




# **Análisis de la expresión y la función del gen *$\beta$ -amyloid protein precursor-like* en relación a la vía de Ras1 en el disco imaginal de ojo de *Drosophila melanogaster***

Natalia Mora García

**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)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.



Análisis de la expresión y la función del gen  $\beta$ -amyloid protein precursor-like en relación a la vía de Ras1 en el disco imaginal de ojo de *Drosophila melanogaster*

Natalia Mora García  
Julio de 2012



**Análisis de la expresión y la función del gen  
 *$\beta$ -amyloid protein precursor-like* en relación  
a la vía de Ras1 en el disco imaginal de ojo  
de *Drosophila melanogaster***

Natalia Mora García

Barcelona, Julio de 2012



Departamento de Genética  
Programa de Doctorado de Genética  
Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona

**Análisis de la expresión y la función del gen  
 *$\beta$ -amyloid protein precursor-like* en relación  
a la vía de Ras1 en el disco imaginal de ojo  
de *Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por  
**Natalia Mora García**

Para optar al grado de  
**Doctor**

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Florenci Serras i Rigalt en el  
Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona.

Dr. Florenci Serras i Rigalt  
Director de tesis

Natalia Mora García  
autora

Barcelona, julio de 2012



... Si el encéfalo y demás  
órganos centrales adultos  
del hombre y los  
vertebrados son  
demasiado complejos para  
permitir escrutar su plan estructural, ¿por qué no  
aplicar sistemáticamente el método a los  
animales inferiores o las fases tempranas de los  
tejidos embrionarios, en los cuales el sistema  
nervioso debe ofrecer organización sencilla y por  
decirlo así, esquemática? puesto que la selva  
adulta resulta impenetrable e indefinible, ¿por  
qué no recurrir al bosque joven, como si  
dijéramos, en estado de vivero?...

- Santiago Ramón y Cajal, 1923 -





# ÍNDICE



## INDICE DE FIGURAS

## INDICE DE TABLAS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. El ojo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	1
El ojo adulto.....	1
El disco imaginal de ojo: desarrollo de los fotorreceptores.....	3
2. La vía de señalización de Ras1.....	6
Drosophila Epidermal Growth factor.....	6
El receptor Sevenless.....	7
la determinación del R7.....	7
El grupo de equivalencia de Sevenless.....	9
3. El transcriptoma de sevenless.....	11
Los alelos de sevenless.....	11
La línea sev <sup>S11</sup> .....	11
La línea sev <sup>d2</sup> .....	11
4. $\beta$ -Amyloid protein precursor-like.....	13
La familia APP.....	13
Dominios proteicos.....	14
Procesamiento proteolítico.....	15
Enfermedad de Alzheimer.....	16
Función de la familia APP.....	17
Supervivencia neuronal y apoptosis.....	17
Plasticidad sináptica y transporte axonal.....	18
Adhesión celular y crecimiento de neuritas.....	18
Otras funciones: Desarrollo de órganos mecano-sensoriales.....	19
La familia APP y la vía Ras.....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
1. Materiales.....	27

Cepas bacterianas.....	27
Plásmidos empleados .....	27
Plásmidos generados.....	27
Oligonucleótidos .....	29
Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	30
Cepas de <i>Danio rerio</i> .....	30
Anticuerpos.....	31
2. Métodos.....	32
1. Técnicas de manipulación de DNA plasmídico.....	32
1.1 Transformación de células competentes .....	32
1.2 Obtención de DNA plasmídico: Lisis Alcalina .....	32
2. Técnicas de análisis de ADN .....	33
2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
2.2 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	34
2.3 Predicciones in silico: caracterización de promotores e intrones .....	35
3. Técnicas de análisis de RNA .....	36
3.1 Extracción de RNA.....	36
3.2 RT-PCR.....	36
3.3 Microarrays de expresión.....	36
3.4 Síntesis de sonda para hibridación <i>in situ</i> .....	36
3.5 Hibridación <i>in situ</i> .....	37
4. Técnicas de análisis de proteínas.....	40
4.1 Inmunohistoquímica en discos imaginales y cerebros de larva III ...	40
4.2 Inmunohistoquímica en cerebros de pupa.....	41
4.3 Inmunohistoquímica en cerebros de adulto.....	41
5. Técnicas de análisis de mosaicos genéticos .....	42
5.1 Twin clones .....	42
5.2 Flip-out clones.....	43
6. Técnicas de análisis de fenotipos .....	44
6.1 Microscopía electrónica de barrido .....	44
7. Técnicas de análisis del comportamiento .....	44
7.1 Laberinto en forma de T: test de selección entre dos colores .....	44

8. Técnicas de análisis de imágenes .....	46
<b>RESULTADOS</b> .....	49
1. El transcriptoma de <i>Sevenless</i> .....	49
Diseño de microarrays .....	49
Análisis de Microarrays .....	51
Los <i>genes diana</i> .....	51
Los <i>genes diana con ETS</i> .....	52
El grupo de los neurogénicos.....	54
2. La expresión de <i>Appl</i> en ojo.....	56
Expresión de <i>Appl</i> en disco imaginal de ojo .....	56
La distribución de <i>Appl</i> en fotorreceptores.....	56
La distribución de <i>Appl</i> en el ojo de pupa .....	59
Sevenless activa la expresión de <i>Appl</i> .....	59
3. La vía de Ras1 en la regulación de <i>Appl</i> .....	61
Ras1 controla la expresión de <i>Appl</i> .....	61
4. El factor de transcripción PntP2 en el control de la expresión de <i>Appl</i> ..	64
Pnt media la regulación de <i>Appl</i> .....	64
<i>Appl</i> es un target directo de Pnt.....	65
Ensayos de reportero lacZ.....	66
Ensayos de InmunoPrecipitaciones de Cromatina (ChIP).....	69
5. El factor de transcripción fos en la regulación de <i>Appl</i> .....	73
6. La vía de Ras1 en la regulación de <i>Appb</i> de <i>Danio rerio</i> .....	75
La vía de Ras activa la expresión del gen <i>Appb</i> de <i>D.rerio</i> .....	75
7. La función de <i>Appl</i> en el fotorreceptor R7 .....	78
<i>Appl</i> está implicado en el desarrollo del R7 .....	78
<i>Appl</i> está implicado en la guía axonal del R7 .....	80
El fondo mutante de <i>Neurotactina</i> acentúa los fenotipos de <i>Appl</i> .....	81
<b>DISCUSIÓN</b> .....	87
1. El transcriptoma de <i>sevenless</i> .....	87
Determinación: Diálogo con la vía Notch .....	88

Diferenciación: procesos de guía de axones .....	89
2. El gen <i>App1</i> : Regulación de la expresión .....	90
La vía de Ras y la expresión de la familia APP .....	90
Otros factores involucrados en la regulación de <i>App1</i> .....	91
3. El gen <i>App1</i> : El contexto genómico .....	93
4. La proteína App1: la función en R7.....	96
Guía de axones .....	96
5. Modelo integrador .....	99
6. <i>Drosophila</i> como modelo de enfermedades neurodegenerativas: la enfermedad de Alzheimer .....	100
<b>CONCLUSIONES</b> .....	105
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	109

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

Figura 1. El ojo compuesto de <i>D. melanogaster</i> .....	1
Figura 2. El lóbulo óptico de <i>Drosophila</i> .....	3
Figura 3. El desarrollo secuencial de los fotorreceptores.....	4
Figura 5. Desarrollo temporal del ojo .....	5
Figura 4. migración de axones.....	5
Figura 6. Drosophila Epidermal Growth factor .....	7
Figura 7. determinación del R7 .....	9
Figura 8. Esquema de los patrones de expresión de genes involucrados en la determinación de la célula R7 .....	10
Figura 9. Los alelos de sevenless: <i>sev</i> <sup>S11</sup> y <i>sev</i> <sup>d2</sup> .....	12
Figura 10. Conservación de la familia APP .....	13
Figura 11. Los dominios proteicos de familia APP .....	14
Figura 12. El procesamiento proteolítico de APP.....	16
Figura 13. Appl está involucrado en el crecimiento axonal .....	19

## MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 14. Laberinto en forma de T.....	45
---	----

## RESULTADOS

Figura 15. Representación esquemática del diseño de los microarrays.....	50
Figura 16. Categorías Gene Ontology enriquecidas en los genes diana .....	51
Figura 17. Los <i>genes diana con ETS</i> .....	54
Figura 18. Expresión de <i>Appl</i> en el disco imaginal del ojo .....	56
Figura 19. Distribución de <i>Appl</i> en los fotorreceptores; sección horizontal..	57
Figura 20. Distribución de <i>Appl</i> en los fotorreceptores; sección transversal	58
Figura 21. Distribución de <i>Appl</i> en los fotorreceptores de pupa .....	59
Figura 22. Sevenless activa la expresión de <i>Appl</i> . .....	60
Figura 23. Ras1 regula la expresión de <i>Appl</i> .....	62



Figura 24: <i>Tween-clones</i> de <i>Ras</i> <sup>CΔ40b</sup> .....	63
Figura 25: Twin clones de <i>pnt</i> <sup>Δ88</sup> .....	64
Figura 26. Los ETSs de <i>Appl</i> .....	65
Figura 27. Patrón de expresión de los <i>enhancers-lacZ</i> .....	67
Figura 28. Ras activa la expresión de los reportero-LacZ .....	68
Figura 29. Construcción <i>UAS-PntP2-HA</i> .....	69
Figura 30. Test funcional de <i>UAS-PntP2-HA</i> .....	70
Figura 31. CHIP de discos imaginales de ojo .....	71
Figura 32. Control del anticuerpo en los ensayos de CHIP .....	72
Figura 33. Los sitios AP-1 de <i>Appl</i> .....	73
Figura 34. fos no regula la expresión de <i>Appl</i> .....	74
Figura 35. Expresión de <i>Appb</i> .....	76
Figura 36. Expresión de <i>Appb</i> en embriones <i>hsp70:ca-fgfr1</i> .....	77
Figura 37: <i>Appl</i> está implicado en la detección de la luz ultravioleta .....	79
Figura 38. <i>Appl</i> rescata el fenotipo <i>Appl</i> <sup>d</sup> .....	80
Figura 39. <i>Appl</i> está implicado en la guía del axón del R7 .....	81
Figura 40: El fondo <i>Nrt</i> <sup>1</sup> acentúa el fenotipo <i>Appl</i> <sup>d</sup> en ensayos de preferencia espectral .....	82
Figura 41. El fondo <i>Nrt</i> <sup>1</sup> acentúa el fenotipo <i>Appl</i> <sup>d</sup> en la guía del axón del R7 .....	83

## DISCUSIÓN

Figura 42. Notch activa la expresión de <i>Appl</i> .....	92
Figura 43. El contexto genómico de <i>Appl</i> .....	95
Figura 44. Modelo integrador .....	99

## ÍNDICE DE TABLAS

### MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados.....	29
Tabla 2. Líneas de <i>Drosophila</i> utilizadas.....	30
Tabla 3. Anticuerpos utilizados .....	31
Tabla 4. reactivos y los ciclos de una reacción de PCR estándar .....	33
Tabla 5. Reactivos y cantidades correspondientes utilizadas para la transcripción de sondas. ....	37
Tabla 6. Genotipos utilizados para el análisis de <i>Twin clones</i> .....	43
Tabla 7. Genotipos utilizados para el análisis de <i>Flip-out clones</i> .....	44

### RESULTADOS

Tabla 8. Número total de genes con cambios en la expresión .....	50
Tabla 9: Lista de <i>genes diana con ETS</i> .....	53
Tabla 10. Lista de genes de la categoría <i>neurogénesis</i> .....	54



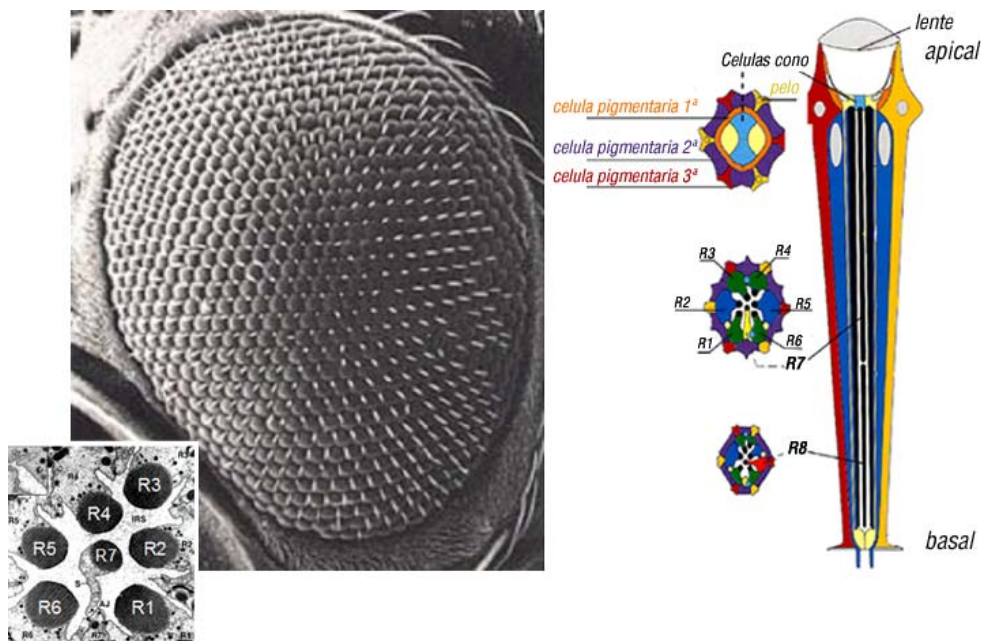
# INTRODUCCIÓN



# 1. El ojo de *Drosophila melanogaster*

## El ojo adulto

El ojo de *Drosophila* está compuesto por unas 800 unidades llamadas omatidios, cada unidad a su vez, está compuesta por 20 células: ocho células pigmentarias (divididas en primarias, secundarias y terciarias); cuatro células cono y ocho neuronas fotorreceptoras (R1-R8) (figura 1, Harris et al., 1976)

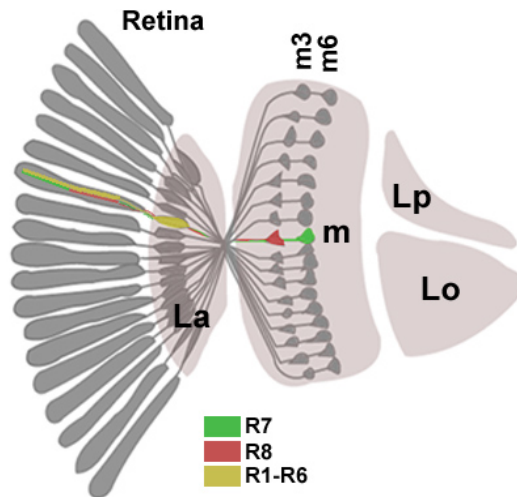


**Figura 1. El ojo compuesto de *D. melanogaster*.** A la izquierda, micrografía de un ojo adulto. Abajo a la izquierda, sección transversal en la que se puede observar la organización de los fotorreceptores (numerados del 1 al 7) dentro del omatidio (Voas and Rebay, 2003). A la derecha, esquema apico-basal del omatidio en el que se muestra todos los tipos celulares (adaptado de Wolff and Ready, 1993)

En la parte más apical del omatidio se encuentran las células cono, que son las encargadas de secretar la lente. Justo por debajo, se sitúan los fotorreceptores, ubicados en el centro del omatidio y rodeados por las células pigmentarias. En conjunto, estas células confieren al omatidio una estructura hexagonal característica, que repetida proporciona una morfología extraordinariamente regular.

