en insectos. Al igual que en los crustáceos, aparece un máximo de dos lipocalinas de este tipo por especie.
- 4) Las nitroforinas, que se encuentran en las glándulas salivares. Sus funciones principales son transportar óxido nítrico, unirse a histamina y actuar como factores anti-coagulantes.

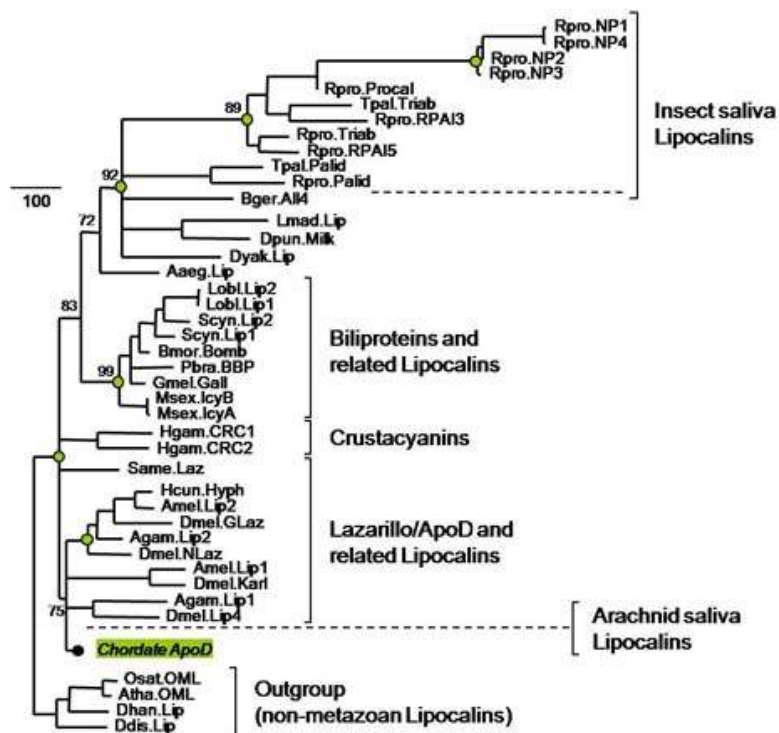


Figura 2 Árbol filogenético de las lipocalinas. (Capítulo 6 revisado por Ganfornina, Kayser et al. 2006)

1.3. Lazarillo y sus homólogos

En este trabajo nos vamos a centrar en la lipocalina Lazarillo por ser la más relacionada con ApoD y estar presente en *Drosophila melanogaster*, lo cual permite tener un modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

Durante el desarrollo embrionario las neuronas tienen que desarrollar sus conos de crecimiento a lo largo de rutas precisas recorriendo en muchos casos largas distancias. Esto tiene que ocurrir de una forma adecuada, ya que de lo contrario no habría un correcto desarrollo del sistema nervioso. ¿Qué factores se encargan de guiar a los conos de crecimiento en su avance? A lo largo de los años se han propuesto distintos modelos que incluyen tanto factores físicos como químicos, así como la necesidad de señales moleculares que hagan de guía (Taghert, Bastiani et al. 1982; Ganfornina, Sanchez et al. 1995). En un principio la familia de las lipocalinas parecía no estar implicada en guiar el crecimiento axonal, sin embargo el estudio de Lazarillo (Ganfornina, Sanchez et al. 1995) demostró la necesidad de esta proteína para el correcto crecimiento de las neuronas pioneras durante el desarrollo del sistema nervioso, además de para la formación del primer andamiaje axónico (revisado por Graf, Ludwig et al. 2000).

Lazarillo fue identificada en embriones de saltamontes (*Schistocerca americana*) utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido a proteínas neuronales embrionarias. De esta manera se estudió su expresión, la cual es más relevante en la membrana de un tipo de precursores neuronales, en neuroblastos y en neuronas postmitóticas que se encuentran a lo largo del sistema nervioso central, periférico y entérico del embrión. Cabe destacar la expresión transitoria de Lazarillo en los neuroblastos y en algunas neuronas que coincide con el periodo

de crecimiento axónico. Fuera del sistema nervioso se expresa en el sistema excretor del saltamontes, en células muy concretas (Sanchez, Ganfornina et al. 1995).

Caracterizando sus propiedades bioquímicas se pudo concluir que Lazarillo es una glicoproteína de 45 kDa (Sanchez, Ganfornina et al. 2000) unida a la parte externa de la membrana plasmática a través de un grupo glicosil-fosfatidilinositol, con enlaces disulfuro internos (Figura3).

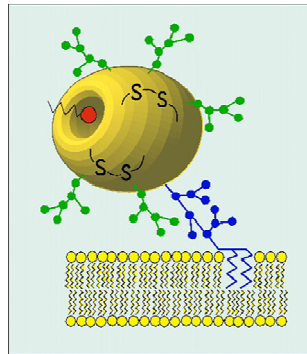


Figura 3. Representación esquemática de la estructura molecular de Lazarillo de saltamontes (Ganfornina, Sanchez et al. 1995).

Al caracterizar esta proteína se observaron similitudes de secuencia peptídica con las lipocalinas. Se conserva la estructura de barril beta junto con las hélices alfa, el patrón de cisteínas que forman los enlaces disulfuro, al igual que algunos aminoácidos que participan en la interacción de la proteína con pequeños ligandos hidrofóbicos. Por todo ello se clasifica Lazarillo dentro de la familia de las lipocalinas.

Sin embargo también tiene características propias no compartidas con las lipocalinas habituales, como es por ejemplo su extensa glicosilación, lo cual permite modular sus interacciones con otras moléculas de forma distinta. Por otra parte la cola de GPI que une Lazarillo a la membrana le impide ser transportador de moléculas hidrofóbicas, lo cual es la principal función de las lipocalinas. Por último su localización tan específica en un grupo de neuronas en desarrollo también le diferencia del resto de lipocalinas que habitualmente se expresan de manera más extensa en el sistema nervioso y se mantienen en adultos.

Usando un anticuerpo monoclonal contra Lazarillo se ha demostrado que es una lipocalina necesaria para el crecimiento axónico y para dirigir la trayectoria que toman los axones en embriones de saltamonte (capítulo 6 revisado por Ganfornina, Sanchez et al. 1995; Sanchez, Ganfornina et al. 1995; Ganfornina, Kayser et al. 2006).

La figura 4 muestra esquemáticamente la posible función biológica de Lazarillo (Sanchez, Ganfornina et al. 1995):

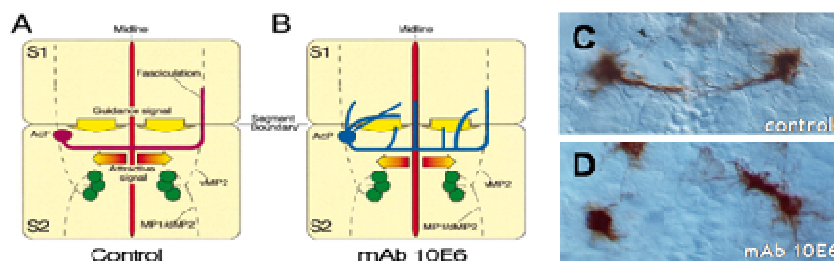


Figura 4. Crecimiento y guía axonal en presencia y ausencia de la función de Lazarillo en saltamontes. A-B. Representación esquemática del crecimiento axonal en situación control y cuando Lazarillo está funcionalmente bloqueado por el anticuerpo monoclonal 10E6 (mAb 10E6). En A se observa un crecimiento axónico normal, mientras que en B se muestran todas las rutas aberrantes posibles que tomar el axón si se bloquea Lazarillo con el anticuerpo. C. Neuronas pioneras tras 24 horas de cultivo del embrión *ex ovo* en condiciones control. El control muestra crecimiento normal de los axones hacia la línea media. D. Si se inhibe la función de Lazarillo o bien no se produce crecimiento axonal o el axón toma una vía incorrecta (Sanchez, Ganfornina et al. 1995).

Una vez caracterizado Lazarillo en el saltamontes se buscaron proteínas homólogas en otros organismos. Uno de estos modelos es *Drosophila melanogaster*, donde se ha confirmado la existencia de tres lipocalinas: Karl, Lazarillo Glial (GLaz) y Lazarillo Neural (NLaz). Gracias a estos estudios se han descubierto nuevas funciones de Lazarillo, como son la regulación de la duración de la vida, de la resistencia al estrés y de la neurodegeneración (Sanchez, López-Arias et al. 2006; Hull-Thompson, Muffat et al. 2009; Navarro, Ohmann et al. 2010). En principio, las funciones biológicas de Lazarillo y sus homólogos podrían ser dependientes o moduladas por los ligandos hidrofóbicos que pueden unir. Los ligandos que se unen al bolsillo interno de esta lipocalina son: ácido retinoico, grupos hemo y ácidos grasos. La unión a los dos primeros provoca un aumento en su movilidad electroforética, mientras que la unión a ácidos grasos promueve la formación de oligómeros (Sanchez, Ortega-Cubero et al. 2008).

La expresión de Karl varía según la etapa del desarrollo de la mosca. Durante el desarrollo embrionario se expresa en los plasmotocitos, mientras que durante la etapa larvaria lo hace en las glándulas linfáticas y en los hemocitos circulantes. La función de estas células es la de defensa frente a patógenos actuando como macrófagos y productores de péptidos antimicrobianos (capítulo 6 revisado por Ganfornina, Kayser et al. 2006).

Por otra parte tanto Lazarillo Neural como Lazarillo Glial se expresan en el sistema nervioso y tienen una secuencia de aminoácidos similar a Lazarillo de saltamontes, por lo que pueden considerarse sus homólogos en *Drosophila*.

Ambos contienen las tres secuencias SCR y se encuentran situados en el segundo cromosoma de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo hay una gran diferencia entre ellos ya que GLaz y NLaz no presentan la cola GPI, pero tienen un péptido señal en su extremo amino terminal por lo que se deduce que son proteínas secretadas al igual que las lipocalinas convencionales. GLaz y NLaz son también diferentes entre sí, mientras que GLaz tiene dos lazos especialmente largos localizados en la parte opuesta al bolsillo interno, que podrían influir en su interacción con ligandos u otras proteínas, NLaz se caracteriza por tener una región carboxilo terminal mucho más larga que la de las lipocalinas convencionales.

En cuanto a la expresión temporal, en ambos casos se observa el mismo patrón de expresión: Se expresan mucho durante la embriogénesis, principalmente cuando se está formando el sistema nervioso, tienen una expresión muy baja durante los estadios larvarios y muy alta en la fase pupa o metamorfosis. En la fase adulta cabe destacar el aumento de expresión en situaciones de estrés y durante el envejecimiento (revisado por Sánchez, Ganfornina et al. 2000).

También está caracterizada la expresión en tejidos de estas lipocalinas de *Drosophila*. GLaz y NLaz se expresan tanto en distintos subconjuntos celulares en el sistema nervioso central en desarrollo como fuera del sistema nervioso. GLaz se expresa en la glía longitudinal, en precursores gliales, durante el desarrollo del tubo digestivo y las glándulas salivares y en los hemocitos en la fase adulta. NLaz se expresa en un subconjunto de neuronas y neuroblastos, en el cuerpo graso y durante el desarrollo del tubo digestivo (revisado por Sánchez, Ganfornina et al. 2000).