La función fundamental de los fotorreceptores adultos es la de percibir la luz. Esta actividad es posible gracias a la presencia de opsinas fotosensibles que se acumulan en las microvellosidades de los rabadómeros. En base al contenido de opsinas y las características morfológicas y funcionales de los fotorreceptores, se pueden separar dos subgrupos. Los fotorreceptores externos del R1 al R6, tienen rabadómeros grandes con posición periférica, expresan la opsina Rh1 que es sensible a un amplio espectro de longitudes de onda, (Feiler et al., 1988; O'Tousa et al., 1985; Zuker et al., 1985), y están especializados en la detección de movimiento y la construcción de imágenes (Heisenberg and Buchner, 1977). Los fotorreceptores internos R7 y R8 tienen rabadómeros pequeños con posición central (el del R7 por encima del R8) y patrones más complejos de expresión de opsinas: El fotorreceptor R7 expresa las opsinas sensibles a la luz ultravioleta Rh3 o Rh4 (Fryxell and Meyerowitz, 1987; Montell et al., 1987; Zuker et al., 1987), mientras que el R8 expresa la opsina Rh5 sensible a la luz azul o la Rh6 sensible a la luz verde (Chou et al., 1996; Chou et al., 1999; Huber et al., 1997; Papatsenko et al., 1997). En un pequeño porcentaje de omatidios del borde dorsal del ojo, tanto R7 como R8 expresa la opsina sensible a la luz ultravioleta Rh3. Estos omatidios descifran la luz polarizada en los procesos de orientación espacial, aunque la gran mayoría de fotorreceptores internos están especializados en la visión del color (Wernet et al., 2003; Wernet et al., 2012).

La información captada por los fotorreceptores se transmite al lóbulo óptico, el cuál puede dividirse en cuatro ganglios o neurópilos (revisado en Morante and Desplan, 2004): lámina, médula, lóbula y placa lóbula (Figura 2). Los R7 y R8 de un mismo omatidio entran en la médula formando una columna, de manera que pueden distinguirse alrededor de 800 columnas medulares. La médula además, se estratifica en 10 capas (M1-M10) ortogonales a la orientación de las proyecciones de los fotorreceptores y es el primer paso en la percepción del color, ya que recibe la entrada directa del R8 a la capa M3 y del R7 a la capa M6 (Fischbach and Dittrich, 1989). Es sin embargo, el segundo paso en la detección del movimiento ya que R1-R6 conectan con las neuronas de la lámina y estas con las neuronas de la médula (Rister et al., 2007).



**Figura 2. El lóbulo óptico de *Drosophila*.** Representación de las proyecciones de las células fotorreceptoras de la retina adulta en la lámina (La, R1-R6) y la médula (m, R8/R7) del lóbulo óptico. Se muestran también los ganglios ópticos más centrales (lobula [Lo] y la placa lobula [Lp]).

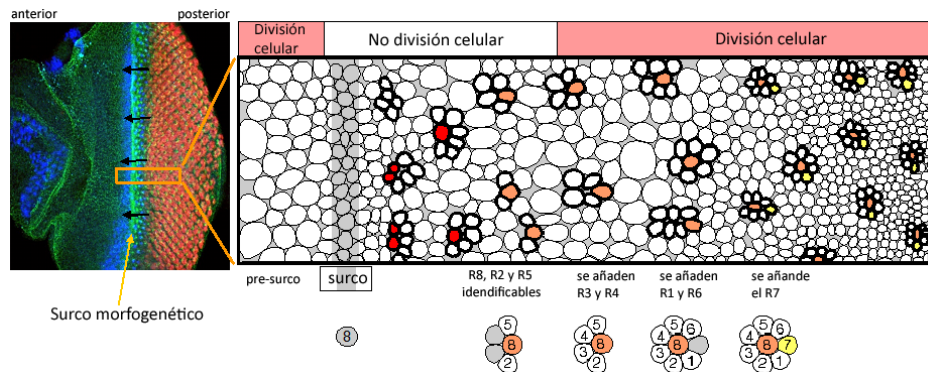
### El disco imaginal de ojo: desarrollo de los fotorreceptores

El ojo adulto de *Drosophila* se desarrolla a partir del disco imaginal de ojo-antena, un epitelio de origen embrionario que prolifera hasta alcanzar alrededor de 20000 células. Estas células se mantienen indiferenciadas hasta el tercer estadio larvario, cuando comienzan los procesos de determinación celular.

El primer paso en el proceso de la determinación está marcado por la formación del surco morfogenético, una constricción apical que se transmite a modo de ola a lo largo del disco de ojo en dirección posterior-anterior. La formación del surco en la parte más posterior del disco, está dirigida por la actividad de Decapentaplegic y Hedgehog, mientras que la progresión depende de Hedgehog (Curtiss and Mlodzik, 2000; Pignoni and Zipursky, 1997). Hedgehog además, activa la expresión del gen proneural *atonal* (Dominguez and Hafen, 1997) en todas las células por donde pasa el surco. A continuación, por un proceso de inhibición lateral controlado por la interacción Delta-Notch (Baker et al., 1996), la expresión de *atonal* queda restringida en grupos de tres células (grupo de equivalencia), donde *atonal* activa la expresión de *senseless*, un factor de transcripción involucrado en la determinación del R8. Dos de estas tres células expresan *rough*, que inhibe la expresión de *senseless* y por tanto la determinación a R8 (Pepple et al., 2008), mientras que la otra célula que sí expresa *senseless* quedará definida como el precursor del R8, el primer fotorreceptor en determinarse (Hsiung and Moses, 2002; Jarman et al., 1994; Jarman et al., 1995).

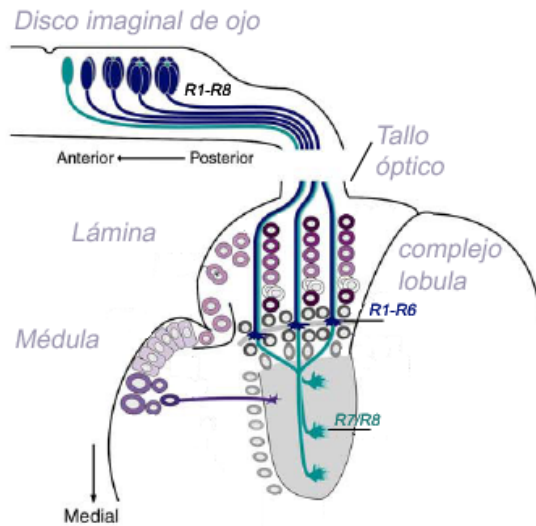


Una vez determinado, el R8 actúa como célula fundadora y recluta progresivamente al resto de fotorreceptores mediante la activación reiterada de la vía Ras/MAPK (Freeman, 1996; Freeman, 1997; Kumar et al., 1998). En primer lugar, el R8 induce la activación de la vía Ras1, en el par de células indeterminadas 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 (figura 3).



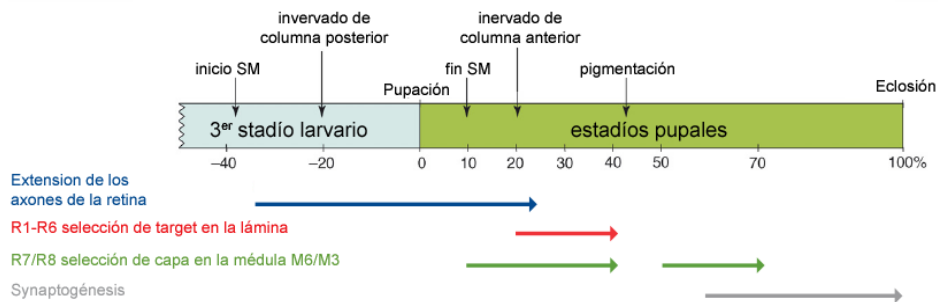
**Figura 3. El desarrollo secuencial de los fotorreceptores.** Izquierda, imagen confocal de un disco imaginal de ojo. atonal: proneural en azul; elav: fotorreceptores en rojo; armadillo: surco morfogénico en verde. (←) indican la dirección de avance del surco morfogénico. A la derecha: representación esquemática de la especificación secuencial de los fotorreceptores. (esquema modificado de Wolpert et al., 1998).

El desarrollo estereotípico y ordenado de los fotorreceptores se refleja en la organización retinotópica del lóbulo óptico. Tras la determinación, los fotorreceptores en desarrollo envían sus axones al lóbulo óptico en el mismo orden temporal en el que se ha producido la determinación. Los axones del R8 de cada omatidio migran hacia el extremo más posterior del disco imaginal del ojo y entran en el tallo óptico, cruzan la lámina y terminan dentro de la médula. Los axones de R1-R7 del mismo omatidio siguen la ruta del axón pionero del R8 hasta que en la lámina encuentran una capa de células gliales conocida como la glía marginal (Perez and Steller, 1996; Poock et al., 2001). Mientras que el crecimiento de los axones de R1-R6 se para en respuesta a alguna señal desconocida producida por las células gliales, el axón del R7 pasa a través de la lámina y termina en la médula (figura 4; Hadjieconomou et al., 2011).



**Figura 4. migración de axones.** Esquema en el que se muestra como la migración de los axones de los fotorreceptores a la lámina (R1-R6) y a la médula (R7/R8) ocurre en el mismo orden temporal en el que se ha producido la determinación (Hadjieconomou et al., 2011)

Durante el desarrollo larvario los axones migran gradualmente dentro del lóbulo óptico conforme se van determinando y se detienen. 24 horas después de la formación de la pupa, los axones reanudan la migración hasta su posición definitiva, ya no gradualmente sino de forma sincronizada. En el caso de R7 y R8 la proyección a la capa específica se produce en dos etapas: durante los primeros estadios pupales alcanzan una capa temporal y más tarde en el desarrollo pupal, la capa definitiva. (Figura 5) (Hadjieconomou et al., 2011)



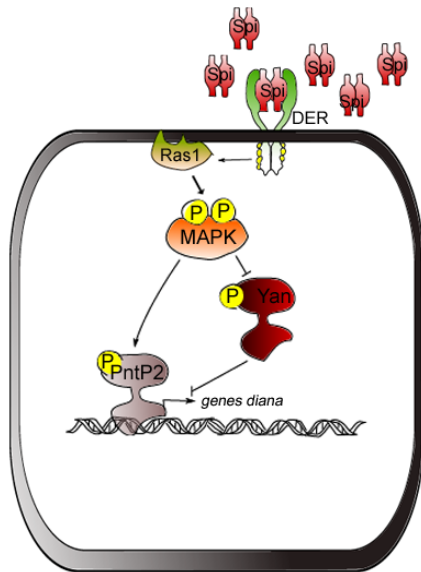
**Figura 5. Desarrollo temporal del ojo.** Representación temporal de los eventos que tienen lugar en el desarrollo del ojo. El momento inicial de la sinaptogénesis aun no se conoce (flechas gris). El estadio de pupa dura 100 horas en condiciones de cultivo standard por lo que 1% equivale a una hora de tiempo de desarrollo. SM:surco morfogenético. (esquema adaptado de Ting and Lee, 2007)

## 2. La vía de señalización de Ras1

### Drosophila Epidermal Growth factor

La vía Ras1 se activa en los fotorreceptores a través del receptor tirosina quinasa Drosophila Epidermal Growth factor (DER) que se regula mediante la unión de dos ligando con funciones opuestas: spitz (spi) y argos. El ligando activador spi se secreta desde el R8 (Shilo, 2003; Tsruya et al., 2002; Urban et al., 2001), para activar DER en la membrana de los precursores. Los fotorreceptores R2/R5 una vez reclutados, también contribuyen a la secreción de spi, incrementado la concentración del ligando y facilitando el reclutamiento (Tio et al., 1994; Tio and Moses, 1997). A medida que las células responden a la activación de DER, comienzan a expresar el ligando represor *argos* (Golembo et al., 1996). Este difunde y bloquea la unión de spi al receptor a no ser que las células estén expuestas a niveles altos de spi, o que ya hayan comenzado a diferenciarse, restringiendo la actividad de la vía a grupos de células en proximidad. Una vez activado el receptor, se produce una cascada de fosforilación mediada por Ras1 que culmina con la activación de la quinasa Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK; Raabe, 2000).

Una de las funciones mejor conocidas de la MAPK activada es la de entrar al núcleo y fosforilar dos factores de transcripción de la familia ETS: Pointed-P2 (PntP2) y Yan (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994). Ambos son capaces de unirse a las mismas secuencias de DNA (secuencias ETS) pero con efectos contrapuestos ya que PntP2 es un activador transcripcional pero Yan es un represor. Al ser fosforilada Yan queda inactiva, mientras que la fosforilación activa PntP2 y permite que se una a los *genes diana* (figura 6) La activación de la vía Ras1 a través de DER finalmente activa la transcripción de los genes responsables de los distintos destinos celulares (Freeman, 1996; Freeman, 1997; Kumar et al., 1998) en todos los precursores salvo en el del R7. Este precursor además necesita activar la vía de Ras1 a través de un receptor tirosina quinasa adicional: el receptor Sevenless (Tomlinson and Ready, 1986).



**Figura 6. Drosophila Epidermal Growth factor.** Esquema de la vía Ras1 activada por DER durante el desarrollo de los fotorreceptores. (adaptado de Doroquez and Rebay, 2006)

## El receptor Sevenless

### La determinación del R7

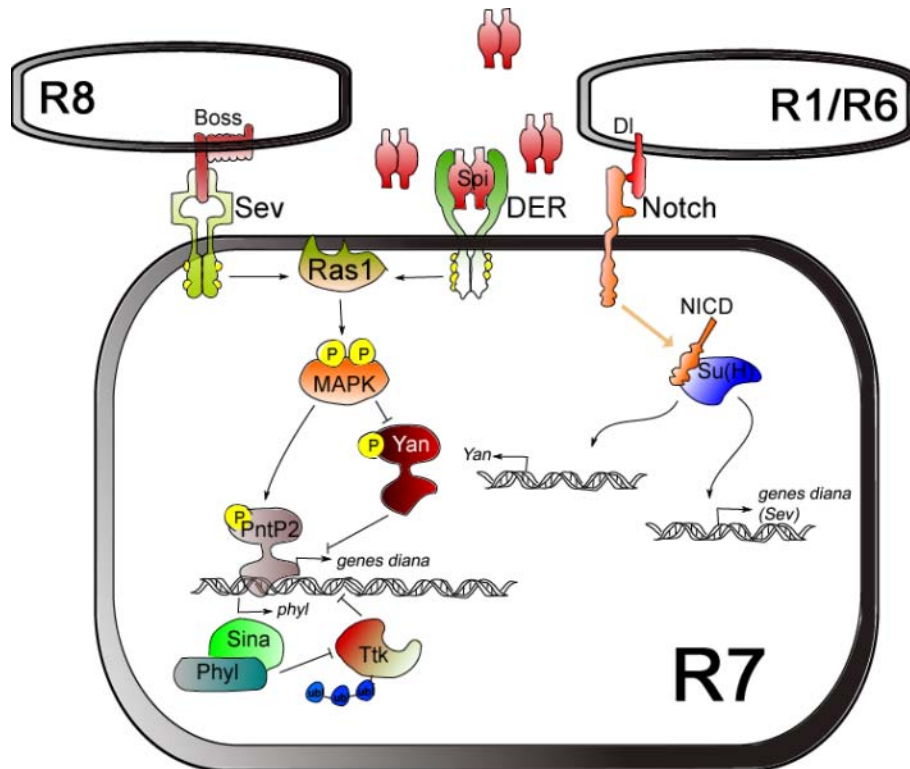
Durante el desarrollo del R7, Sevenless (Sev) y DER convergen en la misma vía provocando una activación masiva de Ras1, crítica para su determinación. En alelos de pérdida de función de *sev*, el precursor de R7 no adquiere su destino neuronal y acaba transformándose en célula como (Cagan et al., 1992; Harris et al., 1976; Hart et al., 1990; Tomlinson and Ready, 1987). Por el contrario, si Sev se activa en otras células se obtiene un incremento de R7 por omatidio (Basler et al., 1991). Debido a que el receptor Sev produce como resultado un aumento de la actividad de la vía Ras/MAPK, una activación de ésta independiente de Sev, es decir, la activación de elementos *downstream* de la vía, como Ras1 (mediante alelos como *Ras<sup>V12</sup>*), o incluso una activación ectópica del propio DER, además de rescatar el fenotipo provocado por la pérdida de función de *sev*, también provoca la aparición de R7s extra por omatidio (Dickson et al., 1992; Dominguez et al., 1998; Fortini et al., 1992).

El desarrollo del R7 es un ejemplo de participación de dos RTK que concurren en la misma vía. También es llamativo que, a diferencia de la mayoría de RTK que se utilizan reiteradamente en diferentes procesos biológicos, Sev solo participe en dos procesos conocidos: la determinación del R7 (Basler and Hafen, 1988; Tomlinson and Ready, 1986) y la restricción del nicho de células madre en las gónadas masculinas (Kitadate et al., 2007).

Sev se activa por la unión del ligando *bride of sevenless* (*boss*), presente únicamente en la membrana del fotorreceptor R8 (Reinke and Zipursky, 1988). *Boss* es una glicoproteína 7-pasos transmembrana ancorada en la membrana del R8. Al no ser difusible como *spi*, la proximidad celular es imprescindible para la unión receptor-ligando. Una vez el receptor está activado, se activa la vía *Ras1* de la misma manera que en el caso de *DER*. Como resultado *Yan* queda inhibido mientras que *PntP2* activado puede ir a sus genes *diana* para activar la transcripción. Uno de estos genes es *phyllopooid* (*phyl*) que codifica una proteína adaptadora de la ligasa de ubiquitina *seven in absentia* (*sina*) (Carthew and Rubin, 1990; Chang et al., 1995; Dickson et al., 1995). El complejo *sina-phyl* se une a *tramtrack* (*ttk*) y promueve la degradación de este vía proteasoma (Li et al., 1997; Li et al., 2002). *Ttk* es uno de los principales inhibidores del desarrollo neural y solo si se degrada, el precursor R7 puede convertirse en fotorreceptor, mientras que las células que no degradan *ttk* se diferencian en los destinos no neurales del ommatidio (figura 7).

La vía de *Notch* también contribuye a la especificación del R7. El receptor *Notch* se activa en la membrana del R7 por la unión del ligando *Delta* (*DI*), anclado en los fotorreceptores R1/R6. Esta unión promueve el corte del dominio intracelular de *Notch* (*NICD*) provocando la escisión del dominio al citoplasma (De Strooper et al., 1999). En presencia de *NICD* el factor de transcripción *Suppressor of Hairless* (*Su(H)*), funciona como activador transcripcional en lugar de cómo represor (Dou et al., 1994; Hsieh et al., 1996; Waltzer et al., 1995) y curiosamente, activa la transcripción de *Yan* (Rohrbaugh et al., 2002). Los niveles de *Yan* delimitan la capacidad de respuesta de la vía *Ras1*, por lo tanto, cuanto mayores sean estos niveles, mayor deberá ser la activación de *Ras1*. De este modo parece que *Notch* está condicionando los niveles de *Ras1* que requieren los precursores para activar el destino R7.

En contraposición a este papel que podría interpretarse como represor, *Notch* actúa en el R7 activando la transcripción de genes característicos de este tipo celular, incluyendo el propio *Sev* (figura 7; Doroquez and Rebay, 2006; Tomlinson et al., 2011). Además se sabe que la activación ectópica de la vía *Notch* en los precursores R1/R6 hace que éstos se determinen como R7, mientras que la falta de *Delta* o del propio *Notch*, provoca la transformación del precursor R7 a R1/R6 (Cooper and Bray, 2000; Tomlinson and Struhl, 2001).

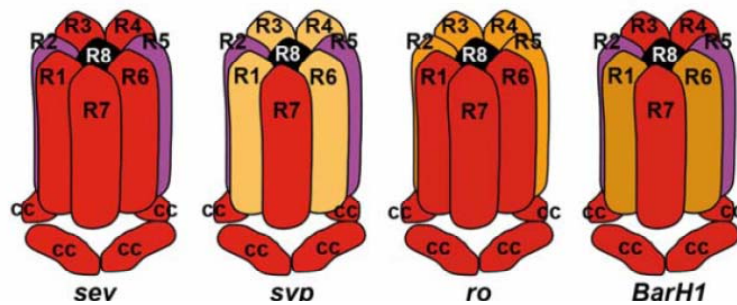


**Figura 7. determinación del R7.** Esquema de la vías Sev, DER y Notch implicadas en la determinación del R7.

### El grupo de equivalencia de Sevenless

Sev está activo únicamente en el R7 y es necesario para la determinación de este. Pero su expresión no es exclusiva del R7 si no que también se encuentra en los precursores R3/R4, las células cono y a niveles muy bajos en los precursores R1/R6 (Figura 8; Banerjee et al., 1987a; Banerjee et al., 1987b; Tomlinson et al., 1987). Este conjunto de células se conoce como el grupo de equivalencia de Sevenless, y todas son susceptibles de transformarse en R7 si se altera el control que reprime la activación de Sev. Seven-up (svp), rough (ro), y BarH1/H2 forman parte de los mecanismos de control y están combinados de forma diferente en las distintas células del grupo de equivalencia. Por un lado svp, reprime la actividad de Sev en los precursores R3/R4 y R1/R6. En consecuencia, la falta de svp provoca la transformación de estos precursores a R7 (figura 8; Mlodzik et al., 1990)

mientras que la expresión ectópica provoca la transformación del precursor R7 en fotorreceptor externo (Begemann et al., 1995; Hiromi et al., 1993). La proteína *ro*, presente en los fotorreceptores R2/R5 y R3/R4 (figura 8; Tomlinson et al., 1988), juega un papel esencial tanto en la especificación de estos, como en la de los fotorreceptores R1/R6, ya que *ro* activa en este par, la expresión del represores de la actividad de *Sev*: *BarH1/H2*. (figura 8; Basler et al., 1990; Hayashi et al., 1998; Heberlein et al., 1991; Higashijima et al., 1992; Kimmel et al., 1990). Por otro lado, el control de la activación de *Sev* en las células como es físico, ya que al no contactar con la membrana del R8, fuente del ligando *boss*, el receptor *Sev* nunca podrá estar activo. Sin embargo, la expresión de alelos de *sev* constitutivamente activos en estas células, hace que se transformen en R7 (figura 8).



**Figura 8. Esquema de los patrones de expresión de genes involucrados en la determinación de la célula R7.** A la izquierda, las células que expresan *sev* en rojo. En el centro a la izquierda, el par R1/R6 y el par R3/R4 expresan *svp* (en color ocre). En el centro a la derecha, el patrón de expresión de *ro* se muestra en naranja y por último a la derecha se muestra la expresión de *BarH1* en el par R1/R6 (en marrón) (Almudi, 2009)



### 3. El transcriptoma de sevenless

La compleja red de regulación que participa en la especificación del R7 ha sido ampliamente investigada. Sin embargo aun no conoce cuál es el programa transcripcional activado por la vía de Ras1 en el fotorreceptor R7. Conocer este programa fue nuestro primer objetivo y para ello utilizamos una aproximación basada en microarrays de expresión aprovechando la disponibilidad de los alelos de *sev* que se describen a continuación (el diseño y análisis de los microarrays se explica con detalle en la sección de resultados: el transcriptoma de sevenless).

#### Los alelos de sevenless

##### La línea *sev<sup>S11</sup>*

El alelo de ganancia de función *sev<sup>S11</sup>* es una construcción que contiene el dominio tirosina quinasa fusionado con la señal de localización en membrana de CP3 y el epítipo c-myc, pero que carece de la parte extracelular del receptor. Esto le permite dimerizar y autofosforilarse sin necesidad de unirse al ligando. La expresión está dirigida por el promotor de *sev*, de manera que sólo se expresa en las células del grupo de equivalencia. La construcción por tanto, produce un incremento de la vía de Ras1 en todo el grupo de equivalencia, pero solo las células como, que no tienen mecanismos para inhibir esta activación, acaban transformándose en R7s. Debido a la presencia de R7 ectópicos que alteran la estructura regular del omatidio, el alelo *sev<sup>S11</sup>* da lugar a ojos con apariencia rugosa (Basler et al., 1991).

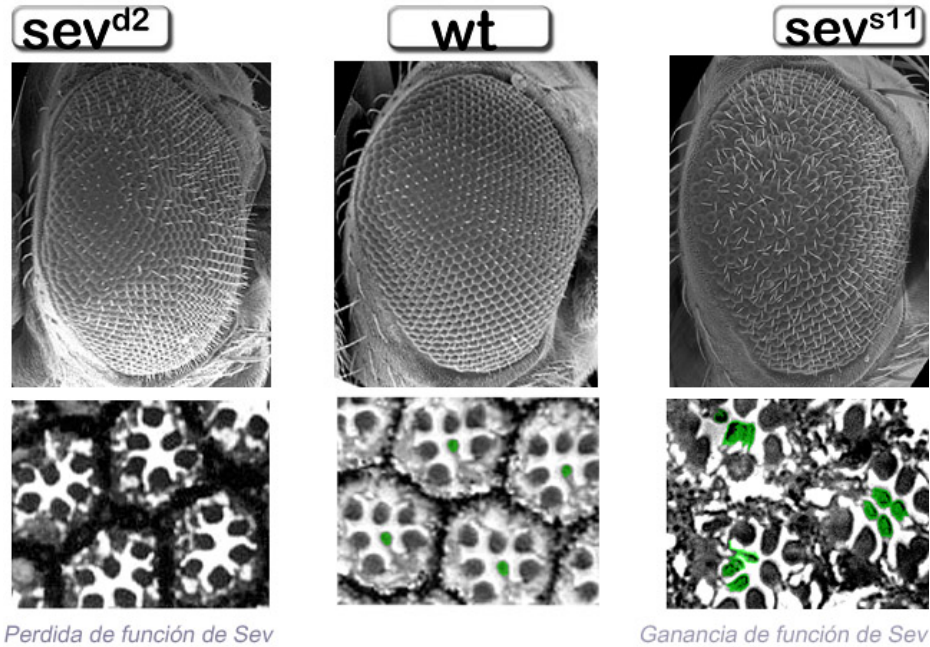
##### La línea *sev<sup>d2</sup>*

*sev<sup>d2</sup>* es un alelo de pérdida de función de *sevenless*, caracterizado por Guerresheim en 1988. El objetivo de Guerresheim fue el de identificar los genes implicados en la percepción del ultravioleta y para ello elaboró un sistema en el que las moscas tenían que elegir entre esta luz y la luz visible. En este sistema, un alto porcentaje de las moscas de tipo salvaje eligen la luz ultravioleta, reflejando el tropismo natural que tienen por esta longitud de onda. Sin embargo, Gerresheim observó que las moscas con la mutación *sev<sup>d2</sup>* tenían un comportamiento fototáctico invertido (Gerresheim, 1988). Este comportamiento se debe a que las moscas con pérdida de función de *sev*, carecen de fotorreceptor R7, el fotorreceptor primario en la percepción del



ultravioleta, apareciendo en su lugar una célula como (Tomlinson and Ready, 1986).