Una vez caracterizadas estas dos nuevas lipocalinas, se procedió al estudio de sus funciones utilizando para ello modelos de pérdida de función o de sobre-expresión. Al contrario de lo

que se pudiera esperar la falta de estas lipocalinas durante el desarrollo no tiene efectos drásticos, sino que los procesos a los que más afecta se encuentran en la fase adulta de *Drosophila*.

Al generar mutantes de *Drosophila* con pérdida de función de GLaz se observa una sensibilización al estrés oxidativo y al ayuno, además de una disminución del periodo de vida de los machos. Por otra parte también se observa una reducción de la masa corporal debido a la disminución de lípidos acumulados en el cuerpo graso. Estos estudios se han realizado tras exponer moscas con distintos genotipos a dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat) o a peróxido de hidrógeno (Sanchez, López-Arias et al. 2006).

Si por el contrario se sobre-expresa de forma artificial GLaz se observa una disminución en los niveles de lípidos peroxidados, un aumento en la longevidad y la adquisición de resistencia frente a estrés oxidativo (Walker, Muffat et al. 2006). Lo mismo ocurre si en vez de sobre-expresar GLaz se sobre-expresa ApoD humana, lo cual se relaciona con enfermedades neurodegenerativas en las cuales los niveles de expresión de ApoD están incrementados (Muffat, Walker et al. 2008).

Por su parte la expresión de NLaz en el cuerpo graso podría indicar un papel en el control metabólico. Estudiando en *Drosophila* la ruta de señalización de la Jun-N-terminal kinase (JNK), la cual es importante en la respuesta metabólica al estrés, se ha observado que la transcripción de NLaz se encuentra inducida en el cuerpo graso en respuesta a la activación de JNK. Estos resultados sugirieron una regulación de la homeostasis metabólica por parte de NLaz.

Para comprobar esta hipótesis se realizaron medidas de carbohidratos y lípidos en mutantes NLaz-KO de *Drosophila*, observando una disminución en las reservas y una mayor sensibilidad al ayuno, además de disminuir la tolerancia al estrés oxidativo y la esperanza de vida. Si por el contrario se sobre-expresa NLaz se observa un aumento en las reservas de glicógeno, una disminución de los niveles de lípidos, unos niveles normales de glucosa en machos, y un aumento de todas las reservas en hembras. Por su parte también se observa un aumento en la esperanza de vida, lo cual reafirma el hecho de que los efectos de NLaz sobre la homeostasis metabólica y el estrés oxidativo son mecanismos adaptativos importantes para preservar las reservas energéticas.

En los genotipos en los que NLaz está sobre-expresado se observa una reducción en la actividad de la ruta de la insulina aumentando la actividad de PI3K en las células del cuerpo graso (Hull-Thompson, Muffat et al. 2009).

Por otra parte también se observa un aumento de la expresión de NLaz en *Drosophila* con una dieta alta en azúcares, estableciendo una relación de los mecanismos moleculares de resistencia a insulina entre *Drosophila* y humanos por lo que la mosca de la fruta puede ser un buen modelo para el estudio de diabetes tipo II (Pasco and Léopold 2012).

Una función común a GLaz y NLaz es la alteración que sufren los mutantes nulos de *Drosophila* en cuanto a longevidad. A partir de este hecho se han buscado diferencias entre machos y hembras llegando a la conclusión de que la falta de GLaz afecta solo a machos mientras que la falta de NLaz afecta a los dos sexos por igual. Esto se debe a que la expresión de estas lipocalinas en hembras es opuesta a lo largo de la vida, con la edad GLaz aumenta mientras que NLaz disminuye (Ruiz, Sanchez et al. 2011).

1.4. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

Drosophila melanogaster o mosca de la fruta es un artrópodo clasificado dentro de la familia Drosophilidae. Las poblaciones nativas se distribuyen a lo largo de las regiones templadas de todo el mundo alimentándose principalmente de fruta.

Es un organismo de pequeño tamaño y mucho más simple que los mamíferos, sin embargo tiene una gran utilidad en el estudio de vías de señalización, enfermedades neurodegenerativas, efecto de alcohol y drogas, envejecimiento... ya que conserva las vías moleculares fundamentales (Rubin, Yandell et al. 2000; Jeibmann and Paulus 2009).

Entre sus principales ventajas frente a otros modelos de estudio están: 1) su rápido tiempo de generación, aproximadamente 13 días a temperatura ambiente (Figura 5); 2) el alto número de prole obtenida en poco tiempo, ya que los adultos son fértiles poco después de nacer; 3) la facilidad con la que se pueden mantener en un laboratorio, pudiendo tener colecciones de muchos genotipos gracias a su pequeño tamaño y su fácil alimentación (Burdett and van den Heuvel 2004).

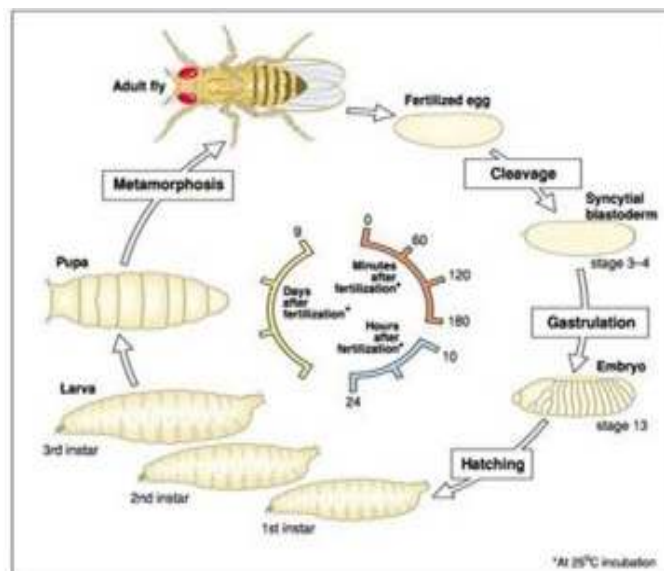


Figura 5. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

En cuanto a la anatomía de la mosca de la fruta es sencilla y bien conocida, pudiendo de esta forma diferenciar entre distintos mutantes, los cuales pueden ser por sobre-expresión o por falta de función en un gen. Si bien estas mutaciones se realizaban desde que se empezó a utilizar este organismo modelo, no fue hasta el año 2000 cuando se secuenció su genoma (Adams, Celniker et al. 2000) siendo el tercer modelo eucariótico en ser secuenciado. Esta circunstancia permitió apreciar más correctamente la influencia de *Drosophila melanogaster* como modelo para el estudio de enfermedades humanas (Celniker 2000).

Tanto la información genética como genómica de *Drosophila melanogaster* está recogida en bases de datos como por ejemplo "FlyBase" (Drysdale 2008).

Por otra parte la dotación cromosómica de *Drosophila melanogaster* es sencilla, se compone de dos autosomas largos, el cromosoma X y un cuarto cromosoma mucho más corto, por lo que se suele representar como $n=3+1$. Este reducido número de cromosomas hace más

sencilla la realización de estudios genéticos, junto con el hecho de que en los machos no se produzca recombinación, lo cual representa una ventaja desde el punto de vista práctico.

Por todas las razones expuestas anteriormente *Drosophila melanogaster* es utilizada como modelo de estudio para la búsqueda de modificadores genéticos que supriman o potencien un fenotipo determinado, como sucede por ejemplo en modelos de enfermedades neurodegenerativas.

1.5. Ataxias

La ataxia es un signo neurológico que consiste en la falta de coordinación de los movimientos musculares voluntarios, por falta de funcionalidad en las partes del sistema nervioso que coordinan el movimiento. Hay varios tipos de ataxia según afecten a una parte u otra del sistema nervioso (cerebelar, sensorial y vestibular), pero todas ellas son enfermedades neurodegenerativas progresivas. La mayoría de las ataxias son de herencia autosómica dominante (ej. ataxia espinocerebelosa), aunque también las hay de herencia recesiva (ej. ataxia de Friedreich) y otras que se desarrollan a partir de agentes externos como puede ser una lesión, sustancias exógenas (etanol), radiación, o deficiencia de vitamina B12. (Fredericks 1996).

La causa de las ataxias hereditarias como las ataxias espinocerebelosas (SCA) es la mutación de una serie de genes, en los que ocurre una expansión de tripletes de nucleótidos por la inestabilidad del DNA. La secuencia repetida suele ser CAG que codifica para la glutamina (Richards 2001). La repetición reiterada de este triplete provoca la producción de proteínas poliubiquitinadas de gran tamaño, que adquieren una conformación anómala acumulándose en el interior de las neuronas. Esta acumulación provoca un mal funcionamiento celular e incluso su muerte. Seis tipos de ataxia espinocerebelosa se han asociado con esta expansión, entre ellas SCA1 de la que hablaremos a continuación (revisado por Bauer and Nukina 2009; Lawlor, O'Keefe et al. 2012).

La ataxia espinocerebelosa tipo 1 o SCA1 está causada por una mutación dinámica en el gen "human ataxin 1" (hATXN1), que codifica para la proteína Ataxina-1. Esta proteína tiene un peso molecular de 87 kDa y consta de una sola cadena polipeptídica de entre 792 y 868 aminoácidos. Se encuentra en el citoplasma en tejidos no neuronales, en el núcleo de las neuronas del troncoencéfalo, la corteza y los ganglios basales y tanto en el citoplasma como en el núcleo de células mesencefálicas y células de Purkinje (Banfi, Servadio et al. 1994; Servadio, Koshy et al. 1995).

A pesar de que Ataxina 1 está extensamente expresada en el sistema nervioso central llama la atención que las patologías más frecuentes y severas se dan en las células de Purkinje del cerebelo, por lo que pueden tener una función crítica para ellas. Sin embargo con el avance de SCA1 la patología se observa en otras zonas del cerebro incluidas las neuronas del núcleo dentado, los núcleos olivares y los núcleos de los nervios craneales III, X y XII.

Tanto la aparición como el desarrollo de la enfermedad es dependiente del número de glutaminas en la región amino terminal, cuanto más glutaminada esté la proteína más temprano aparecen los primeros síntomas y más severos son. En cuanto a la patogénesis de

SCA1 se ha observado que los ratones deficientes de Ataxina 1 no presentan ataxia y tienen una vida media similar a los controles, sin embargo sí tienen afectadas funciones dependientes del cerebelo. A partir de estas observaciones se puede concluir que la falta de funcionalidad de Ataxina 1 no causa la enfermedad pero sí afecta a la funcionalidad de los circuitos neuronales más propensos a SCA1 (revisado por Zoghbi and Orr 2009).

En la bibliografía más reciente se describen cuatro características de la Ataxina 1 mutante que parece requerirse para que se desarrolle la SCA1 y que son: poliglutaminación, una secuencia de localización nuclear (NLS) funcional, el dominio AXH y una serina en el residuo 776 que pueda ser fosforilada (Orr 2012).

1.6. Modelo de ataxia en *Drosophila melanogaster*

Utilizando la mosca *Drosophila melanogaster* como organismo modelo se ha estudiado la posibilidad de que la lipocalina NLaz pudiera paliar los efectos que tiene Ataxina 1 sobre las motoneuronas.