Los omatidios de estos mutantes al tener un contenido de células alterado pierden la conformación hexagonal típica del omatidio y en consecuencia dan lugar a ojos con aspecto rugoso (figura 9).



**Figura 9. Los alelos de sevenless:  $sev^{S11}$  y  $sev^{d2}$ .** Microscopía electrónica de rastreo de ojos wt mostrando la estructura regular del ojo adulto en contraposición a los ojos rugosos de los alelos  $sev^{S11}$  y  $sev^{d2}$ . Paneles inferiores: cortes transversales semifinos al nivel de los fotorreceptores. El fotorreceptor R7 está marcados en verde.

Por lo tanto, la determinación del R7 puede manipularse variando los niveles de activación de la vía de Ras1 a través del receptor Sev, sin afectar el destino del resto de fotorreceptores.

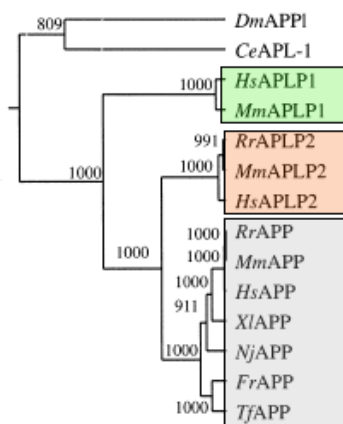
Utilizando los alelos descritos, hemos realizado microarrays de expresión para conocer el transcriptoma activado por Sev. Uno de los genes cuya expresión se vio alterada en los microarrays fue el *gen  $\beta$ -amyloid protein precursor-like (Appl)*.

## 4. $\beta$ -Amyloid protein precursor-like

### La familia APP

El gen  $\beta$ -Amyloid protein precursor-like (*Appl*) pertenece a la familia APP, altamente conservada desde *C.elegans* hasta mamíferos (Daigle and Li, 1993; Rosen et al., 1989; Wasco et al., 1993). El fundador de la familia es el gen humano amyloid protein precursor (*APP*), clonado hace mas de 20 años (Kang et al., 1987). Poco después se encontraron dos genes que codifican las proteínas homologas APP-like protein-1 y -2 (*APLP1* y *APLP2*). Mientras que *APP* se ha encontrado en pez raya, pez globo, anfibios, pájaros, roedores y primates; *APLP1* y *APLP2* solo se ha encontrado en mamíferos (primates y roedores). Los genes de *D.melanogaster* y *C.elegans* parecen formar un linaje separado y ancestral al de los otros (figura 10; Coulson et al., 2000)

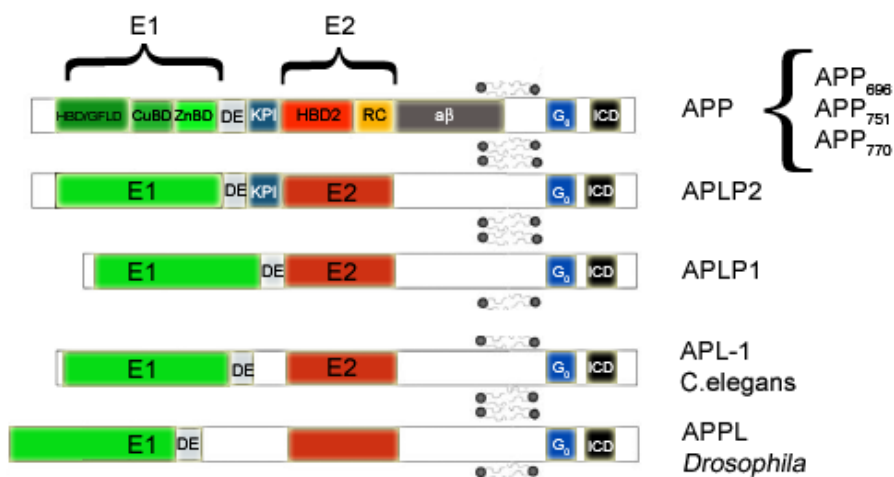
Miembro de la familia APP	Nombre Común	Nombre	Genebank	Referencia
<i>H. sapien APP</i>	Humano	HsAPP	Y00264	(Kang et al., 1987)
<i>H. sapien APLP1</i>	Humano	HsAPLP1	U48437	(Paliga et al., 1997)
<i>H. sapien APLP2</i>	Humano	HsAPLP2	S60099, L27631	(Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1993)
<i>Macaca fascicularis APP</i>	Mono	MfAPP	M58727	(Podlisny et al., 1991)
<i>Murine APP</i>	Ratón	mAPP	M18373, X59379	(Yamada et al., 1987; De Strooper et al., 1991)
<i>Murine APLP1</i>	Ratón	mAPLP1	L04538	(Wasco et al., 1992)
<i>Murine APLP2</i>	Ratón	mAPLP2	U15571, L04538	(Slunt et al., 1994; Wasco et al., 1992)
<i>Rattus APP</i>	Rata	Rapp	X07648, X14066	(Shivers et al., 1988; Kang and Muller-Hill, 1989)
<i>Rattus APLP2</i>	Rata	rAPLP2	X77934, M31322	(Sandbrink et al., 1994c; Yan et al., 1990)
<i>Xenopus APP</i>	Rana	XIAPP	S52417	(Okado and Okamoto, 1992)
<i>Gallus APP (partial)</i>	Gallina	chAPP	AF289218, AF289219	(Carrodeguas et al. 2005)
<i>Fugu rubripes</i>	Pez Globo	FrAPP	AF023420	(Villard et al., 1998)
<i>Tetraodon fluviatilis</i>	Pez Globo	TfAPP	AF018165	(Villard et al., 1998)
<i>Narke japonica</i>	Pez Raya	NJAPP	AB005544	(Iijima et al., 1998)
<i>Danio rerio APPa</i>	Pez Zebra	DrAPPb	NM_131564	(Musa et al., 2001)
<i>Danio rerio APPb</i>	Pez Zebra	DrAPPa	NM_152886	(Musa et al., 2001)
<i>Drosophila melanogaster APPL</i>	Mosca	DmAPPL	J04516	(Rosen et al., 1989)
<i>C. elegans APL-1</i>	Gusano	CeAPL	U00240	(Daigle and Li, 1993)



**Figura 10. Conservación de la familia APP.** Arriba tabla de algunos de los miembros descritos de la familia APP en distintos organismos. Abajo, relación filogenética basada en las secuencias de algunos de estos miembros procedente del análisis realizado por Coulson y colaboradores. En verde se han agrupado los genes *APLP1*, en rojo los genes *APLP2* y en gris los genes *APP*. *Appl* y *APL-1* forman un grupo separado y ancestral al resto de la familia. (adaptado de Coulson et al., 2000)

## Dominios proteicos

Todos los miembros de la familia APP son proteínas integrales de membrana del tipo 1, con un único dominio transmembrana, una amplia región extracelular (N-terminal) y un pequeño dominio citoplasmático (C-terminal), que pueden dividirse en múltiples subdominios (Figura 11). Dentro de la parte extracelular encontramos dos dominios muy conservados E1 y E2. Por un lado E1 contiene una región de unión a heparina o dominio growth factor-like (HFBD / GFLD), un dominio *copper-binding* (CuBD) y un dominio *Zinc-binding* (ZnBD). La región E1 está seguida por un dominio ácido rico en ácido aspártico y ácido glutámico (DE) y un dominio Kunitz inhibidor de proteasa (KPI; no presente en APP<sub>695</sub>). La región E2 contiene de nuevo el dominio HFBD / GFLD y una región *random-coiled* (RC). Dentro de la parte citoplasmática se encuentra el motivo de interacción con proteína YENPTY que a su vez incluye la señal de internalización NPXY, ambas conservadas en todos los homólogos de APP. Las secuencias proteicas de los homólogos pueden dividirse en dominios similares a los de APP (Figura 11).



**Figura 11. Los dominios proteicos de familia APP.** Estructura de las proteínas de la familia APP y sus principales dominios. (adaptado de Jacobsen and Iverfeldt, 2009)

Hay tres isoformas de APP en mamíferos: APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub> y APP<sub>770</sub>. La principal diferencia a nivel proteico entre las isoformas es el dominio KPI, ausente en la isoforma APP<sub>695</sub>. Además, APP<sub>695</sub> también se distingue del resto de isoformas por estar presente preferentemente en células de origen

neuronal, cuando el resto de isoformas se expresan de forma ubicua. De manera similar, la proteína APLP1 tampoco contiene el dominio KPI y su expresión también está restringida al sistema nervioso. Por el contrario, APLP2 si contiene el dominio KPI y se expresa de forma ubicua como las isoformas APP<sub>751</sub> y APP<sub>770</sub> (revisado por Jacobsen and Iverfeldt, 2009)

El homólogo en *Caenorhabditis elegans* APL-1 se expresa en múltiples tejidos (Hornsten et al., 2007), mientras que la proteína de *Drosophila* Appl es exclusiva del sistema nervioso y especialmente abundante en axones en crecimiento y en áreas de formación de sinapsis (Luo et al., 1990; Torroja et al., 1996). Además la isoforma de mamífero APP<sub>695</sub> es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo de comportamiento de la pérdida de función de *Appl* descrito en (Luo et al., 1992) indicando que la función de estas dos proteínas se ha conservado, al menos parcialmente.

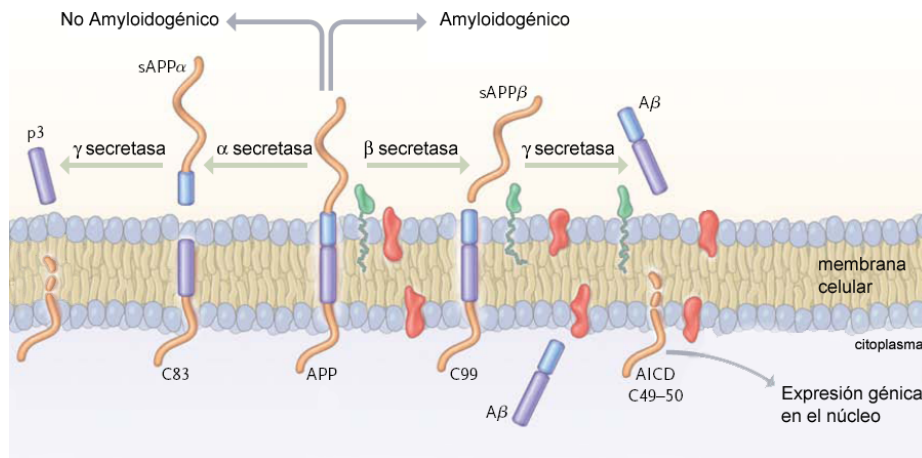
## Procesamiento proteolítico

Toda la familia APP es susceptible de experimentar escisión proteolítica, aunque el procesamiento de APP ha sido el mejor estudiado. Este procesamiento puede seguir dos caminos separados que se conocen como vía amiloidogénica, porque conduce a la generación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $a\beta$ ), y vía no amiloidogénica, que impide la producción de  $a\beta$  (figura 12).

El procesamiento amiloidogénico de APP se inicia a través de la  $\beta$ -secretasa (BACE), que produce la segregación de una amplia región extracelular, sAPP $\beta$ . El péptido restante puede ser posteriormente procesado por la  $\gamma$ -secretasa liberando por un lado el péptido  $a\beta$  y por otro el dominio intracelular (AICD). En la vía no amyloidogénica, APP se procesa mediante la  $\alpha$ -secretasa (ADAM) que corta APP dentro de la región  $a\beta$  y libera la región extracelular sAPP $\alpha$ . El fragmento restante también puede ser procesado por la  $\gamma$ -secretasa dando lugar a un pequeño péptido (P3) y al dominio intracelular AICD. La  $\gamma$ -secretasa es un complejo proteico transmembrana dependiente de presinilinas que corta el sustrato por una secuencia específica presente en la región transmembrana de APP y libera el dominio citoplasmático AICD que se transloca al núcleo y activa la transcripción (revisado en Querfurth and LaFerla, 2010).

Appl, el homólogo de APP en *Drosophila*, también es procesable y se sabe que libera una forma secretable (Luo et al., 1990; Torroja et al., 1996). En un estudio reciente, los autores muestran el potencial de Appl de ser cortado por los homólogos en *Drosophila* de las proteasas ADAM, BACE y presinilinas (Carmine-Simmen et al., 2009). Sin embargo los productos de

estos cortes no se encuentran en individuos de tipo salvaje. También es importante comentar que la región de App1 que corresponde al péptido  $a\beta$  no guarda homología con el péptido de humano (Bilen and Bonini, 2005; Coulson et al., 2000).



**Figura 12. El procesamiento proteolítico de APP.** Representación esquemática del procesamiento amyloidogénico y no amyloidogénico de APP. (adaptado de Querfurth and LaFerla, 2010)

## Enfermedad de Alzheimer

Tanto los cortes por las distintas secretasas como los productos de estos cortes que se generan en el procesamiento de la proteína APP, tienen lugar en condiciones fisiológicas normales, sin embargo, la acumulación del péptido  $A\beta$  formando placas amiloides es una de las marcas características asociadas con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Se considera que la acumulación de  $a\beta$  es la causa de la formación de marañas neurofibrilares, pérdida de células, daño vascular y demencia (Hardy and Higgins, 1992). Esta hipótesis, que propone un origen amyloidogénico de la enfermedad de Alzheimer, se apoya en la presencia de mutaciones tanto en *APP* como en *presinilinas* que aumentan la producción y/o la acumulación del péptido  $a\beta$ , en pacientes con Alzheimer familiar.

La expresión aberrante de APP también se ha asociado con la enfermedad (Koo et al., 1990; Palmert et al., 1988). Parece ser que la sobreexpresión de *APP* es la responsable de la aparición temprana de Alzheimer en pacientes con síndrome Down o trisomía del cromosoma 21 (cromosoma que contiene el gen *APP*) (Rumble et al., 1989) y se ha

observado que el incremento de la transcripción de *APP* subyace algunos casos de Alzheimer familiar (Querfurth et al., 1995)

Un gran número de estudios otorgan a APP un papel central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y por ello ha sido foco de una intensa investigación que se mantiene viva hasta la fecha.