En este organismo modelo existen un gran número de técnicas genéticas disponibles para el estudio de la expresión de distintos genes, tras inducir por ejemplo una degeneración en los fotorreceptores o en las motoneuronas.

Uno de los sistemas genéticos más utilizados es el GAL4-UAS (Brand and Perrimon 1993). Este sistema (Figura 6A) se basa en cruzar una mosca en la que se ha introducido el activador transcripcional de levaduras GAL4 bajo el control de un promotor, con una mosca en la que se ha insertado una secuencia reguladora ("upstream activating sequence" UAS) delante del gen que se quiere sobreexpresar (revisado por Jeibmann and Paulus 2009). En la progenie de este cruce estarán presentes los dos elementos, tanto el factor de transcripción como las secuencias a las que se une. Gracias a este sistema se logra que un determinado gen se exprese en los tejidos donde se expresa el activador transcripcional GAL4, en un momento determinado.

Este sistema se ha utilizado por ejemplo para analizar los efectos de Ataxina 1 sobre la capacidad motora de la mosca *Drosophila*, generando un fenotipo cuantificable mediante pruebas de escalada (Al-Ramahi, Pérez et al. 2007).

En nuestro laboratorio se ha replicado este fenotipo de locomoción deficiente para valorar el rescate de NLaz sobre motoneuronas afectadas por SCA1 (Figura 6B). Se llegó a la conclusión de que la sobre-expresión de NLaz en las motoneuronas no rescata este fenotipo, dado que aunque se produce una leve mejora esta es similar a la obtenida sobre-expresando una proteína control no relacionada (GFP). Estos experimentos se realizaron con el controlador nrv2:GAL4 que tienen un nivel intermedio de expresión en motoneuronas.

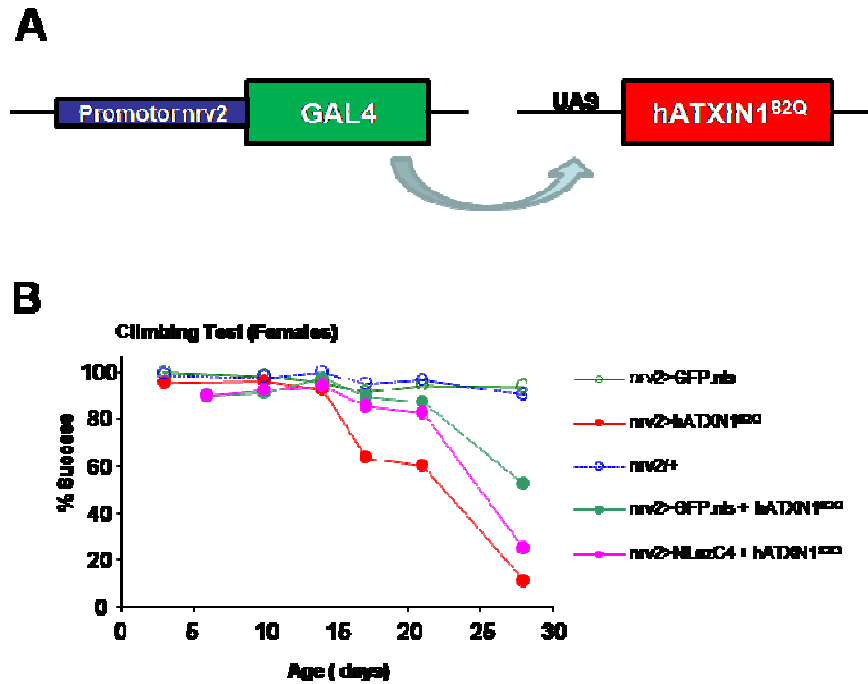


Figura 6. Modelo de SCA1 en *Drosophila melanogaster*. **A.** Esquema del sistema UAS-GAL4 utilizado para generar expresión de hATXN1^{B2Q} en motoneuronas mediante el controlador nrv2:GAL4. **B.** Fenotipo de locomoción deficiente causado por la degeneración de las motoneuronas (S. García y M.D. Ganfornina, resultados no publicados). En la prueba de escalada, las moscas control (nrv2/+ y nrv2>GFP.nls) escalan adecuadamente hasta edades avanzadas. Las moscas modelo de SCA1 tienen habilidades motoras muy disminuidas. La sobreexpresión simultánea de NLaz en las motoneuronas rescata sólo parcialmente este efecto y de forma no diferenciable del efecto producido por la sobre-expresión de la proteína control GFP.

El sistema UAS-GAL4 puede ser utilizado con promotores distintos a nervana. Si se usa D42:GAL4 la expresión en motoneuronas es mayor. Las motoneuronas tienen gran importancia tanto en la eclosión de la pupa como en la extensión de las alas de la mosca poco después de la eclosión. Utilizando este sistema con D42:GAL4 se ha encontrado en el laboratorio un fenotipo nuevo dependiente de la degeneración de motoneuronas (Manuela del Caño, Sanchez et al. 2010). Cuando el cruce se realiza a 25°C aproximadamente un 25-30% de la progenie no consigue eclosionar adecuadamente (Figura 7). Este fenotipo será explorado en mi proyecto para valorar si la sobre-expresión de las lipocalinas de *Drosophila* rescata la neurodegeneración que lo causa.

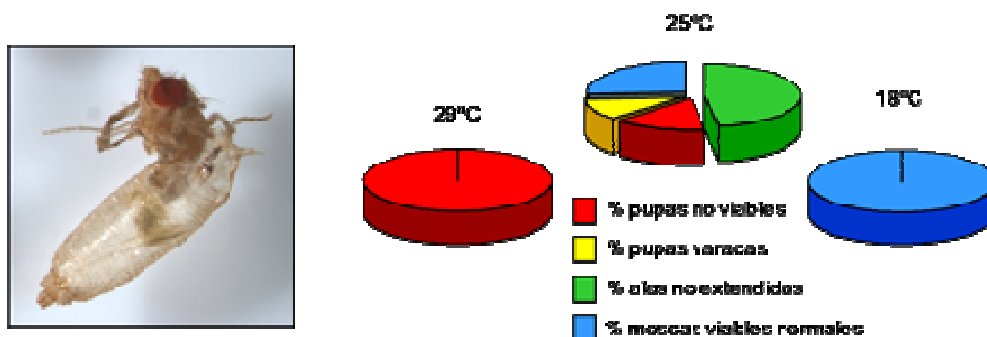


Figura 7. Fenotipos causados por la expresión de hATXN1^{B2Q} en motoneuronas mediante el controlador D42:GAL4 (del Caño et al., 2010). La penetrancia de esta modificación genética depende de la temperatura. Se detectan fenotipos de alas no extendidas y de eclosión deficiente (mosca no sale de la pupa total o parcialmente).

OBJETIVOS

Durante la realización de este proyecto he perseguido dos objetivos utilizando para cada uno de ellos unos conocimientos y unas técnicas distintas. Ambos van encaminados a descubrir cómo fenómenos tan aparentemente diferentes como la protección frente a la neurodegeneración y el crecimiento axonal durante el desarrollo pueden ser mediados por las lipocalinas relacionadas con Lazarillo.

OBJETIVO 1.

En primer lugar quiero estudiar el posible efecto de las lipocalinas GLaz y NLaz sobre el crecimiento axonal de neuronas de *Drosophila melanogaster*, ya que, como se ha comentado en la introducción, su homólogo Lazarillo en saltamontes juega un papel importante en dicho proceso además del servir de guía para el correcto crecimiento de los axones.

Para ello lo primero es poner a punto el cultivo primario de neuronas de *Drosophila* partiendo de cerebros de pupa o bien del embrión completo, para a continuación poder comparar el crecimiento axonal de distintos genotipos utilizados en el laboratorio.

OBJETIVO 2.

El segundo objetivo del proyecto es el de comprobar la acción de la lipocalina GLaz sobre moscas *Drosophila melanogaster* en las que se ha provocado la degeneración en las motoneuronas mediante la expresión del gen *hATXIN1*^{82Q}. Más concretamente quiero explorar los efectos sobre el fenotipo de eclosión deficiente observado previamente en el modelo de degeneración de motoneuronas. Este fenotipo es muy claro y pretendo comprobar los efectos de sobre-expresar GLaz en comparación con la sobre-expresión de la proteína control GFP.

De esta manera se puede deducir cuál es el efecto de esta lipocalina sobre las motoneuronas afectadas por la ataxia espinocerebelosa tipo 1

Para ello hay que generar las líneas de *Drosophila* necesarias de forma que se tengan todos los posibles genotipos, y poder cuantificar los efectos de la degeneración y el posible rescate por parte de GLaz.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Organismo modelo

En todos los experimentos realizados se ha utilizado la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Las líneas se mantienen en incubadores a 18°C o 25°C, según necesidad en la rapidez de desarrollo y proliferación, con una humedad del 60% y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Su alimentación se compone de: azúcar (84 g/l), levadura (84 g/l), agar (10 g/l), harina de trigo (42 g/l), zumo de manzana (167 ml/l) y ácido propiónico (5 ml/l).

2.2. Cultivos primarios de neuronas de *Drosophila melanogaster*

2.2.1. Cultivos primarios de neuronas partiendo de cerebros de pupa

Se han realizado dos variantes, en un primer momento se utilizaron cerebros extraídos de moscas en estadio de pupa y en una segunda etapa se realizaron los cultivos partiendo de embriones completos de *Drosophila*.

Para realizar el cultivo primario partiendo cerebros de pupa se tomó como referencia el protocolo "Primary Neuronal Cultures from the Brains of Late Stage *Drosophila* Pupae" (Sicaeros, Campusano et al. 2007).

El primer paso es el de preparar las soluciones y material necesario:

1. Solución de disección, la cual contiene: NaCl (Sigma) (137 mM), KCl (Sigma) (5,4 mM), Na₂HPO₄*12H₂O (Sigma) (0,17 mM), KH₂PO₄ (Sigma) (0,22 mM), HEPES (Cambrex) (10 mM), glucosa (Sigma) (33,3 mM), sacarosa (Sigma) (43,8 mM). Se conserva a 4°C.
2. Solución enzimática, cuya composición es la siguiente: L-cisteína (Santa Cruz sc-286072) (0,16 mg/ml), papaína liofilizada (Sigma P4762) (10 U/ml) en solución de disección. Se conserva a -20°C.
3. Medio de cultivo DDM2, el cual se compone de: DMEM (Lonza) suplementado con progesterona (Sigma P6149) (20 ng/ml), putrescina dihidroclorada (Sigma P5780) (100 μM), 20-hydroxyecdysone (Sigma H5142) (2,1 μM), suplemento insulina-transferrina-selenio (ITS supplement) (Sigma I1884) (1X). Las alícuotas de los suplementos se conservan a -20°C, mientras que el medio se mantiene a 4°C durante aproximadamente 4-5 días.
4. Cubreobjetos que se van a utilizar para la siembra de las células, recubiertos con concanavalina-A tipo IV (Sigma C2010) (167 μg/ml) y laminina (Sigma L2020) (1,75 μg/ml) en solución de disección. Las alícuotas de concanavalina-A, laminina y la mezcla de ambas se conservan a -20°C.

Tras la preparación de las soluciones necesarias se procede al cultivo de neuronas de pupa *Drosophila melanogaster* en estadios tardíos.