## Función de la familia APP

La función biológica exacta de APP y de sus homólogos es todavía desconocida. Sin embargo, varios estudios *in vitro* e *in vivo* aportan algunas evidencias de que APP está involucrado en varios procesos relacionados con el sistema nervioso adulto y en desarrollo. Por ejemplo, la adhesión celular, supervivencia neuronal, crecimiento de neuritas, sinaptogénesis, transporte vesicular, migración neuronal, modulación de plasticidad sináptica y homeostasis de insulina y glucosa. En este apartado se explican algunas de estas funciones haciendo especial hincapié en las aportaciones al campo de los estudios realizados en *Drosophila*.

### Supervivencia neuronal y apoptosis

Las diferentes vías de procesamiento de APP dan lugar a fragmentos que en ocasiones tienen funciones opuestas. El fragmento soluble sAPP $\alpha$  que se genera por el corte de la  $\alpha$ -secretasa, incrementa la supervivencia neuronal y previene la muerte celular. Este efecto neuroprotector se ha observado en diferentes estudios realizados con células en cultivo (Araki et al., 1991; Goodman and Mattson, 1994), pero también en *Drosophila*, donde los fragmentos sAPP $\alpha$  procedentes del procesamiento del APP humano o del propio Appl, protegen de la neurodegeneración (Wentzell et al., 2012). Por el contrario, el fragmento citoplasmático AICD, induce apoptosis cuando se sobreexpresa en células de neuroglioma humano y en células de teratocarcinoma de ratón (Kinoshita et al., 2002; Nakayama et al., 2008).

Por lo tanto, una tendencia mayor del procesamiento amyloido génico de APP podría tener como efecto no solo el incremento del riesgo de apoptosis mediado por AICD si no también la pérdida de las capacidades neuroprotectoras del fragmento sAPP $\alpha$ , además de la producción del péptido a $\beta$ . Es interesante mencionar que los niveles de sAPP $\alpha$  son inferiores en pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con individuos sanos.

### Plasticidad sináptica y transporte axonal

Varios estudios en cultivos celular y en sistemas *in vivo* han demostrado que APP y especialmente el fragmento sAPP $\alpha$ , están involucrados en los procesos de excitabilidad neuronal y plasticidad sináptica (Fazeli et al., 1994)

En *Drosophila*, Appl no es necesaria para el aprendizaje, pero está específicamente involucrada en la memoria a largo plazo, una memoria de larga duración cuya formación requiere la síntesis de proteínas de novo y probablemente plasticidad sináptica (Goguel et al., 2011). Estos datos apoyan la hipótesis de que la alteración de la función normal de APP puede contribuir al deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer.

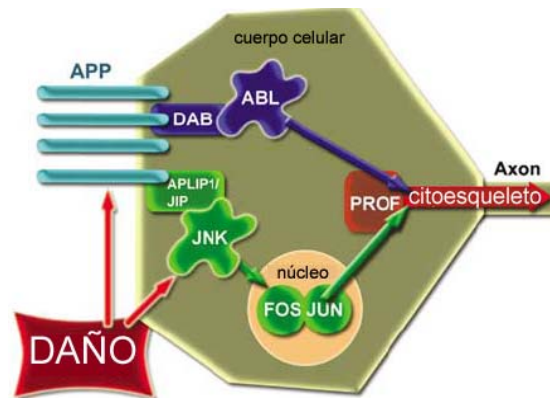
También en *Drosophila* se ha observado que Appl promueve la diferenciación sináptica de botones (Torroja et al., 1999b) y que media en el proceso de remodelación sináptica de estos (Ashley et al., 2005). Así como también parece estar involucrada en el transporte vesicular a través de unión con la proteína motora Kinesin-1 y/o con Tau (Gunawardena and Goldstein, 2001; Li et al., 2004; Torroja et al., 1999a).

### Adhesion celular y crecimiento de neuritas

Varios estudios han indicado que APP participa en la adherencia celular, modulando la adhesión al sustrato o uniéndose a componentes de la matriz extracelular (Narindrasorasak et al., 1992; Schubert et al., 1989), unión que además estimula el crecimiento de neuritas en cultivos celulares y en neuronas del hipocampo de ratones (Small et al., 1994). En *Drosophila* Leyssen y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de APP o la de Appl, promueven la arborización axonal tras la inducción de daño cerebral en neuronas adultas y que además, los niveles de Appl incrementan tras la inducción del daño, como se había descrito que incrementa APP en cerebros de mamífero (Leyssen et al., 2005). Esta función de APP/AppI es dependiente de la presencia del motivo de interacción con proteína YENPTY en el dominio C-terminal, y requiere de interacción con la quinasa Abelson (Abl), y la vía JNK. Abl es una tirosina quinasa citoplasmática que ejerce de nexo entre señales extracelulares y cambios en la adhesión celular y el citoesqueleto de actina (Lanier and Gertler, 2000), mientras que la vía JNK se sabe que es crucial en los procesos de reparación después de la axotomía en mamíferos. Los autores proponen un modelo (Figura 13) que integra sus resultados con algunas de las interacciones previamente descrita entre APP/AppI y Disabled-1 (Dab), que actúa como una proteína adaptadora de Abl y entre APP/AppI y APLIP1/JIP que actúa como proteína adaptadora de



JNK (Matsuda et al., 2001; Merdes et al., 2004; Taru et al., 2002; Trommsdorff et al., 1998)



**Figura 13. AppI está involucrado en el crecimiento axonal.** Tras un daño agudo incrementan por un lado los niveles de expresión de AppI y de manera independiente, pero simultánea, se activa la vía JNK. JNK activa la transcripción de diferentes elementos de regulación del citoesqueleto y provee de un ambiente permisivo para la remodelación. La regulación de Abl a través de APP asegura la regulación de estos componentes que resulta en una respuesta apropiada tras el daño axonal. (adaptado de Leyssen et al., 2005)

#### Otras funciones: Desarrollo de órganos mecano-sensoriales

Mediante experimentos de pérdida y ganancia de función, Merdes y colaboradores demostraron que los miembros de la familia APP: APLP1, APLP2, AppI y el propio APP, influyen en el desarrollo de los órganos mecano-sensoriales de *Drosophila*. En este estudio muestran por primera vez una posible interacción genética de *AppI* con la molécula de adhesión celular *Neurotactina (Nrt)* (Merdes et al., 2004). Neurotactina es un receptor transmembrana que interacciona genéticamente con la quinasa Abl en procesos de guía de axones (Liebl et al., 2003). Sin embargo, el papel de *Nrt* en el desarrollo de los órganos mecano-sensoriales, parece ser independiente de Abl.

#### La familia APP y la vía Ras

Se cree que la sobreexpresión de *APP* contribuye al incremento de la producción de los depósitos  $a\beta$  y en consecuencia a la activación de procesos de degeneración celular (Calhoun et al., 1999; Yoshikawa et al.,



1992). Entender cómo se regula la transcripción de *APP* podría, por lo tanto, dar alguna pista de cómo se desarrolla la enfermedad de Alzheimer.

La relación de la vía Ras con la expresión de *APP* se ha planteado en diferentes estudios. En células PC12, una línea celular de feocromocitoma de rata, la diferenciación neuronal inducida por el Factor de crecimiento nervioso (NGF) (Greene, 1978), está acompañada de un incremento en los niveles de expresión del mRNA de *APP*. Los efectos de NGF igual que los de otros factores de crecimiento como FGF o EGF están mediados por receptores tirosina quinasa que como DER o Sev tras la unión del ligando correspondiente estimulan la cascada de señalización Ras/MAPK. En consecuencia, el incremento de la expresión de *APP* mediado por NGF se bloquea en presencia de un mutante dominante negativo de *Ras* (Cosgaya et al., 1996; Villa et al., 2001). La vía de Ras también se ha visto relacionada con la expresión de *APP* en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. En esta línea celular el Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) estimula la actividad del promotor de *APP* en células que expresan el receptor tirosina quinasa-B (TrkB). De manera similar a lo que ocurre en células PC12 la estimulación del promotor de *APP* se bloquea en presencia de dominantes negativos de *Ras* (Ruiz-Leon and Pascual, 2001; Ruiz-Leon and Pascual, 2004). También la combinación de Acido retinoico (AR) y BDNF induce la actividad del promotor de *APP* en células SH-SY5Y sin necesidad de expresar TrkB de manera ectópica (Ruiz-Leon and Pascual, 2003)

En los estudios realizados *in vivo* existe cierta controversia ya que NGF incrementa los niveles de mRNA de *APP* en cerebros de hámster pero en cerebros de rata no tiene ningún efecto (Forloni et al., 1993; Mobley et al., 1988; Neve et al., 1996).

En resumen, a pesar de las observaciones *in vitro*, se requieren otros modelos para demostrar que Ras regula *APP in vivo*. Este será uno de los puntos fundamentales de esta tesis en la que usando el modelo de los fotorreceptores de la retina de *Drosophila* exploraré la posibilidad de que Ras1 regule directamente *App1*.

## OBJETIVOS



Los **objetivos principales** de esta tesis han sido:

- a) Conocer el programa transcripcional activado por la vía de Ras1 en el fotorreceptor R7 y seleccionar un gen candidato para un estudio monográfico.
- b) Estudiar a fondo la relación del candidato con la vía de Ras1 y su función en el fotorreceptor R7.

El candidato seleccionado ha sido el gen  *$\beta$ -amyloid protein precursor-like (Appl)*.

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

- Obtener el transcriptoma del gen *sevenless* mediante experimentos de microarrays.
- Identificar los posibles targets directos mediante búsqueda *in silico* de secuencias ETS.
- Validar los resultados obtenidos en los microarrays relativos a gen *Appl*.
- Realizar un estudio detallado de la expresión de *Appl* en disco imaginal de ojo.
- Analizar la expresión del gen *Appl* en relación a la vía de Ras1.
- Estudiar la función de *Appl* en el fotorreceptor R7.



## MATERIALES Y MÉTODOS



# 1. Materiales

La mayoría de reactivos utilizados en la realización de los experimentos son de calidad analítica y provienen de las casas comerciales Merck, Fluka y Sigma. Los enzimas son de Promega (salvo que se indique lo contrario)

## Cepas bacterianas

Para la manipulación de ADN plasmídico hemos utilizado células competentes de *Escherichia coli* DH5α.

## Plásmidos empleados

pUASTattB (Dr. K.Basler)  
placZattB (Dr. K.Basler)  
pBluescript SK (+/-) (Stratagene)

## Plásmidos generados

**pUASTattB /HA-PntP2.** A partir de una extracción de RNA de moscas *wt* y posterior retrotranscripción se amplificó el cDNA de *PntP2* con los oligos KpnI-Pnt\_Fw e XbaI-Pnt\_Rv. El epítipo HA se amplificó a partir del plásmido pBluescript SK/ Ash2-HA (cedido por la Dra. M.Angulo) con los oligos EcoRI-HA\_Fw y Xho-HA\_rv. Cada fragmento se digirió con las enzimas KpnI-XbaI y EcoRI-Xho respectivamente y se clonó en las dianas correspondientes del vector pUASTattB.

**placZattB /ETS1.** A partir de una extracción de DNA genómico de moscas *wt* se amplificó un fragmento de 500 pb con los oligos ETS1\_Fw\_lacZ y ETS1\_Rv\_lacZ con la polimerasa High fidelity (Promega) que deja extremos romos. Todo el fragmento se clonó en el plásmido PBluescript previamente digerido con la enzima EcoRV que deja extremos romos. Posteriormente este plásmido se digirió con las enzimas HindIII e XbaI y el fragmento obtenido se clonó en el plásmido PlacZattB previamente digerido con las mismas enzimas.

**placZattB /ETS2** A partir de una extracción de DNA genómico de moscas *wt* se amplificó un fragmento de 500 pb con los oligos ETS2\_Fw y ETS2\_Rv con la polimerasa High fidelity (Promega) que deja extremos romos. Todo el fragmento se clonó en el plásmido PBluescript previamente digerido con la



enzima EcoRV que deja extremos romos. Posteriormente este plásmido se digirió con las enzimas HindIII e XbaI y el fragmento obtenido se clonó en el plásmido PlacZattB previamente digerido con las mismas enzimas.

**placZattB /ETS3** A partir de una extracción de DNA genómico de moscas *wt* se amplificó un fragmento de 500 pb con los oligos ETS3\_Fw y ETS3\_Rv con la polimerasa High fidelity (Promega) que deja extremos romos. Todo el fragmento se clonó en el plásmido PBluescript previamente digerido con la enzima EcoRV que deja extremos romos. Posteriormente este plásmido se digirió con las enzimas HindIII e XbaI y el fragmento obtenido se clonó en el plásmido PlacZattB previamente digerido con las mismas enzimas.

**placZattB /ETS4** A partir de una extracción de DNA genómico de moscas *wt* se amplificó un fragmento de 500 pb con los oligos ETS4\_Fw y ETS4\_Rv con la polimerasa High fidelity (Promega) que deja extremos romos. Todo el fragmento se clonó en el plásmido PBluescript previamente digerido con la enzima EcoRV que deja extremos romos. Posteriormente este plásmido se digirió con las enzimas HindIII e XbaI y el fragmento obtenido se clonó en el plásmido PlacZattB previamente digerido con las mismas enzimas.

**pBluescript SK /Appb.** A partir de una extracción de RNA de pez zebra de 6 días y posterior retrotranscripción se amplificó un fragmento de 1557 pb del cDNA de *Appb* con los oligos Appb\_Fw y Appb\_Rv con la polimerasa KOD Hot Start (millipore) que deja extremos romos. Todo el fragmento se clonó en el plásmido PBluescript previamente digerido con la enzima EcoRV que deja extremos romos.

## Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos han sido sintetizados por Sigma (tabla 1).

Nombre	Secuencia	Experimento
ETS4_FW	5' AGTTGCTGCTTGCCTCGTG	Trangénico-lacZ
ETS4_RV	5' ATCCCGAGGAGGCATGAG	Trangénico-lacZ
ETS1_Fw_lacZ	5' CATTCTCTCGACTTGCCTGC	Trangénico-lacZ
ETS1_RV_lacZ	5' AAAACACAGCCGAAAATGC	Trangénico-lacZ
ETS1_Fw_chip	5' TTCTTCTGACCCACTGCTC	chipPCR
ETS1_Rv_chip	5' GATGAGGGTACGCTGGTAG	chipPCR
ETS2_Fw	5' CCGAGTGTGTGAGCGTGAG	Trangénico-lacZ, ChipPCR
ETS2_Rv	5' AAGCTCTGGACTACGAATGG	Trangénico-lacZ, ChipPCR
ETS3_Fw	5' GATGAATTTTCCTTGCCTCG	Trangénico-lacZ
ETS3_Rv	5' TAAGATATACATAAGAACG CTGC	Trangénico-lacZ
KpnI-Pnt_Fw	5' ATAGGTACCGAATTGGCGAT TTGTA AACAG	Trangénico-UAS- PntP2-HA
XbaI-Pnt_Rv	5' TATTCTAGACTAATCCACAT ACTTTTTTCTC	Trangénico-UAS- PntP2-HA
EcoRI-HA_Fw	5' AAGGAATTCATCGATCAGCT ACCCATACG	Trangénico-UAS- PntP2-HA
Xho-HA_Rv	5' AGACTCGAGGCCCGCGTAA TCTGGAACG	Trangénico-UAS- PntP2-HA
Appb_Fw	5' CAATGATGGGAATAGACAGC	Sonda D.rerio
Appb_Rv	5' CTGTTGCCGAGAATGAAGC	Sonda D.rerio

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados.** Se indica la secuencia y los experimentos en los que se han utilizado.

## Cepas de *Drosophila melanogaster*

Las moscas utilizadas en este trabajo se han cultivado en cámaras climáticas a una temperatura de 25° y con medio de *Drosophila* (Carolina Biological Supply) suplementado con levadura. En la tabla 2 se indican las diferentes líneas utilizadas, así como su procedencia.

Línea	Procedencia
Cantón	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)
ywhsFlp; FRT82BubiGFP/TM6B	BDSC
w,hsFlp; Act FRTy <sup>+</sup> FRT,Gal4::UAS-GFP	Cedido por el Dr. E.Moreno
sev <sup>S11</sup>	Cedido por el Dr. E.Hafen
sev-Gal4sev <sup>S11</sup> /TM6B	Cedido por el Dr. E.Hafen
sev <sup>d2</sup>	Cedido por el Dr. E.Hafen
UAS-DER <sup>DN</sup>	Cedido por el Dr. H.Stocker
UAS-Ras <sup>V12</sup> /cyO	Cedido por el Dr. E.M.Blanco
FRT82B Ras <sup>C.140b</sup> /TM6c	Cedido por el Dr. G.Jimenez
FRT82B Pnt <sup>188</sup> /TM3	Cecido por el Dr. J.Casanovas
Df(1)y	Cecido por la Dra. L.Torroja
AppI <sup>d</sup>	Cedido por la Dra. L.Torroja
Fra <sup>3</sup> /cyO-GFP	Cedido por la Dra. M.Morey
fas3 <sup>E25</sup> /cyO act-lacZ	Cedido por la Dra. M.Morey
w;FRT40 CadN <sup>m19</sup> Gal80/cyO	Cedido por la Dra. M.Morey
UASfos <sup>c-ala</sup>	Bohmann
Df(1)w;UASAppI/cyO	Cedido por la Dra. L.Torroja
Df(1)W/Ym52y+	Cedido por la Dra. L.Torroja
SevNotch <sup>act</sup>	Artavanies-Tsakonas

**Tabla 2.** Líneas de *Drosophila* utilizadas. Se indica el genotipo y su procedencia.

## Cepas de *Danio rerio*

Las líneas wt y *Tg(hsp70:ca-fgfr1)* han sido cedidas y mantenidas en condiciones estándar por la Dra. Berta Alsina.

## Anticuerpos

En la tabla 3 se indican los anticuerpos utilizados, junto con sus características y procedencia.

A. Primarios	Características	Procedencia
anti-GFP	Conejo; IQ: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
anti- $\beta$ -galactosidase	Conejo; IQ: 1:1000	Cappel
anti- $\beta$ -galactosidase	Cabra; IQ: 1:1000	Dr. J.Casanovas
anti-prospero	Ratón; IQ: 1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
anti-chaoptin	Ratón; IQ: 1:10	DSHB
anti-senseless	Cobaya; IQ: 1:800	Dr. H.Bellen
anti-App1	Conejo; IQ: 1:1600	Dr. L.Torroja
anti-HA	Conejo; IQ: 1:200, Chip: 1:100	Abcam
Anti-digoxigenina-AP	Ratón; ISH 1:2000	Roche
A. Secundarios	Características	Procedencia
Asno-anti-Conejo	AlexaFluor 555; 1:200	Invitrogen
Cabra-anti-Conejo	AlexaFluor 488; 1:200	Invitrogen
Cabra-anti-Conejo	FITC; 1:200	Jackson
Asno-anti-Ratón	AlexaFluor 555; 1:200	Invitrogen
Cabra-anti-Ratón	AlexaFluor 488; 1:200	Invitrogen
Asno-anti-Cabra	FITC; 1:200	Jackson
Asno-anti-Cobaya	Cy5; 1:200	Jackson
Conejo-anti-Ratón	In situ	

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados.** En las características, se especifica las concentraciones utilizadas Para los diferentes ensayos (IQ: inmunohistoquímica, ISH hibridación *in situ* o Chip).

## 2. Métodos

### 1. Técnicas de manipulación de DNA plasmídico

Las técnicas de DNA recombinante empleadas en este trabajo se encuentran descritas por Sambrook (Sambrook and Russell, 1989)

#### 1.1 Transformación de células competentes

Incubar las células DH5 $\alpha$  con la ligación (10-30 $\mu$ l) durante 20 minutos en hielo. Seguidamente se realiza un choque térmico de 1 minuto a 42°C y se vuelve a dejar en hielo 2 minutos. Se añade 1 ml de *medio Luria-Bertani Broth* (LB) (10g/l tiptona, 5g/l extracto de levadura, 10g/l NaCl, 1mM NaOH) precalentado y se incuba a 37°C durante 30-60 minutos. Después se plaquea la transformación en placas de LB con antibiótico y se incuba toda la noche a 37°C.

#### 1.2 Obtención de DNA plasmídico: Lisis Alcalina

Inocular 3ml de medio LB con antibiótico con una colonia aislada. Dejar crecer toda la noche a 37°C. Pasar 1,5 ml de cultivo a un eppendorf y centrifugar a 9000 rpm durante 1 minuto. Sacar el sobrenadante y resuspender en 100  $\mu$ l de GTE (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCL pH 8.0) y pasar por vortex. Añadir 200  $\mu$ l de solución 0,2 N NaOH 1% SDS, invertir dos o tres veces y dejar en hielo durante 5 minutos. Añadir 150  $\mu$ l de acetato sódico 3M, agitar i dejar en hielo 5 minutos. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm i pasar el sobrenadante a un eppendorf nuevo. Añadir 450  $\mu$ l de fenol-cloroformo, pasar por vortex y centrifugar 3 minutos a 14000 rpm. Recuperar la fase acuosa superior y añadir 1 ml de etanol 100% frío. Invertir 2 o 3 veces y centrifugar 5 minutos a 14000 rpm. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 300  $\mu$ l de etanol frío al 70%. Centrifugar 3 minutos a 1400 rpm, descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet a 37°C. Resuspender el pellet en 50  $\mu$ l de TE (10 mM Tris HCL pH 8.0, 1 mM EDTA).

Para la obtención de DNA plasmídico también se ha utilizado un Kit comercial, Mini Prep Kit 50 (Qiagen), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

## 2. Técnicas de análisis de ADN

### 2.1 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 (ej.. genómico plásmidico, cDNA). Consiste en un proceso cíclico de desnaturalización, unión de oligonucleótidos 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 (ej..  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ . 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), Oligonucleótidos (secuencias de cortas de DNA complementarias as los extremos de la región que se quiere amplificar), tampón de la reacción (solución con la concentración optima 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 Tampón de la reacción (1X) $MgCl_2$ 2,5 mM dNTPs 0,4 mM primers 0,5 pmol/ $\mu$ l DNA polimerasa 0,05 U/ $\mu$ l	2' 95°C 30x { 1' 95°C desnaturalización 1' 55°C unión de los óligos 1' 72°C amplificación 10' 72°C

**Tabla 4.** reactivos y los ciclos de una reacción de PCR estándar

## 2.2 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La técnica de ChIP permite determinar si una determinada proteína se localiza sobre una región de ADN concreta. En este trabajo hemos realizado Chips para analizar la localización de PntP2-HA sobre el DNA a partir de 500 discos imaginales de ojo del genotipo *w; sev<sup>S11</sup>sev-Gal4 /UAS-PntP2-HA*.

El proceso puede dividirse en varios pasos:

### Fijación

5 incubaciones de 5 minutos con solución de crosslinking (1,8% de formaldehído, 50mm Hepes pH 8, 1mm EDTA, 0,5 mMvEGTA, 100 mM NaCl). Luego se detiene la fijación con solución Stop durante 10 minutos (PBS, 0,01% Tritón X-100, 0.125 M glicina, la glicina inactiva los restos de formaldehído). Finalmente se realiza un lavado de 10 minutos con tampón A (10mm Hepes 8, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% Tritón X-100) y otro lavado de 10 minutos con tampón B (10mm Hepes 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 200 mM NaCl, 0,01 Tritón X-100).

### Sonicación

Antes de proceder a la sonicación se centrifuga la muestra 1 minuto a 8000 rpm, se descarta el sobrenadante y se añade el tampón de sonicación hasta un volumen de 500 µl (1% SDS, 50 mM Tris HCL pH 8, 10mm EDTA). La sonicación se realiza en nueve pulsos con una amplitud del 35% en un sonicador Branson. Después de la sonicación se centrifuga la muestra durante 30 minutos a 14000 rpm a 4°C para descartar las impurezas que se quedarán en el pellet. El sobrenadante se distribuye en alícuotas de 200 µl por muestra, 20 µl para el input y los 80 µl restantes para el control de la sonicación.

### Inmunoprecipitación

Se realiza un prelavado antes de la inmunoprecipitación añadiendo tampón IP a cada muestra hasta alcanzar un volumen de 1ml (1% tritón, 150 mM NaCl 2mM EDTA 20 mM Tris HCl pH 8.0, PMSF 2µl/ml, aprotinina 2µl/ml), y 35 µl de proteínaA-sefarosa (GE-healthcare) y se incuba durante una hora en rotación a 4°C. después se centrifuga la muestra 2 minutos a 3000 rpm y se recoge el sobrenadante en un eppendorf nuevo al que luego se añade 2µg de anticuerpo y se incuba toda la noche a 4°C en rotación. Como control negativo se incuba una muestra sin anticuerpo. Posteriormente se incuban las muestras con 30µl de proteína A-sefarosa (previamente bloqueada

durante 2 horas en tampón IP suplementado 1% de BSA) durante 3-4 horas a 4°C y en rotación.

### **Lavados**

Se realizan rondas de centrifugación (2 minutos 3000 rpm), descartado de sobrenadante, y lavado durante 10 minutos a 4°C y en rotación con : 1 ml de tampón IP durante 5 rondas, un sexto lavado con tampón de litio (0,25 M LiCl, 0,5% NP40, 0,5% Na deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 8) y dos rondas más con TE (10 mM Tris HCL pH 8.0, 1 mM EDTA). Finalmente se resuspende en 100 µl de TE.

### **Decrosslinkado**

Todas las alícuotas: muestra, muestra control sin anticuerpo, input y control de sonicación, se incuban con RNAsa 50µg/ml durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente se incuban todas las alícuotas con 0,5% SDS y 500 µg/ml de proteinasa K, durante toda la noche a 65°C.

### **Purificación**

Una vez descrosslinkadas, las muestras se purifican por columna mediante un kit de purificación de DNA (Quiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El volumen final de la elución en H<sub>2</sub>O fue de 50µl.

### **Análisis**

El análisis de los chips se realizó por PCR, para ello se utilizó 2 µl de cada muestra y se amplificó con oligos específicos (detallados en la sección oligos). Las bandas de PCR se cuantificaron usando el software de Fujifilm MultiGauge.

## **2.3 Predicciones in silico: caracterización de promotores e intrones**

Para realizar la búsqueda de ETS en el grupo de genes candidatos procedente de los microarrays se analizaron 1000 pb *upstream* del sitio de inicio de transcripción y las secuencias de los intrones de los 233 *genes diana*, de acuerdo a las anotaciones RefSeq del *Genome Browser UCSC* (Kuhn et al., 2007). Para la búsqueda de ETS en estas secuencias se utilizó el programa MatScan (Blanco et al., 2006) aplicando los modelos de predicción de ETS de Jaspar (Portales-Casamar et al., 2010) y Transfac (Matys et al., 2003). Las predicciones se introdujeron después en la página UCSC [<http://genome.ucsc.edu/>] que permite visualizar su posición a lo largo



del genoma de *D. melanogaster*. En esta misma página se utilizó el track de conservación (alineamiento múltiple de 12 especies de *Drosophila*), y se descartaron aquellas predicciones que no estaban conservadas (al menos hasta *D. pseudoobscura*).

### 3. Técnicas de análisis de RNA

#### 3.1 Extracción de RNA

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

#### 3.2 RT-PCR

Para realizar la retrotranscripción se incubó 1 µg de RNA con 0,5 µg de oligo-dt y 1 µl DNTPs 10mM, en un volumen final de 12 µl durante 5 minutos 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 µl de agua y una tercera incubación de 50 minutos a 37°C añadiendo 1 µl de M-MLV 200 U/µl (la transcriptasa reversa de Promega). Finalmente toda la muestra se incubó 15 minutos a 70°C.

#### 3.3 Microarrays de expresión

La hibridación y normalización de los microarrays fueron realizados previamente en el laboratorio. Los datos crudos y normalizados y diversos detalles sobre la hibridación pueden consultarse en la base de datos Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>] con el número de acceso GSE37793.

#### 3.4 Síntesis de sonda para hibridación *in situ*

La sonda *anti-App1* se sintetizó a partir del clon de *Drosophila* Gold Collection (GDC) GH04413 [<https://dgrc.cgb.indiana.edu/>], mientras que la sonda *anti-Appb* se sintetizó a partir del plásmido PBluescript/*Appb* descrito en la sección plásmidos generados del apartado de materiales.

Primero se linearizaron 10 µg de DNA plasmídico con la enzima EcoRI en ambos casos. El producto de la digestión se purificó con el kit Quiaquick PCR (Quiagen), se eluyó en 30 µl de H<sub>2</sub>O y se cuantificó con Nanodrop.