Protocolo inicial (Sicaeros et al 2007)

- 1) En una placa Petri de 35 mm (Nunc) se ponen dos gotas separadas de medio de disección en uno de los lados. A continuación se eligen las pupas de las que se quiere hacer el cultivo y una a una se van pasando a una zona seca de la placa Petri. La elección de las pupas se hace por criterio visual, tomando pupas blancas en las que se vea que tienen los ojos formados pero no las alas. Es más sencillo elegir pupas con color de ojos rojo. Estas características corresponden al estadio de 72 horas AFP ("after pupal formation").
- 2) Una vez que se tienen entre 4-5 pupas seleccionadas hay que diseccionar la cabeza, lo cual se hace en seco. Para ello se sujeta la pupa con las pinzas y se rompe con cuidado la parte delantera de la cutícula utilizando una jeringuilla con aguja de 25G. Una vez retirada la cutícula se hace un poco de presión sobre el cuerpo de la pupa con las pinzas y se ve que la cabeza sale con facilidad, de forma que es más sencillo separarla del resto del cuerpo. Una vez que se tiene la cabeza se trasvasa a la gota de medio de disección, y ahí se disecciona el cerebro.
- 3) Para obtener el cerebro de una pupa hay que poner la cabeza con los ojos hacia arriba y sujetarla por la proboscis. Se hace una hendidura en el ojo derecho y apretando en la zona del ojo izquierdo sale el cerebro por la hendidura realizada con los dos lóbulos y la parte central intacta.
- 4) Los cerebros en buenas condiciones que se vayan obteniendo se ponen en la gota de medio de disección limpia.
- 5) Una vez que se tienen todos los cerebros de los que se va a hacer el cultivo, que varían entre 2-3, se pasan a un eppendorf con 50 μ l de solución enzimática, utilizando para ello una pipeta en 10 μ l.
- 6) Los cerebros en la solución enzimática se incuban durante 10-15 minutos a 60 rpm y temperatura ambiente.
- 7) Se colocan 2 ml de medio DDM2 en una placa Petri de 35 mm en el incubador con CO₂ para que se equilibre y alcance el pH adecuado antes de utilizarlo para los lavados y la siembra.
- 8) Ya en el cuarto de cultivos se centrifugan los cerebros en la solución enzimática durante 3 minutos a 3000 rpm
- 9) Se sustituye la solución enzimática por 50 μ l de solución de disección estéril y se hacen 3 lavados de los cerebros centrifugando durante 3 minutos a 3000 rpm entre cada uno de ellos.
- 10) Se sustituye la solución de disección por 50 μ l de medio de cultivo DDM2 preequilibrado y se hacen dos lavados, centrifugando también entre cada lavado durante 3 minutos a 3000 rpm.
- 11) Los cerebros se pasan junto con el medio a una placa Petri de 35 mm.
- 12) Se prepararan tantas placas Petri con cubreobjetos como cerebros se tengan, pipeteando en el centro de cada cubreobjetos 5 μ l de medio DDM2 equilibrado.
- 13) Bajo la lupa se transfiere un cerebro a cada cubreobjetos utilizando una punta de 200 μ l.
- 14) Con dos jeringuillas de 25G se realiza una rotura de los cerebros en 3-4 pedazos.

- 15) A continuación, con una micropipeta de vidrio y por succión, se hace una disgregación mayor teniendo cuidado de que no sea excesiva. (Esta disociación mecánica tienen que ser hecha con la mayor rapidez posible ya que se puede alcalinizar el pH del medio DDM2).
- 16) Las células obtenidas se incuban a 37°C y 5%CO₂ durante 30 minutos.
- 17) Pasado este tiempo se añaden 1,5 ml de medio DDM2 en cada una de las placas con células, asegurándose de que el cubreobjetos queda bien sumergido.
- 18) Las células se mantienen en un incubador con 5% CO₂ y a 23°C.
- 19) Se cambia la mitad de medio de cultivo DDM2 (750 µl) a los cinco días.

Modificaciones

Se realizaron diversas pruebas de cultivos primarios utilizando *Drosophila melanogaster* de genotipo silvestre, siguiendo el protocolo original (Sicaeros, Campusano et al. 2007), sin embargo debido a los problemas de contaminación surgidos 48 horas después de realizar cada cultivo primario se fueron modificando las siguientes variables:

- 1) En un principio se utilizaba una micropipeta de vidrio para realizar la disgregación de los cerebros, teniendo que soplar a través de una punta de pipeta. Se probó a usar una pipeta con filtro en un tubo de plástico. Antes de esta operación se esterilizaban las micropipetas y el tubo con etanol y UV durante 30 minutos. Este proceso implica salir de la campana del cuarto de cultivos tras tener los cerebros en un medio de cultivo estéril. Para evitar estas posibles fuentes de contaminación se decidió realizar la disgregación mecánica en la campana del cuarto de cultivos utilizando una pipeta de 10 µl pipeteando con cuidado arriba y abajo aproximadamente 10 veces la dispersión celular contenida en un tubo eppendorf.
- 2) Uso de medio DDM2 con antibióticos 5% (penicilina + estreptomina). En estos casos se observaba una ralentización del crecimiento celular.
- 3) Trocear los cerebros en 3-4 pedazos antes de incubarlos en la solución enzimática. De esta forma se evita hacer la siembra fuera de la sala de cultivos ya que no se necesita una segunda lupa bajo la cual realizar la dispersión mecánica. Con esta variante quedan grumos celulares tras la siembra y no se observa crecimiento axónico.
- 4) Cambio de genotipo para comprobar si es un problema de las moscas silvestres, sin embargo sigue apareciendo contaminación.
- 5) Cambio de incubador por si pudiera ser el foco de contaminación, sin embargo también se contaminan tras 48 horas, por lo que se vuelve al incubador original en el cuarto de cultivos.
- 6) Preparación de nuevas soluciones de disección y enzimática.
- 7) Limpieza de las pupas con etanol 70% por si la contaminación viene arrastrada desde el principio con el material biológico de partida. Se comprueba que tampoco es el foco de contaminación.
- 8) Limpieza de las pupas con lejía por si los lavados con etanol no fueran suficientemente efectivos, sin embargo las células se mueren.
- 9) Cambio del medio de cultivo en el que se crían las moscas. Se realizó un cultivo con moscas provenientes de otro laboratorio (A. Ferrús, Instituto Cajal, Madrid), de

genotipo elav>GFP para comprobar si la contaminación provenía de la comida utilizada en el laboratorio. En estas pruebas las células no se contaminaron.

- 10) El índice de mortalidad aumentó en los cultivos provenientes de las moscas elav>GFP probablemente debido a la mayor sensibilidad de las células que expresan GFP tanto a la disgregación con la pipeta como a la alta temperatura del incubador, el cual ha llegado a tener fases de 28°C cuando la temperatura de incubación ideal para estas células es de 23°C. Dado que no se observó contaminación se decidió cambiar las moscas silvestres que se venían utilizando a una comida instantánea (Carolina Biological Supplies), la cual viene preparada para ser utilizada tras mezclarla con agua. Al volver a tener problemas de contaminación se pensó en la posibilidad de que el agua con el que se prepara la comida fuese el foco de contaminación, por lo que se hicieron cultivos paralelos de cerebros de moscas provenientes de tubos con comida instantánea de Carolina preparada con agua corriente y con agua destilada. En ninguno de los dos casos se observó contaminación, pero las células no sobrevivían más de 48 horas.
- 11) La concentración de solución enzimática es un factor crítico en un cultivo de este tipo, sobre todo si la enzima utilizada es papaína. Por ello se realizó un cultivo aumentando la concentración de enzimas, el cual no se contaminó pero las células no sobrevivieron.
- 12) Como se ha comentado anteriormente hay un problema de mortalidad celular que se relacionó con la alta temperatura del incubador, el cual era imposible mantener a la temperatura deseada dado que no contaba con sistema de refrigeración. Para poder utilizar el incubador en el que se mantienen las moscas, programable a 23°C, se buscó un medio de cultivo que no necesite estar equilibrado en atmósfera de CO₂. El medio de cultivo elegido fue Schneider (Gibco), el cual se preparó con los suplementos necesarios para el cultivo de neuronas de *Drosophila melanogaster* descritos anteriormente.

Al llegar a este punto se pensó que las fuentes más probables de contaminación de los anteriores cultivos son: el uso de micropipeta para la disgregación mecánica y la comida de las moscas.

Durante estas pruebas y cambios en el protocolo se observaron dos puntos importantes:

- 1) Si el cultivo celular no se contamina en 48 horas ya no surge contaminación. Se han mantenido cultivos durante 10 días sin contaminación.
- 2) Cuantas más células se obtienen y mejor aspecto tienen tras 24 horas mayor probabilidad de contaminación.

Protocolo final

Tras los cambios expuestos anteriormente el protocolo final utilizado fue el siguiente:

- 1-10) Los pasos del protocolo inicial del 1 al 10 se siguen de la misma manera. En la figura 8 se describe el proceso.



Figura 8. A. Pupa *Drosophila melanogaster*. B. Cabeza de *Drosophila melanogaster* tras su disección. C. Cerebro aislado.

- 11) Una vez terminados los lavados se retira la máxima cantidad de medio posible del eppendorf dejando los cerebros en el fondo, y con cuidado se añaden 5µl de medio DDM2 preequilibrado.
- 12) En una placa Petri de 35 mm se coloca un cubreobjetos recubierto con concanavalina-A y laminina en cuyo centro de pipetea una gota de 5µl de medio DDM2.
- 13) Con la pipeta en 5 µl se disgregan los cerebros pipeteando arriba y abajo aproximadamente 10 veces con cuidado. Esta manipulación se hace en la campana de flujo laminar sin ayuda de lupa binocular.
- 14) Se siembran las células en el centro del cubreobjetos, en la gota de medio colocada anteriormente y se incuban a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos.
- 15) Por último se añaden 1,5ml de medio DDM2 asegurándose de que el cubreobjetos queda bien sumergido.
- 16) Se puede comprobar bajo el microscopio que las células están bien adheridas a la superficie del cubreobjetos antes de colocarlas en el incubador a 5% CO₂ y aproximadamente 26°C.
- 17) Se cambia la mitad de medio de cultivo DDM2 (750µl) a los cinco días.

Siguiendo el protocolo descrito se realizaron varios cultivos. En un primer momento se consiguió un cultivo sin contaminación y en el cual las células sobrevivieron. Para comprobar la efectividad del método se realizaron nuevos cultivos tanto con moscas silvestres como con moscas *elav>GFP*, sin embargo se volvieron a tener problemas de contaminación.

2.2.2. Cultivos primarios de neuronas partiendo de embriones

Persiguiendo el objetivo de obtener cultivos neuronales de *Drosophila melanogaster*, el siguiente paso que se realizó fue el de utilizar embriones en vez de pupas. Para ello se siguió el protocolo descrito por (Sánchez-Soriano, Bottenberg et al. 2005) y modificado en 2012.

Las soluciones y material utilizado para realizar este cultivo es el siguiente:

- 1) Solución enzimática, la cual contiene colagenasa (Sigma C5138) (500 µl/ml) en la misma solución de disección preparada para los cultivos realizados a partir de pupas.
- 2) Medio de cultivo, cuya composición es medio Schneider (Gibco) suplementado con FBS (20%) y suplemento ITS (10X).
- 3) Placas Petri con medio de cultivo para recolección de huevos: Se preparan 400ml de medio (zumo de manzana (400 ml), agar (8 g), azúcar (20 g) y ácido propionico(2 ml), el cual se vierte sobre placas Petri llenándolas aproximadamente

hasta la mitad, y se deja enfriar hasta su solidificación. Una vez frías se guardan en la cámara fría a 4°C.