La transcripción se realizó durante 2-3 horas a 37°C con la polimerasa Sp6 para la sonda de *Appl* y T7 para la sonda *Appb*. En la tabla 5 se detallan los reactivos.

Reactivo	volumen
H <sub>2</sub> O	(until 20µl)
5x buffer de transcripción	4µl
DTT 0.1M	2µl
10x digoxigenin labelling mix	2µl
DNA linearizado	1µg
Polimera (Sp6 / T7)	2µl

**Tabla 5.** Reactivos y cantidades correspondientes utilizadas para la transcripción de sondas.

El producto de la transcripción se incubó con 2µl de DNAsa y buffer RDD 1x para eliminar el DNA plasmídico. Para purificar el RNA de la transcripción: Añadir 30µl H<sub>2</sub>O, 5µl 4M LiCl, 150µl EtOH -20°, 1µl tRNA y dejar 30 minutos a -80°C o toda la noche a -20°C. Centrifugar 20 minutos a 14000 rpm a 4°C, descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 150 µl de etanol 70% frío. Descartar nuevamente el sobrenadante y lavar con 100 µl de H<sub>2</sub>O 20 minutos a 37°C. Finalmente resuspender el pellet en H<sub>2</sub>O.

Las sondas de más de 500 pb de longitud se hidrolizaron con el siguiente protocolo: 20 µl de sonda, 30 µl de H<sub>2</sub>O y 50 µl de buffer carbonato 2X (120mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 80mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 10.2, guardar a -20C) incubado a 65°C durante 40 minutos. Luego añadir 100 µl de solución stop (acetato sódico 0.2M pH 6.0) y purificar de nuevo.

### 3.5 Hibridación *in situ*

#### *D.melanogaster in situ de Appl*

Para la hibridación *in situ* de discos imaginales de ojo de *Drosophila melanogaster* se ejecutó el siguiente protocolo:

#### Disección y fijación

Diseccionar las larvas en PBS 1X (125 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3), fijar 20 minutos en movimiento con 4% formaldehído (FA) en PBS 1X y volver a fijar 20 minutos en movimiento con 4 % FA en PBT (PBS 1X, Tween20 0,1%). Lavar con PBT tres veces durante 5 minutos.

**Deshidratación y rehidratación**

Tras la fijación se realiza una deshidratación progresiva con metanol al 50% durante 3 minutos y metanol 100% durante tres minutos. Luego se rehidrata la muestra progresivamente con metanol 50% durante 3 minutos y PBT durante tres minutos (en los casos en los que se combinó la hibridación *in situ* con inmunohistoquímica, se utilizó etanol en lugar de metanol).

**Tratamiento con proínasa K**

Tras la rehidratación se realizó una segunda fijación con FA 4% en PBT durante 20 minutos en agitación, tres lavados de 5 minutos con PBT y un lavado de 10 minutos con PBT. Después se realiza un tratamiento con proteinasa K 50 µg/ml en PBT durante 2 minutos, dos lavados durante 1 minuto con glicina 2 mg/ml en PBT, y dos lavados de un minuto con PBT. Nuevamente se fija la muestra durante 20 minutos con 4% FA en PBT y se hacen dos lavados con PBT durante 10 minutos.

**Pre-hibridación**

Para preparar la muestra para la hibridación se incubó en cámara a 55°C con 50 PBT/ 50 solución A (100µg/ml esperma de salmón desnaturalizado, 50µg/ml heparina, 50% Formamida, 5x SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate), 0.1% Tween20) durante 10 minutos y posteriormente con solución A durante 30-60 minutos.

**Hibridación con sonda *anti-App1***

Posteriormente se realiza la hibridación con la sonda *anti-App1* diluida en solución A (1:500) durante toda la noche a 55°C.

**Lavados**

Después de la hibridación se realizan cuatro lavados de 20 minutos a 55°C con solución B (50% Formamida, 5x SSC, 0.1% Tween20), después solución B/PBT 3:1, luego solución B/PBT 1:1, y finalmente solución B/PBT 1:3

**Incubación con anti-DIG**

Ya a temperatura ambiente se realizan cuatro lavados de 10 minutos con PBT y se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina durante 1,5 horas.

Posteriormente se hacen cuatro lavados de 10 minutos con PBT y tres lavados de 15 minutos con AP Buffer (100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH 9,5 añadir al momento Tween20 0,1%).

### **Revelado NBT/BCIP**

Ahora la muestra está preparada para el revelado y se ha de incubar con la mezcla de reacción (2µl NBT + 2µl BCIP + 600µl AP Buffer-Tween20 0,1%) a oscuras y sin agitación. Comprobar el estado de la reacción cada 10 minutos. Una vez la reacción ha alcanzado el punto óptimo lavar con PBT tres veces durante 10 minutos y montar con glicerol al 80%.

En los experimentos en los que la hibridación *in situ* se combinó con inmunohistoquímica (clones *flip-out*) las incubaciones de anti-digoxigenina y anti-GFP se realizaron de forma simultánea. La Incubación del anticuerpo secundario se realizó después del revelado con NBT / BCIP.

### ***D.rerio in situ de Appb***

Para la hibridación *in situ* embriones de pez zebra se ejecutó el siguiente protocolo:

#### **Fijación**

Los embriones se decorionaron mecánicamente antes de fijar con PFA (4% paraformaldehído en PBS 1X (125 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3)), luego se lavaron los embriones dos veces durante 5 minutos con PBT (PBS 1X, 0,1% Tween-20)

#### **Pre-tratamientos**

Deshidratar los embriones con metanol 100% durante 1 hora a -20°C y rehidratar progresivamente con etanol 75, 50 y 25% de metanol (10 minutos cada paso). Posteriormente se lavan los embriones dos veces durante 10 minutos con PBT.

#### **Proteinasa K**

Incubar los embriones con proteinasa K (10mg/ml, 1/1000 en PBT) durante 10 minutos para embriones de hasta 48 horas de desarrollo. Para embriones mayores de 48 horas incubar con proteinasa K durante 20 minutos. A continuación lavar 3 minutos con PBT y fijar con PFA 4% durante 40 minutos. Tras la fijación lavar dos veces durante 5 minutos con PBT.

#### **Prehibridación**

Antes de la hibridación se realiza una incubación durante 1 hora a 70°C con el buffer de hibridación (25 ml 100% formaldehído, 12,5 ml 20X SSC pH 4.5,

1ml 25mg/ml tRNA, 250 µl de 10mg/ml de heparina, 500 µl de 10% Tween-20, 125 µl de 1M ácido cítrico pH 6.0 y 10,5 ml de H<sub>2</sub>O)

#### **Hibridación con sonda anti-Appb**

A continuación se realiza la hibridación con la sonda diluida en solución de hibridación (1:80) toda la noche a 70°C

#### **Lavados**

Después de la hibridación se realizan 4 lavados de 20 minutos cada paso a 70°C con las siguientes soluciones:

Solución 1: 75% HYB (32,5ml 100% formaldehído, 12,5ml 20X SSC, 500 µl 10% Tween20, 4,5 ml H<sub>2</sub>O)

Solución 2: 50% HYB, 2X SSC

Solución 3: 25% HYB, 2X SSC

Solución 4: 2X SSC

Dos lavados durante 30 minutos con 0,5 X SSC y ya a temperatura ambiente dos lavados de 10 minutos con PBT.

#### **Incubación con anti-DIG**

Antes de realizar la incubación con anti-DIG se bloquea la muestra con BS (2%BSA, 10%NGS y 0,1%PBT) durante una hora. A continuación se incuba con el anticuerpo diluido en BS (1:4000) durante toda la noche a 4°C. Después de esta incubación se lava la muestra diez veces durante 10 minutos con PBT y tres veces durante 10 minutos con AP (100mM Tris-HCl pH. 9,5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl, 01% Tween-20 y 0,2% Triton X-100).

#### **Revelado NBT/BCIP**

Ahora la muestra está preparada para el revelado y se ha de incubar con la solución de revelado (45µl de NBT, 35 µl de BCIP en 10 ml de AP) a oscuras y sin agitación. Comprobar el estado de la reacción cada 10 minutos. Una vez la reacción ha alcanzado el punto óptimo lavar con PBT toda la noche y fijar 2 horas a temperatura ambiente con 4% PFA.

## **4. Técnicas de análisis de proteínas**

### **4.1 Inmunohistoquímica en discos imaginales y cerebros de larva III**

Disecionar en PBS 1X (125 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) estirando de la probóscide de las larvas para obtener mandíbulas unidas a los discos de ojo y al cerebro y fijar con paraformaldehído al 4% en PBS (15 -20 minutos en hielo). Realizar dos lavados de 5 minutos con PBS. A

continuación se puede realizar una segunda fijación mediante tres lavados de 5 segundos con metanol (si las muestras tienen GFP en lugar de metanol usar etanol y si se quiere observar una proteína de membrana es recomendable no realizar este paso). Seguidamente se bloquea la muestra durante una hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (BS: PBS 1X, 0,3% Tritón X-100, 2% BSA) y se incuba con el anticuerpo primario diluido en solución BS durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo se lava la muestra tres veces durante 10 minutos con PBT (PBS 1X, 0,3% Tritón X-100) y se vuelve a bloquear durante 30 minutos con BS para después incubar con el anticuerpo secundario diluido en BS durante 2-3 horas a temperatura ambiente y a oscuras. Después de la incubación con el anticuerpo secundario se lava la muestra tres veces durante 10 minutos con PBT también a oscuras y se monta la preparación en solución antifade en glicerol / PBS (SlowFade Antifade Kit; Invitrogen).

#### 4.2 Inmunohistoquímica en cerebros de pupa

La Inmunohistoquímica en cerebros de pupa es idéntica en protocolo a la de discos imaginales salvo por la disección. Para diseccionar cerebros de pupa hay que quitar la capa externa dejando al descubierto toda la cabeza. Una vez eliminada la envoltura introducir en PBS 1X (125 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3), identificar y quitar la probóscide, colocar una pipeta (p200) con punta transparente en el hueco que ha dejado la probóscide y succionar. El material succionado se expulsa en PBS limpio, de aquí se selecciona el cerebro y se fija con 4% paraformaldehído en PBS. El resto del protocolo es idéntico al descrito para discos imaginales.

#### 4.3 Inmunohistoquímica en cerebros de adulto

Para la disección de cerebros adultos hay que seleccionar individuos adultos de entre 1-3 días de edad. Los adultos seleccionados se colocan en etanol durante 2-3 minutos y luego se pasan a PBS 1X (125 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3). A continuación se separa la cabeza del resto del cuerpo y se elimina la probóscide. A través del hueco de la probóscide se introducen las pinzas y se va eliminando toda la cutícula de la cabeza dejando únicamente el cerebro. Para evitar que el cerebro flote durante la fijación o alguno de los pasos posteriores es importante quitar todas las tráqueas y sacos aéreos que rodean el cerebro. Una vez el cerebro está limpio de estas estructuras se fija con PLP (2% de paraformaldehído, 75 mM de lisina, 37 mM tampón fosfato de sodio, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lava dos veces durante 10 minutos con PBT (PBS

1X, 0,5% Tritón X-100) una vez con BS (PBS 1X, 0,5% Tritón X-100, 10% BSA o NGS) durante 10 minutos y una vez más durante 30-60 minutos para bloquear. Después se incuba la muestra con el anticuerpo primario diluido en BS durante toda la noche a 4°. Una vez se finalizada la incubación se lava con BS tres veces durante 10 minutos y una vez más durante 30 minutos para bloquear, después se incuba con el anticuerpo secundario diluido en BS durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación con secundario se realiza un lavado de 10 minutos con BS otro lavado de 10 minutos con PBT y un último lavado de 10 minutos con PBS. Los cerebros teñidos se montan uno por uno en portas independientes. En cada porta se coloca una gota de antifade Vectashield (Vector Laboratories) donde se sitúa el cerebro. Con ayuda de las pinzas se orienta en la misma posición anatómica. Se añade plastilina en cada una de las esquinas del cubreobjetos y se aproxima al porta hasta tocar levemente el cerebro con cuidado de no modificar la orientación.

## 5. Técnicas de análisis de mosaicos genéticos

Los mosaicos genéticos se definen como individuos compuestos por células con distintos genotipos. Son particularmente útiles para el estudio de procesos del desarrollo y de los genes implicados en estos procesos. Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado mosaicos genéticos mediante dos técnicas diferentes que se describen a continuación.

### 5.1 Twin clones

Esta técnica permite el estudio de una mutación letal en homocigosis más allá de su fase de letalidad (García-Bellido et al., 1973) y está basada en la recombinación mitótica inducida en células de un tejido heterocigoto. Uno de los sistemas que se ha introducido en *Drosophila* para generar *twin clones* es el sistema de recombinación sito específica de levadura FLP/FRT (Xu and Rubin, 1993) en el que dos secuencias FRT son capaces de recombinar en presencia de la enzima que cataliza esta recombinación; la Flipasa (FLP). El punto de partida de la técnica son individuos heterocigotos en los que en un cromosoma la secuencia FRT esta seguida de un marcador (en este caso GFP), mientras que en el cromosoma homólogo la secuencia FRT esta seguida de la mutación de interés. La Flipasa, codificada genéticamente y controlada mediante un promotor específico (en este caso un promotor inducible por calor), puede ser inducida para activar la recombinación mitótica. Esta recombinación dará lugar a dos células hermanas genéticamente diferentes: una de tipo salvaje con dos copias de GFP y otro

homocigota para la mutación sin GFP, embebidas en un tejido heterocigoto para la mutación y con una copia de GFP. Estas dos células al proliferar darán lugar a clones hermanos (*twin clones*) genéticamente diferentes.

Los genotipos utilizados para los experimentos de *Twin clones* y las condiciones en las que se realizaron los experimentos, están especificados en la tabla 6.

Genotipo	Condiciones choque térmico
ywhsFlp; FRT82BubiGFP/ FRT82B Ras <sup>CΔ40b</sup>	56 ± 12 horas AEL; 37°C; 42 minutos
ywhsFlp; FRT82BubiGFP/ FRT82B Pnt <sup>Δ88</sup>	56 ± 12 horas AEL; 37°C; 42 minutos

**Tabla 6. Genotipos utilizados para el análisis de *Twin clones*** Se especifica el momento en el que se ha inducido el choque térmico (AEL: número de horas después de la deposición de huevos) la temperatura y la duración.