- 4) Cámaras de cultivo Mattek que consisten en una placa petri de 35 mm de diámetro con un pocillo central cuyo fondo es un cubreobjetos de 14 mm con recubrimiento de poly-d-lysine.

Tanto la solución enzimática como el medio de cultivo se prepararon de forma distinta pero similar a la propuesta en el protocolo original, según la disponibilidad de material en el laboratorio en ese momento.

Para realizar este cultivo se necesitan embriones de estadio 11, es decir, de 6-7 horas de desarrollo (Figura 9). Este estadio es en el que se han terminado de formar los neuroblastos, las células madre neuronales.

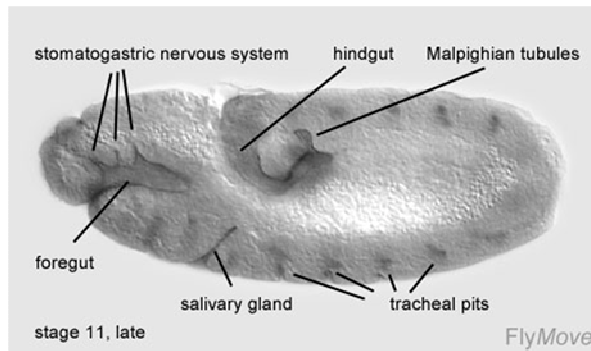


Figura 9. Fotografía de un plano mediosagital de un embrión de *Drosophila melanogaster* de estadio 11 teñido con un anticuerpo anti-crumbs que marca estructuras de origen epidérmico. Imagen obtenida de <http://flymove.uni-muenster.de/Stages>

La obtención los embriones en el momento preciso y la realización del cultivo tienen las siguientes etapas:

- 1) Para la puesta de huevos se utiliza un vial (Figura 10) en cuya base se coloca una placa con medio y una pasta de levadura fresca para estimular la puesta. En dicho tubo se introducen las moscas, en este caso silvestres, y se guardan en oscuridad hasta 6-7 horas después.



Figura 10. Vial utilizado para realizar la puesta de huevos de *Drosophila melanogaster*.

- 2) Tras este tiempo se sustituye la placa en la que están los huevos por una placa con comida limpia en la cual no es necesario poner levadura si no se va a realizar otra recolección de huevos.

- 3) Con un pincel se van recogiendo los huevos de la placa y se ponen en un tamiz, el cual se introduce en un vaso de precipitados conteniendo lejía diluida 1:1 en agua durante 5 minutos para la descorionización de los huevos.
- 4) Durante este tiempo se prepara un eppendorf con 30 μ l de medio de cultivo.
- 5) Pasados los 5 minutos se limpian los huevos con agua, se cogen aproximadamente 30 huevos con el pincel y se transfieren al eppendorf con el medio de cultivo.

A partir de esta etapa el protocolo continúa en el cuarto de cultivos utilizando soluciones estériles:

- 6) Se retira el medio de cultivo con cuidado y se sustituye por 500 μ l de etanol 80%.
- 7) Se retira el etanol y se lavan los huevos con 100 μ l de medio de cultivo.
- 8) Se sustituye el medio de cultivo por 100 μ l de solución enzimática y se homogeniza utilizando un émbolo estéril. En esta etapa hay que tener cuidado de que los embriones no se queden pegados al émbolo o a la pared del eppendorf ya que si no se libera bien todo su contenido, no se obtienen suficientes células y quedan restos del huevo en el cultivo.
- 9) Una vez realizada la homogeneización se incuba a 37°C durante 5 minutos.
- 10) Pasado este tiempo se añade la solución enzimática por 200 μ l de medio de cultivo para parar la reacción y se centrifuga durante 4 minutos a 2000 rpm.
- 11) Se obtiene un precipitado celular en el fondo del eppendorf. Con cuidado se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en 30 μ l de medio de cultivo por cada cámara de cultivo que se vaya a utilizar. En este caso se utilizaron dos cámaras de cultivo por lo que las células se resuspendieron en 60 μ l de medio.
- 12) Se pipetea 30 μ l de suspensión en el centro de cada cámara y se procede al sellado del pocillo en el que se encuentran las células.
- 13) Para sellar dicho pocillo se añade vaselina con una jeringuilla alrededor del cubreobjetos donde está la gota con células. A continuación se esteriliza un cubreobjetos de 20 mm de diámetro, impregnándolo en acetona y flameándolo, y se sitúa encima de la gota de medio con cuidado de no formar burbujas de aire.
- 14) Se sitúan las cámaras en el incubador a 23°C sin iluminación y con el cubreobjetos donde se depositaron las células orientado hacia abajo para evitar que se adhieran al sustrato los restos celulares.
- 15) Tras una hora y media se giran las cámaras de cultivo devolviéndolas a su posición inicial y se cultivan las células durante 12-16 horas.

2.3. Inmunocitoquímica

Los cultivos neuronales descritos anteriormente se realizaron directamente sobre un cubreobjetos, por lo que no hay etapa de tripsinización y siembra antes de realizar la inmunocitoquímica.

En el caso del cultivo de neuronas de embriones hay que retirar el cubreobjetos superior deslizándolo por la vaselina hasta dejar un agujero por el cual se pueda introducir la punta de la pipeta.

En el caso del cultivo de neuronas de pupa se transfiere el cubreobjetos a un pocillo de una placa de cuatro pocillos.

A partir de este punto las etapas que se han seguido en ambos caso son comunes y están descritas a continuación:

- 1) Las células se fijan utilizando 200 μ l de formaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos.
- 2) Se retira el formaldehído y se lava tres veces con PBT (PBS con 0,1% Tween20 durante 5 minutos cada vez. En el caso de las células provenientes de embrión, tras estos lavados se retira por completo el cubreobjetos superior que se había colocado encima de las células.
- 3) Se retira el PBT y se bloquea la preparación con 100 μ l (500 μ l si es un pocillo) de suero de cabra al 1% en PBT durante 30 minutos.
- 4) Se retira el bloqueo y se añaden 200 μ l de anticuerpo primario 22C10 (en una dilución 1:1000). Este es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina de *Drosophila melanogaster* específico para el citoesqueleto de neuronas. Se incuba durante dos horas a temperatura ambiente.
- 5) Pasado el tiempo se retira el anticuerpo primario y se lava con PBT tres veces durante 5 minutos cada lavado.
- 6) Se pone el anticuerpo secundario, 200 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (1:1000 en PBT), y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente protegido de la luz para que no se pierda fluorescencia. El Cy3 (cyanine 3) es un fluoróforo que produce fluorescencia en rojo.
- 7) Tras este tiempo se retira el anticuerpo secundario y se lava dos veces con PBT y una con agua destilada.
- 8) Se prepara una dilución 1:10 de la solución de montaje Vecta-Shield con DAPI en agua destilada.
- 9) El método de montaje para ver las células marcadas bajo el microscopio de fluorescencia es distinto en cada caso.

Para las células provenientes de pupa se añade el Vecta-Shield sobre las células, se coge el cubre con unas pinzas por una zona donde no haya células y se coloca con la superficie celular hacia abajo sobre un portaobjetos sin que aparezcan burbujas de aire. Por último se sella con laca de uñas.

Por otro lado, para las células provenientes del embrión que se cultivaron en una cámara de cultivo se añaden 150 μ l de Vecta-Shield en el centro de la cámara y se coloca un cubreobjetos de 20 mm de diámetro (como los utilizados para el cultivo) con cuidado de que no se formen burbujas ni se salga líquido por los laterales. Al igual que en el caso anterior se hace un sello utilizando laca de uñas. Antes de añadir el Vecta-Shield se puede retirar la vaselina que hay por los bordes con un trozo de papel con cuidado de no tocar las células.

- 10) Bajo el microscopio de fluorescencia se identifican las células de interés, observando los núcleos de todas las células presentes en el cultivo en azul debido a la tinción con DAPI, y los conos de crecimiento y los axones de las neuronas en rojo gracias al fluorocromo Cy3 del anticuerpo secundario unido al anticuerpo 22C10 específico de neuronas. Su antígeno se expresa tanto en el sistema nervioso central como periférico en neuronas postmitóticas desde justo antes de la axonogénesis (Hummel et al 2000).

El procesamiento de estas imágenes se puede realizar utilizando diferentes herramientas informáticas como por ejemplo el programa “ImageJ”, el cual se ha utilizado en este caso.

2.4. Experimento de rescate en modelos de degeneración de motoneuronas de *Drosophila melanogaster* por acción de hATXIN1^{82Q}

Para el desarrollo de estos experimentos es necesario hacer cruces con moscas vírgenes de los genotipos que nos interesan para generar los genotipos de los cuales se quiere analizar su fenotipo de eclosión. La recogida de vírgenes se realiza preferentemente a primera hora de la mañana ya que es el momento en el que la eclosión de las pupas es mayor y las moscas aún no se han desarrollado sexualmente.

Las líneas parentales utilizadas para realizar los cruces llevan balanceadores cromosómicos (Figura 11).

$\begin{matrix} + & D42:GAL4 \\ w^+ & \\ + & D42:GAL4 \end{matrix}$	Parental homocigoto para el controlador GAL4 (en el cromosoma 3)
$\begin{matrix} UAS:GLaz & UAS:hATXIN1 \\ w^+ & \\ CyO & TM6B \end{matrix}$	Doble heterocigoto para los elementos controlados: GLaz (cromosoma 2) y hATXIN1 ^{82Q} (cromosoma 3)
$\begin{matrix} UAS:GFP & UAS:hATXIN1 \\ w^+ & \\ CyO & TM6B \end{matrix}$	Doble heterocigoto para los elementos controlados: GFP (cromosoma 2) y hATXIN1 ^{82Q} (cromosoma 3)

Figura 11. Genotipos de las moscas que se usaron como generación parental para generar modelos de SCA1 con sobre-expresión de GLaz o de la proteína control GFP.

Los balanceadores cromosómicos se utilizan para evitar la recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis. Contienen siempre un alelo recesivo letal por lo que un organismo con dos copias de un balanceador no sobrevive. Tienen además un alelo viable con fenotipo morfológico dominante para identificar su presencia cuando están en heterocigosis. Los marcadores dominantes presentes en los balanceadores usados fueron Curly (CyO) y Tubby (Tb). Las moscas CyO se identifican porque el extremo de sus alas está doblado hacia arriba, mientras que las moscas Tb se identifican desde la pupa que es más pequeña y gruesa y en moscas adultas porque tienen un número adicional de quetas en el tórax (Figura 12).

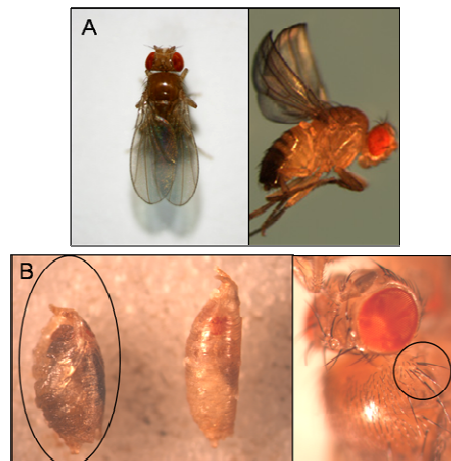


Figura 12. Fenotipo de marcadores dominantes presentes en los cromosomas balanceadores frente a moscas sin dichos balanceadores. **A.** Fenotipo Curly (Cy). **B.** Fenotipo Tubby (Tb).

Para generar estos genotipos se ha utilizado el sistema genético UAS-GAL4. Como promotor se ha utilizado D42 ya que se expresa en motoneuronas, de cuyo buen funcionamiento depende la correcta eclosión de la pupa. Con este sistema se ha sobre-expresado la proteína GFP, utilizada a modo de control, y la lipocalina GLaz, de la cual quiero estudiar sus efectos sobre motoneuronas degeneradas

Los cruces realizados fueron los siguientes:

CRUCES A (Figura 13): Donde toda la progenie no Tb sobre-expresa hATXIN1^{82Q} en las motoneuronas y además expresan o no GFP.

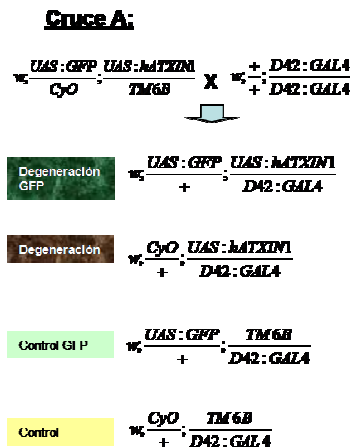


Figura 13

CRUCES A' (Figura 14): Además de sobre-expresar hATXIN1^{82Q} en las motoneuronas en la progenie aparece GLaz para estudiar el porcentaje de rescate que provoca este último gen sobre la degeneración de las motoneuronas.

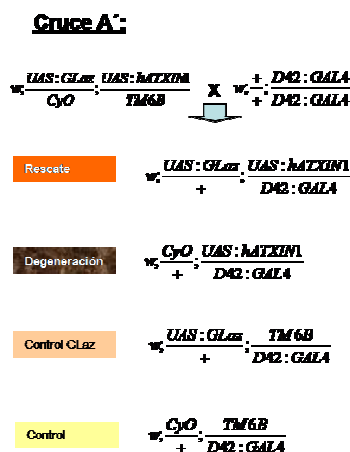


Figura 14

CRUCE B (Figura 15): En este caso se usan parentales homocigotos (sin balanceadores cromosómicos). El 100% de la progenie sobre-expresa hATXIN1^{82Q} y GFP en las motoneuronas.

Cruce B:

$$w_1 \frac{UAS:GFP}{UAS:GFP}; \frac{UAS:hATXIN1}{UAS:hATXIN1} \times w_2 \frac{+; D42:GALA}{+; D42:GALA}$$

Degeneración GFP

$$w_1 \frac{UAS:GFP}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$$

Figura 15

CRUCE B' (Figura 16): Al igual que en el caso anterior no se usan balanceadores cromosómicos. Se obtiene un 100% de progenie con sobre-expresión de hATXIN1^{82Q} y GLaz en las motoneuronas.

Cruce B':

$$w_1 \frac{UAS:GLaz}{UAS:GLaz}; \frac{UAS:hATXIN1}{UAS:hATXIN1} \times w_2 \frac{+; D42:GALA}{+; D42:GALA}$$

Rescate

$$w_1 \frac{UAS:GLaz}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$$

Figura 16

CRUCE C (Figura 17): En este caso se usan moscas parentales que tienen el balanceador del tercer cromosoma (Tb). En la progenie las moscas no Tb sobre-expresan hATXIN1^{82Q} y GFP en las motoneuronas.

Cruce C:

$$w_1 \frac{UAS:GFP}{UAS:GFP}; \frac{UAS:hATXIN1}{TM6B} \times w_2 \frac{+; D42:GALA}{+; D42:GALA}$$

Degeneración GFP

$$w_1 \frac{UAS:GFP}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$$

Control GFP

$$w_1 \frac{UAS:GFP}{+}; \frac{TM6B}{D42:GALA}$$

Figura 17

CRUCE C' (Figura 18): Al igual que en el caso anterior al usar parentales sin balanceador en el tercer cromosoma se obtiene una progenie en la que las moscas no Tb sobre-expresan hATXIN1^{82Q} y GLaz en las motoneuronas.

Cruce C':

$$w_1 \frac{UAS:GLaz}{UAS:GLaz}; \frac{UAS:hATXIN1}{TM6B} \times w_2 \frac{+; D42:GALA}{+; D42:GALA}$$

Rescate

$$w_1 \frac{UAS:GLaz}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$$

Control GLaz

$$w_1 \frac{UAS:GLaz}{+}; \frac{TM6B}{D42:GALA}$$

Figura 18

CRUCE D (Figura 19): Se generan moscas con dos genotipos. En ambos se sobre-expresa hATXIN1^{82Q} en motoneuronas combinada con la sobre-expresión de GFP o sin ella (moscas con el balanceador CyO).

Cruce D:

$$w_1 \frac{UAS:GFP}{CyO}; \frac{UAS:hATXIN1}{UAS:hATXIN1} \times w_2 \frac{+}{+}; \frac{D42:GALA}{D42:GALA}$$

Degeneración GFP $w_1 \frac{UAS:GFP}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$

Degeneración $w_1 \frac{CyO}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$

Figura 19

CRUCE D' (Figura 20): Se obtienen las mismas combinaciones que en el caso anterior pero sustituyendo el gen GFP por GLaz.

Cruce D':

$$w_1 \frac{UAS:GLaz}{CyO}; \frac{UAS:hATXIN1}{UAS:hATXIN1} \times w_2 \frac{+}{+}; \frac{D42:GALA}{D42:GALA}$$

Rescate $w_1 \frac{UAS:GLaz}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$

Degeneración $w_1 \frac{CyO}{+}; \frac{UAS:hATXIN1}{D42:GALA}$

Figura 20

Una vez que se tienen los cruces establecidos se cambian a los padres a nuevos viales de cultivo de forma sucesiva (tres pases) de forma que se obtengan tres muestras de progenie a distintos tiempos y se puedan comparar varias observaciones. El intervalo entre pases tiene que ser tal que se evite la mezcla entre progenies de los padres y los hijos, entre 1-7 días.

Para recoger datos registramos el número de pupas no Tb eclosionadas vs no eclosionadas tras aproximadamente 12 días de desarrollo, tiempo medio del ciclo biológico de *Drosophila melanogaster*. Hayan eclosionado o no las pupas permanecen pegadas a la pared del tubo en el que se encuentran las moscas, por lo que el contaje es sencillo siempre y cuando se inmovilice a los adultos nacidos en dicho vial. La inmovilización se realiza mediante CO₂. Se vacía el tubo sobre una superficie porosa a la que le llega CO₂ al 5% procedente de una bala y en un corto espacio de tiempo las moscas están anestesiadas.

Por un accidente técnico una de las muestras de progenie obtenida no pudo ser cuantificada, por lo que el estudio cuenta al final con dos muestras por cada tipo de cruce realizado.

Tanto las moscas vírgenes como los cruces se mantuvieron a 25°C durante todo el experimento.

RESULTADOS

3.1. Cultivo primario de neuronas de *Drosophila melanogaster*

3.1.1. Partiendo de moscas en estadio pupa

La puesta a punto del cultivo fue más problemática de lo que se pensó en un principio. Como se ha descrito en la sección de “Materiales y métodos” hubo que realizar diversos cambios en el protocolo inicial debido a problemas de contaminación tanto por bacterias como por hongos, y posteriormente por problemas de supervivencia de las células.

A continuación se comentan los resultados más representativos de los cultivos primarios realizados a lo largo de estos meses. Se realizaron un total de 26 cultivos a partir de 1-4 cerebros de pupa cada uno.

En el primer cultivo primario realizado a partir de pupa no se obtuvieron células posiblemente debido a que las concentraciones de los componentes tanto de la solución de disección como de la solución enzimática no eran correctas. Por un error en el protocolo original, donde la especificación de las concentraciones de soluciones madre concentradas en relación a las soluciones de trabajo, deduje que había trabajado en soluciones hipoosmóticas.

Una vez preparadas soluciones con las concentraciones adecuadas se realizaron una serie de cultivos (Figura 21) los cuales, como se muestra en la figura 21B sufrieron contaminación a las 48 horas (“days in vitro” (DIV) 2).

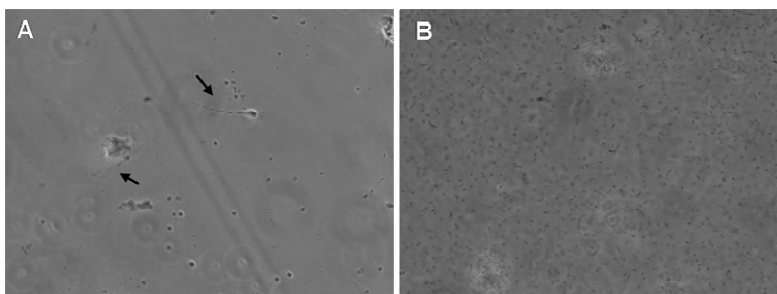


Figura 21. A. Cultivo de neuronas de estadio pupa de *Drosophila melanogaster* silvestre. A. 24 horas *in vitro* (1 DIV). Las flechas señalan neuritas en crecimiento. B. Mismo cultivo tras 48 horas *in vitro* (2 DIV). Se observa contaminación por bacterias.

Asumiendo que la procedencia de la contaminación estaba relacionada con el proceso se decidió añadir antibiótico al medio de cultivo. Tras 2 DIV no se observa contaminación bacteriana y sí células birrefringentes algunas de ellas con principio de prolongación axónica, por lo que se mantiene el cultivo en incubación. Sin embargo, esta modificación del protocolo no resultó práctica, porque las neuritas observadas paraban su crecimiento. Sin embargo tras 5 DIV aparece contaminación fúngica que prolifera rápidamente aún añadiendo antibiótico con antifúngico.

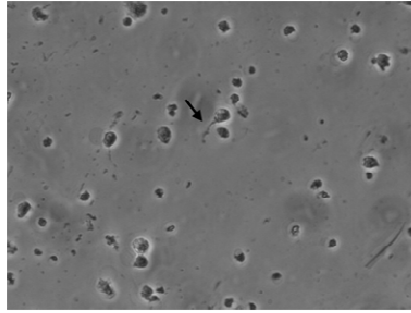


Figura 22. Cultivo primario realizado a partir de tres cerebros de pupa tras 48 horas *in vitro* utilizando antibióticos. La flecha señala una neurita cuya longitud no había cambiado entre 24 y 48 horas *in vitro*.

Se realizan dos cultivos más añadiendo antibióticos al medio de cultivo y se sigue observando un crecimiento enlentecido o nulo de los axones respecto a cultivos realizados utilizando medio de cultivo sin antibióticos. Debido a este hecho se decide volver a utilizar medio de cultivo sin antibióticos pero añadiendo estos tras 1 DIV. De esta forma se evita la contaminación tras 2 DIV, y se observa crecimiento de los axones (Figura 23), el cual es más apreciable entre los DIV tres y cuatro.

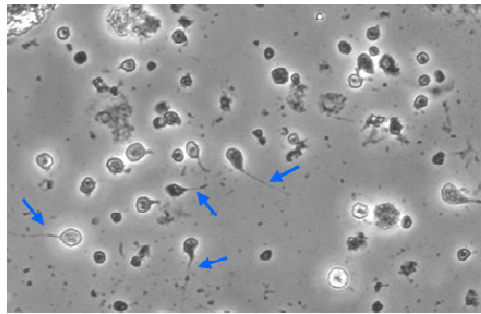


Figura 23. Cultivo de neuronas de estadio pupa de *Drosophila melanogaster* silvestre tras 5 DIV. Se observan prolongaciones axonales. Magnificación 20x

Para confirmar la identidad de las células observadas en este último cultivo realicé un experimento de inmunocitoquímica (Figura 24). Para ello se utiliza como anticuerpo primario 22C10, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina de *Drosophila melanogaster* específico para el citoesqueleto de las neuronas, y como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con el fluoróforo Cy3.

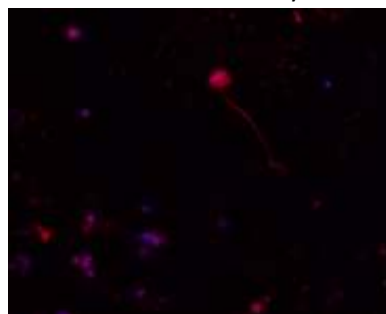


Figura 24. Fotografía tomada utilizando el microscopio de fluorescencia, en las que se observan los cuerpos neuronales, los axones y los conos de crecimiento teñidos de rojo, marcados con el anticuerpo 22C10, y los núcleos celulares teñidos de azul con DAPI.

Se realizan nuevos cultivos combinando varios factores: 1) uso de medio de cultivo tanto con antibióticos como sin antibióticos y, 2) lavado o no de las pupas antes de realizar la disección. Sin embargo, vuelven a aparecer problemas de contaminación tanto bacteriana como fúngica, en algunos casos incluso antes de las 48 horas *in vitro*.

Tras cambiar el medio de cultivo en el que se crían las moscas se obtienen muchas células con muy buena apariencia tras 24 horas, sin embargo aumenta la mortalidad (Figura 25).

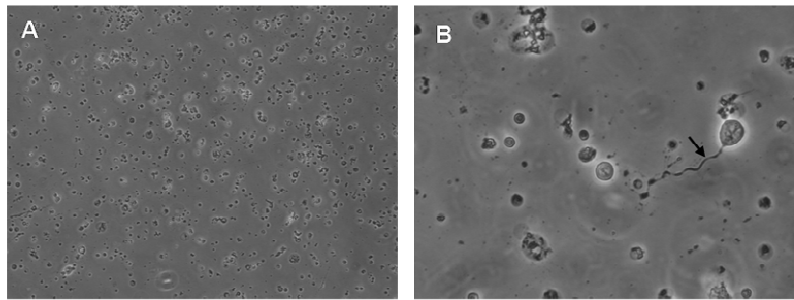


Figura 25. A. Vista general de un cultivo de neuronas de estadio pupa de *Drosophila melanogaster* elav>GFP tras 3 DIV. Magnificación 10x. B. Mismo cultivo fotografiado con magnificación 40x.

Se cambia el medio de cultivo celular basado en DMEM con suplementos por medio Schneider con los mismos suplementos de forma que se puedan incubar las células en una atmósfera sin CO₂ añadido y a una temperatura más adecuada (23°C). En este caso se observa crecimiento axónico pero el problema de mortalidad celular persiste.

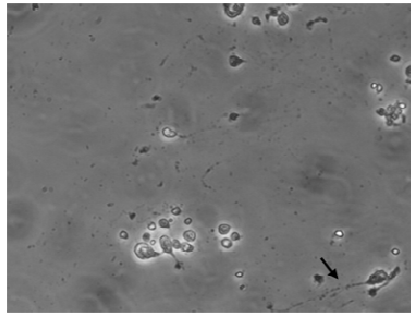


Figura 26. A. Cultivo de neuronas de estadio pupa de *Drosophila melanogaster* silvestre tras 6 DIV en medio de cultivo Schneider. Magnificación 40x.

En los siguientes cultivos realizados utilizando este medio de cultivo aparece de nuevo contaminación bacteriana.

3.1.2. Partiendo de moscas en fase embrionaria

Al realizar un cultivo de este tipo utilizando tanto el mismo medio de cultivo como la misma solución enzimática que el utilizado para los cultivos realizados anteriormente no se obtuvieron células viables.

Por ello se prepararon, con el material disponible en el laboratorio, soluciones similares a las propuestas en el protocolo original para este tipo de cultivos partiendo de embriones. De esta manera se han obtenido, tras tan solo 16 horas de incubación, células neuronales en las que aparecen neuritas con conos de crecimiento, a veces muy desarrollados (Figura 27). A partir de este cultivo se realizó un experimento de inmunocitoquímica para confirmar la identidad de las células observadas (Figura 28), utilizando de nuevo el anticuerpo primario y como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con el fluoróforo Cy3.

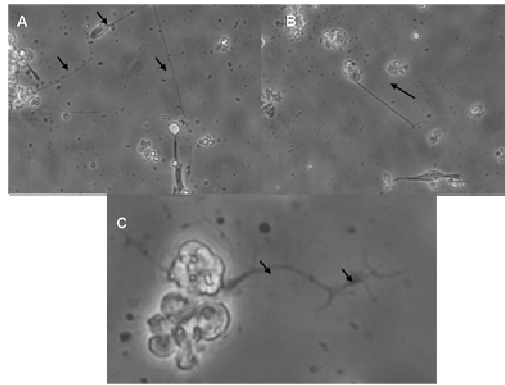


Figura 27. Fotografías de las células neuronales de embriones de *Drosophila melanogaster* obtenidas tras 16 horas de incubación. Maginificación 40x.

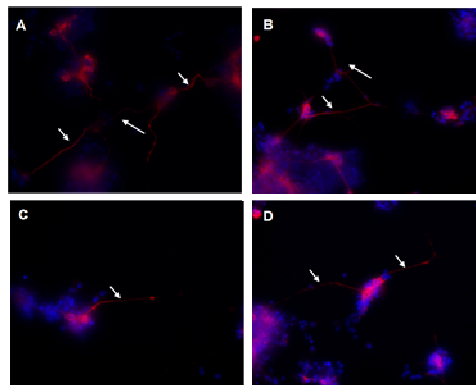


Figura 28. Fotografías tomadas utilizando el microscopio de fluorescencia, en las que se observan los cuerpos neuronales, los axones y los conos de crecimiento teñidos de rojo, marcados con el anticuerpo 22C10, y los núcleos celulares teñidos de azul con DAPI.

3.2. Efectos de la lipocalina GLaz sobre motoneuronas de *Drosophila melanogaster* degeneradas por la acción de hATXIN1^{82Q}

La expresión de hATXIN1^{82Q} en las motoneuronas de *Drosophila melanogaster* utilizando el gen promotor D42 produce su degeneración, lo cual afecta a la capacidad de eclosión de las pupas. Se ha estudiado la capacidad de eclosión de las pupas tras sobre-expresión de GLaz en comparación con la sobre-expresión de la proteína control GFP en la progenie (Figura 29). Una simple inspección inicial nos indicó que GLaz es especialmente beneficioso para recuperar la habilidad de eclosionar de las moscas.

Al analizar cuantitativamente los datos obtenidos de los diferentes cruces, en un principio, se confirma que hay un aumento claro en la eclosión de las pupas si se sobre-expresa GLaz en comparación con el porcentaje de pupas que eclosionan al sobre-expresar GFP, de hecho, la diferencia es tan grande que se podría pensar que GLaz rescata casi al 100% el fenotipo causado por las motoneuronas afectadas por la ataxia espinocerebelosa tipo 1. En la figura 30 se muestran por separado los datos de las dos muestras obtenidas de cada tipo de cruce. El caso de rescate más claro es el obtenido en los cruces B y B', donde toda la progenie expresa GFP (cruce B) o GLaz (cruce B') en las motoneuronas afectadas por SCA1. Sin embargo, si se analizan los resultados de cada uno de los tipos de cruces utilizados, se observa una situación más compleja de lo esperado (ver sección de Discusión).

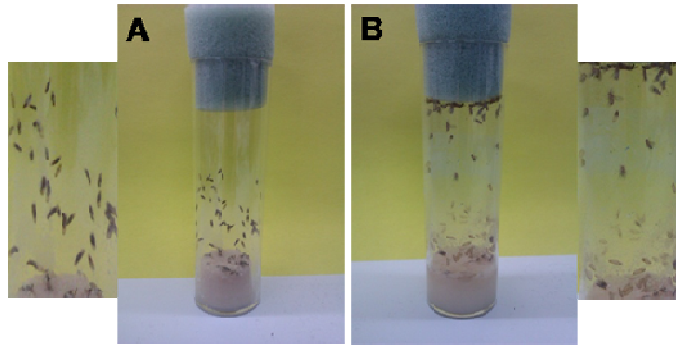


Figura 29. Fenotipo de eclosión deficiente. **A.** Pupas no eclosionadas o con moscas varadas indicando que hay degeneración de motoneuronas. Genotipo D42>hATXIN^{82Q} + GFP **B.** Pupas que eclosionaron correctamente. Se pueden observar moscas adultas libres en el vial. Genotipo D42>hATXIN^{82Q} + GLaz.

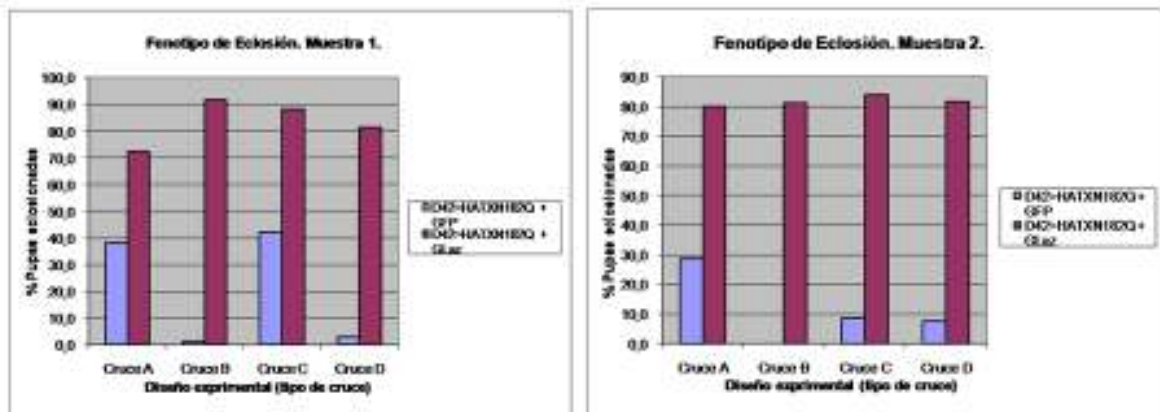


Figura 30. Representación gráfica de los resultados obtenidos tras el experimento. Se observa un aumento en el porcentaje de pupas eclosionadas en todos los casos de pupas que tienen GLaz en su genotipo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Cultivos primarios de neuronas de *Drosophila melanogaster*

Tras la realización de los cultivos tanto a partir de pupas como de embriones se puede concluir que:

- 1) Cuanto más temprano sea el estadio de desarrollo a partir del cual se realiza el cultivo más rápidamente crecen los axones ya que tanto en los estadios embrionarios como en el estadio de pupa temprana se están diferenciando las células neuronales.
- 2) El punto anterior también hace que la probabilidad de contaminación y muerte celular disminuya ya que pueden realizarse los experimentos antes de las 48 horas in vitro, momento en el cual se ha observado contaminación en la mayoría de cultivos realizados en este trabajo.
- 3) Tanto la composición del medio de cultivo en el que se crían las moscas como la temperatura del incubador pueden ser factores determinantes a la hora de mantener un cultivo a largo plazo.

4.2. Efectos de la lipocalina GLaz sobre motoneuronas de *Drosophila melanogaster* degeneradas por la acción de hATXIN1^{82Q}

Los experimentos realizados con anterioridad en el laboratorio indicaban que la sobre-expresión de las lipocalinas en motoneuronas no rescataban los defectos de locomoción causados por la hATXIN1^{82Q}, o, en todo caso los efectos no eran distinguibles de los producidos al introducir una proteína no relacionada (GFP) en las mismas células (Figura 6).

En este caso se esperaba ver un rescate de los fenotipos producidos por degeneración en las motoneuronas, utilizando el controlador D42, el cual tiene una mayor expresión en motoneuronas que el utilizado en experimentos anteriores (nervana 2:GAL4).

Para realizar este experimento se cruzaron moscas que contienen en su genotipo el transgen hATXIN1^{82Q}, con moscas que sobre-expresan GFP o moscas que sobre-expresan GLaz.

Tomemos como referencia los cruces B (Figuras 15 y 16), en los que se esperaba como máximo que el 100% de las pupas que tienen GFP en su genotipo no eclosionaran, y que el 100% de las pupas con GLaz en su genotipo eclosionaran. Si solo se hubieran realizado estos cruces partiendo de parentales homocigotos la conclusión hubiera sido que la lipocalina GLaz rescata completamente los defectos de locomoción causados por la hATXIN1^{82Q} en las motoneuronas.

Paso ahora a interpretar detenidamente los datos obtenidos de los experimentos descritos en el presente trabajo.

Cruce A (Figura 13): Asumamos para simplificar que hay 200 pupas en total, de las cuales, según las leyes de Mendel, 100 son Tb y 100 no Tb. Las pupas Tb no llevan el transgen con hATXIN1^{82Q} en el tercer cromosoma, por lo tanto observamos sólo las pupas no Tb. Entre las no Tb, se espera que 50 sean no CyO-GFP y 50 CyO-no GFP. Ahora bien, de las 100 pupas no Tb contabilizadas hay 34 que eclosionan (% medio de las dos muestras, Figura 30), y 66 que no eclosionan. Sabiendo que las que contienen GFP no eclosionan (o con muy baja probabilidad, según el cruce B) se deduce que hay 50 pupas no CyO-GFP y 16 pupas CyO-no GFP entre las 66 que no eclosionan.

Podemos deducir por lo tanto que, de las 50 pupas CyO-no GFP esperadas, únicamente 16 no eclosionan, por lo tanto hay un 16% de pupas no viables con este genotipo.

Cruce A' (Figura 14): Siguiendo con el mismo supuesto, entre las 100 pupas no Tb totales en este caso hay 75 que eclosionan y 25 que no eclosionan (% medio de las dos muestras, Figura 30). En este cruce la progenie CyO-no Tb es equivalente a la obtenida en el cruce A. Dado que el porcentaje de pupas que no eclosionan en esta progenie es aproximadamente igual al porcentaje de pupas CyO-no GFP no viables del cruce A, se puede concluir que no hay un rescate significativo por parte de GLaz, sino que es la ausencia de GFP lo que hace aumentar el porcentaje de pupas viables por recuperación de las motoneuronas.

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en este trabajo se pueden plantear los siguientes experimentos para un futuro:

- 1) Comparar el crecimiento axonal de células neuronales de *Drosophila melanogaster* en cultivo en función del genotipo. Efecto de las lipocalinas GLaz y NLaz sobre este crecimiento, sabiendo que su homólogo Lazarillo en saltamontes juega un papel importante tanto como guía de los axones hacia la línea media como para el crecimiento de los mismos a partir de los cuerpos neuronales.
- 2) Generar líneas parentales en las que GFP no se encuentre sobre-expresado como controles más adecuados con los que comparar los posibles efectos de las lipocalinas sobre la degeneración de motoneuronas provocadas por hATXIN1^{82Q}.
- 3) Estudiar el efecto de las lipocalinas sobre modelos de degeneración de otros tipos de neuronas u otros modelos de neurodegeneración.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287(5461): 2185-2195.
- Akerström, B., N. Borregaard, et al. (2006). *Lipocalins*.
- Al-Ramahi, I., A. M. Pérez, et al. (2007). "dAtaxin-2 Mediates Expanded Ataxin-1-Induced Neurodegeneration in a *Drosophila* Model of SCA1." *PLoS Genet* 3(12): e234.
- Banfi, S., A. Servadio, et al. (1994). "Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia." *Nat Genet* 7(4): 513-520.
- Bauer, P. O. and N. Nukina (2009). "The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies." *Journal of Neurochemistry* 110(6): 1737-1765.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-415.
- Burdett, H. and M. van den Heuvel (2004). "Fruits and flies: A genomics perspective of an invertebrate model organism." *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 3(3): 257-266.
- Celniker, S. E. (2000). "The *Drosophila* genome." *Current Opinion in Genetics & Development* 10(6): 612-616.
- Drysdale, R. (2008). "FlyBase : a database for the *Drosophila* research community." *Methods Mol Biol* 420: 45-59.
- Flower, D. R. (1996). "The lipocalin protein family: structure and function." *Biochem J* 318 (Pt 1): 1-14.
- Flower, D. R., A. C. T. North, et al. (2000). "The lipocalin protein family: structural and sequence overview." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482(1-2): 9-24.
- Fredericks, C. M. (1996). *Disorders of the Cerebellum and Its Connections*.
- Ganfornina, M. D., H. Kayser, et al. (2006). *Lipocalins*.
- Ganfornina, M. D., D. Sanchez, et al. (1995). "Lazarillo, a new GPI-linked surface lipocalin, is restricted to a subset of neurons in the grasshopper embryo." *Development* 121(1): 123-134.
- Graf, S., P. Ludwig, et al. (2000). "Lazarillo expression reveals a subset of neurons contributing to the primary axon scaffold of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*." *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 419(3): 394-405.
- Grzyb, J., D. Latowski, et al. (2006). "Lipocalins – a family portrait." *Journal of Plant Physiology* 163(9): 895-915.
- Hull-Thompson, J., J. Muffat, et al. (2009). "Control of Metabolic Homeostasis by Stress Signaling Is Mediated by the Lipocalin NLaz." *PLoS Genet* 5(4): e1000460.
- Jeibmann, A. and W. Paulus (2009). "*Drosophila melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 10(2): 407-440.
- Lawlor, K. T., L. V. O'Keefe, et al. (2012). "Ubiquitous Expression of CUG or CAG Trinucleotide Repeat RNA Causes Common Morphological Defects in a *Drosophila* Model of RNA-Mediated Pathology." *PLoS ONE* 7(6): e38516.
- Manuela del Caño, D. Sanchez, et al. (2010). Efecto protector de las lipocalinas de *Drosophila* en un modelo de ataxia espinocerebelosa (SCA1). IV Congreso de la Asociación de Neurociencias de Castilla y León. Avila, Spain.
- Muffat, J., D. W. Walker, et al. (2008). "Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(19): 7088-7093.

- Navarro, J. A., E. Ohmann, et al. (2010). "Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia." *Human Molecular Genetics* 19(14): 2828-2840.
- Orr, H. T. (2012). "SCA1—Phosphorylation, a regulator of Ataxin-1 function and pathogenesis." *Progress in Neurobiology*(0).
- Pasco, M. Y. and P. Léopold (2012). "High Sugar-Induced Insulin Resistance in *Drosophila* Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo." *PLoS ONE* 7(5): e36583.
- Richards, R. I. (2001). "Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease." *Human Molecular Genetics* 10(20): 2187-2194.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, et al. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes." *Science* 287(5461): 2204-2215.
- Ruiz, M., D. Sanchez, et al. (2011). "Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz." *Experimental Gerontology* 46(7): 579-589.
- Salier, J.-P., B. Åkerström, et al. (2004). "Lipocalins in bioscience: the first family gathering." *BioEssays* 26(4): 456-458.
- Sánchez-Soriano, N., W. Bottenberg, et al. (2005). "Are dendrites in *Drosophila* homologous to vertebrate dendrites?" *Developmental Biology* 288(1): 126-138.
- Sánchez, D., M. a. D. Ganfornina, et al. (2000). "Lazarillo, a neuronal lipocalin in grasshoppers with a role in axon guidance." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482(1–2): 102-109.
- Sanchez, D., M. D. Ganfornina, et al. (1995). "Developmental expression of the lipocalin Lazarillo and its role in axonal pathfinding in the grasshopper embryo." *Development* 121(1): 135-147.
- Sánchez, D., M. D. Ganfornina, et al. (2003). "Exon-Intron Structure and Evolution of the Lipocalin Gene Family." *Molecular Biology and Evolution* 20(5): 775-783.
- Sanchez, D., M. D. Ganfornina, et al. (2000). "Characterization of two novel lipocalins expressed in the *Drosophila* embryonic nervous system." *Int J Dev Biol* 44(4): 349-359.
- Sanchez, D., B. López-Arias, et al. (2006). "Loss of Glial Lazarillo, a Homolog of Apolipoprotein D, Reduces Lifespan and Stress Resistance in *Drosophila*." *Current biology : CB* 16(7): 680-686.
- Sanchez, D., S. Ortega-Cubero, et al. (2008). "Molecular interactions of the neuronal GPI-anchored lipocalin Lazarillo." *Journal of Molecular Recognition* 21(5): 313-323.
- Servadio, A., B. Koshy, et al. (1995). "Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals." *Nat Genet* 10(1): 94-98.
- Sicaeros, B., J. M. Campusano, et al. (2007). "Primary neuronal cultures from the brains of late stage *Drosophila* pupae." *J Vis Exp*(4): 200.
- Taghert, P. H., M. J. Bastiani, et al. (1982). "Guidance of pioneer growth cones: Filopodial contacts and coupling revealed with an antibody to Lucifer Yellow." *Developmental Biology* 94(2): 391-399.
- Unterman, R. D., K. R. Lynch, et al. (1981). "Cloning and sequence of several alpha 2u-globulin cDNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(6): 3478-3482.
- Walker, D. W., J. Muffat, et al. (2006). "Overexpression of a *Drosophila* Homolog of Apolipoprotein D Leads to Increased Stress Resistance and Extended Lifespan." *Current biology : CB* 16(7): 674-679.
- Zoghbi, H. Y. and H. T. Orr (2009). "Pathogenic Mechanisms of a Polyglutamine-mediated Neurodegenerative Disease, Spinocerebellar Ataxia Type 1." *Journal of Biological Chemistry* 284(12): 7425-7429.