## 5.2 Flip-out clones

Este sistema combina la técnica de recombinación específica FLP/FRT (ver apartado anterior) y el sistema de expresión dirigida GAL4/UAS para limitar la expresión de un transgene (que en ocasiones puede ser deletéreo si se expresa en todo el organismo) a pequeñas poblaciones celulares dentro de un organismo mayoritariamente *wt*.

En este sistema, el promotor (en este caso el promotor ubicuo de la actina) que dirige la expresión del Gal4 está separado de dicho Gal4 por dos secuencias FRT colocadas en cis dentro del mismo cromosoma. Al inducir la expresión de la Flipasa (en este caso mediante choque térmico), las dos secuencias FRT recombinan, eliminando el fragmento del cromosoma que separaba el promotor del Gal4, de manera que el Gal4 puede expresarse en pequeñas poblaciones celulares. Si a esta construcción se le añade un transgen precedido por la secuencia UAS reconocible por el Gal4 y un marcador también precedido por la secuencia UAS (en este caso GFP), la pequeña población de células que expresa el Gal4, también expresará el transgen y podrá ser identificada por la expresión del marcador (GFP).

Los genotipos utilizados para los experimentos de *Flip-out clones* y las condiciones en las que se realizaron los experimentos, están especificados en la tabla 7.



Genotipo	Condiciones choque térmico
w,hsFlp; Act FRTy <sup>+</sup> FRT,Gal4::UAS-GFP / UAS-DER <sup>DN</sup>	56 AEL ± 12 horas; 37°C; 10 minutos
w,hsFlp; Act FRTy <sup>+</sup> FRT,Gal4::UAS-GFP / UAS-fos <sup>DN</sup>	56 AEL ± 12 horas; 37°C; 10 minutos
w,hsFlp; Act FRTy <sup>+</sup> FRT,Gal4::UAS-GFP / UAS-Ras <sup>V12</sup>	56 AEL ± 12 horas; 37°C; 10 minutos

**Tabla 7. Genotipos utilizados para el análisis de *Flip-out clones*.** Se especifica el momento en el que se ha inducido el choque térmico (AEL: número de horas después de la deposición de huevos) la temperatura y la duración.

## 6. Técnicas de análisis de fenotipos

### 6.1 Microscopía electrónica de barrido

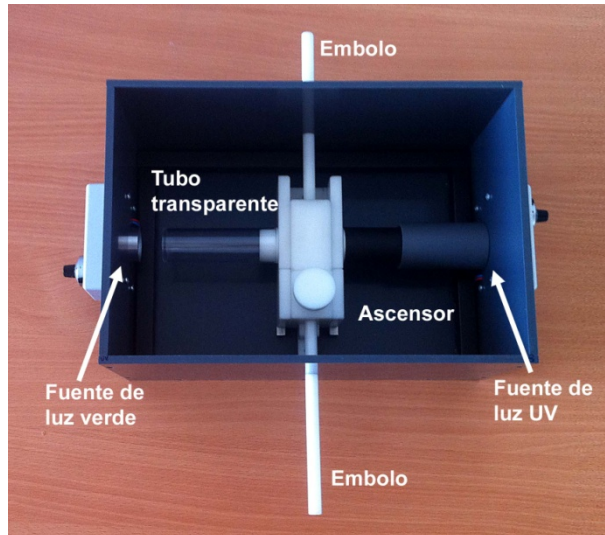
Para comparar la rugosidad de los ojos *wt*, *sev*<sup>S11</sup> y *w*; *sev*<sup>S11</sup> *sev-Gal4* /UAS-*PntP2-HA* 10 moscas de cada genotipo fueron deshidratadas en etanol 25, 50, 70, 90, 95 y 100% (24 horas cada paso). A continuación, para eliminar los residuos acumulados en los ojos, las moscas fueron sometidas a sonicación durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos, seguido por un cambio final de etanol al 100%. Finalmente se estableció el punto crítico y se recubrieron con oro para ser examinadas con el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2300.

## 7. Técnicas de análisis del comportamiento

### 7.1 Llaberinto en forma de T: test de selección entre dos colores

El laberinto en forma de T se utiliza en biología para hacer estudios de comportamiento en el que los individuos de estudio son forzados a elegir entre dos condiciones.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos diseñado y construido un laberinto en forma de T (figura 14) basándonos en las indicaciones descritas por [Reinke and Zipursky](#) en 1988 y con la ayuda del servicio de mecánica de los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona (SCT). Este laberinto nos ha permitido analizar ciertas características del comportamiento de diferentes cepas de *Drosophila* mediante el test de preferencia espectral. El protocolo que se ha seguido, teniendo en cuenta las características de nuestro aparato, se detalla a continuación.



**Figura 14. Laberinto en forma de T.** Fotografía del laberinto en forma de T, que consiste en: dos fuentes de luz, un ascensor por donde se introducen las moscas, dos émbolos para el movimiento de las piezas del interior y dos tubos transparentes por donde se distribuyen las moscas.

Todos el sistema está montado en una caja que no permite pasar la luz. Cuando se hace el test se coloca además una tapa ya que el sistema se puede manipular desde fuera a través de los émbolos (figura 14). El ascensor es la pieza extraíble por donde se introducen las moscas. Una vez las moscas están dentro, el ascensor se coloca en la caja y se conecta al émbolo (como se ve en la figura 14). Cuando se empuja el émbolo, el ascensor conecta con los tubos de poliestireno transparentes que están iluminados en los extremos por Leds de longitud de onda diferente; en un extremo 370 nm (ultravioleta) y en el otro 525 nm (verde) (Optosource y Ledman optoelectrónica respectivamente). Las moscas pueden entonces elegir libremente entre las dos condiciones durante 30 segundos. Una vez ha pasado el tiempo de elección, la pieza maciza se empuja mediante el otro embolo de manera que los tubos quedan tapados y las moscas atrapadas dentro de los tubos. Finalmente se extraen los tubos y se recuenta el número de moscas que han elegido cada una de las condiciones. Después del recuento se calculó el índice de elección (CI) entre el número de moscas que eligieron el verde ( $N_G$ ) y el número de moscas que eligieron el ultravioleta ( $N_{UV}$ ), mediante la siguiente fórmula  $CI = (N_{UV} - N_G) / (N_{UV} + N_G)$ . Las moscas que quedan en el compartimento central fueron descartadas. Cada genotipo se testó un mínimo de tres veces en grupos de aproximadamente 30 moscas. Las moscas seleccionadas para el test tenían entre 3 y 5 días de edad y antes de la pruebas se mantuvieron a oscuras durante 24 horas y luego fueron pre-adaptadas a la luz blanca durante 1 hora. Las moscas *Df(1)w* se

utilizaron como control de tipo salvaje y todos los genotipos de las combinaciones heterocigóticas se mantuvieron en este mismo fondo.

## 8. Técnicas de análisis de imágenes

Las imágenes confocales fueron obtenidas con el microscopio confocal Leica SPE, mientras que las imágenes de campo claro y epifluorescencia fueron obtenidas con el microscopio Leica DMLB. Todas las imágenes han sido procesadas con ImageJ y el software Adobe Photoshop 7.0.

## RESULTADOS



# 1. El transcriptoma de *Sevenless*

La diferenciación de los fotorreceptores en el ojo compuesto de *Drosophila* requiere de la activación reiterada de la vía de Ras1/MAPK *downstream* del receptor tirosina quinasa (RTK) DER (Freeman, 1996). El fotorreceptor R7 activa la misma vía mediante un RTK adicional: el receptor *Sevenless* (Sev) (Fortini et al., 1992; Hafen et al., 1987; Simon et al., 1991). Ambos RTKs son necesarios para la determinación de este fotorreceptor, ya que se necesita un nivel de activación de la vía de Ras1 significativamente más alto que en el resto de fotorreceptores para superar los mecanismos de represión que controlan su determinación. De no llegar a adquirir este nivel de activación, el R7 acabaría transformándose en una célula no neural: la célula cono (Tomlinson and Ready, 1986).

La compleja red de regulación que participa en la especificación del R7 ha sido ampliamente investigada. Sin embargo aun no conoce cuál es el programa transcripcional activado por la vía de Ras1 en el fotorreceptor R7. Conocer este programa fue nuestro primer objetivo y para ello utilizamos una aproximación basada en microarrays de expresión.

## Diseño de microarrays

Como ya se ha explicado en la introducción, Sev se expresa en un grupo de células conocido como el grupo de equivalencia (Banerjee et al., 1987a; Tomlinson et al., 1987), aunque solo es activo y necesario en el precursor del R7 (Banerjee et al., 1987b; Basler et al., 1991). En consecuencia, el alelo de pérdida de función *sev<sup>d2</sup>* (Gerresheim, 1988) con potencial efecto sobre todo el grupo de equivalencia, afecta únicamente a la determinación del R7 haciendo que éste se transforme a una célula cono (Tomlinson and Ready, 1986). De la misma forma, el alelo de ganancia de función *sev<sup>S11</sup>*, incrementa la vía de Ras1 en todo el grupo de equivalencia, pero solo las células cono, que no tienen mecanismos para inhibir esta activación, acaban transformándose en R7s (Basler et al., 1991). Por lo tanto, la determinación del R7 puede manipularse variando los niveles de activación de la vía de Ras1 a través del receptor Sev, sin afectar el destino del resto de fotorreceptores.

Aprovechando la disponibilidad de los alelos *sev<sup>d2</sup>* y *sev<sup>S11</sup>* hemos realizado microarrays de dos colores con el objetivo de entender el programa transcripcional activado por la vía de Ras1 en el R7. En estos microarrays hemos comparado por un lado, el perfil de expresión de discos imaginales de

ojo de tipo salvaje (*wt*) con el de discos *sev<sup>S11</sup>* y por otro, el mismo perfil de tipo salvaje con el de *sev<sup>d2</sup>* (figura 15).



**Figura 15. Representación esquemática del diseño de los microarrays** donde se compara el perfil de expresión de disco imaginal de ojo de larvas *sev<sup>S11</sup>* con *wt* y *sev<sup>d2</sup>* con *wt*.

Para incrementar la sensibilidad de la técnica y obtener así un número mayor de genes candidatos decidimos incorporar una tercera comparación: el perfil de expresión de *sev<sup>S11</sup>* versus *sev<sup>d2</sup>*. Esta comparación no está basada en datos experimentales sino en la comparación computacional de los datos obtenidos en los microarrays. Para poder incluirla todos los microarrays se normalizaron en conjunto. Los datos crudos y normalizados de los arrays pueden consultarse en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (Edgar et al., 2002) [[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/)] con el número de acceso GSE37793. El número de genes cuya expresión se modificó significativamente tanto en las comparaciones experimentales como en la comparación computacional (1,5 *fold change* y  $p < 0,05$ ) se muestra en la Tabla 8.

<b>Número total de genes upregulados y downregulados</b>			
	<i>sev<sup>S11</sup>/wt</i>	<i>sev<sup>d2</sup>/wt</i>	<i>sev<sup>S11</sup>/sev<sup>d2</sup></i>
<b>Genes ↑</b>	141	45	35
<b>Genes ↓</b>	165	59	30

**Tabla 8. Número total de genes con cambios en la expresión.** Número de genes up-regulados (↑) y down-regulados (↓) en los microarrays *sev<sup>S11</sup>* vs *wt* y *sev<sup>d2</sup>* vs *wt*. La tercera columna corresponde al número de genes adicionales que se obtienen de la comparación computacional *sev<sup>S11</sup>* vs *sev<sup>d2</sup>*.

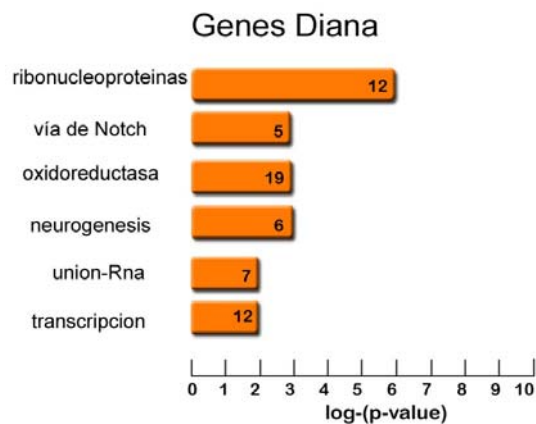
## Analisis de Microarrays

Una vez obtuvimos los datos, se realizó un análisis basado en primero acotar al máximo los genes dependientes de la vía de Ras1 y descartar los posibles efectos colaterales de la técnica, para después agrupar los genes en categorías funcionales y así entender el papel de Ras1 en la determinación del R7. El fin último fue el de seleccionar un candidato para luego estudiar a fondo su relación con Ras1 y su función en el R7.

### Los genes diana

Ras1 actúa a través de la MAPK para activar la transcripción de sus *genes diana* (Wassarman et al., 1995). Ya que nuestro objetivo es el describir los genes dependientes de la vía de Ras1 en el R7, decidimos centrarnos en aquellos genes cuyo cambio de expresión en los microarrays fuera consistente con la activación transcripcional que realiza la MAPK y descartar de esta manera los posibles efectos colaterales del experimento. Esta población se definió como *genes diana* y comprende los genes cuya expresión incrementa en la comparación *sev<sup>S11</sup> vs wt* o en *sev<sup>S11</sup> vs wt*, y aquellos cuya expresión disminuye en la comparación *sev<sup>d2</sup> vs wt*. El número total de genes obtenidos utilizando este criterio fue de 233.

A continuación analizamos los datos con el programa Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (Jiao et al., 2012) [<http://david.abcc.ncifcrf.gov>] para estudiar las categorías Gene Ontology (GO) enriquecidas en nuestro grupo de *Genes diana* (figura 16).



**Figura 16. Categorías Gene Ontology enriquecidas en los genes diana.** Categorías GO enriquecidas en el grupo de *genes diana* en comparación con el genoma completo de *Drosophila* ( $P_{valor} < 0,05$  en todos los casos). El número de genes en cada categoría se muestra dentro de las barras. La longitud de las barras indica la significación del grupo.



Algunas de las categorías funcionales enriquecidas como *vía de Notch* o *neurogenesis* podrían considerarse esperables ya que se está estudiando el proceso de especificación neural del R7, pero otras como *ribonucleoproteínas* u *oxidoreductasa* resultan más difíciles de explicar. Esto nos hizo pensar que algún efecto colateral podría estar enmascarando los genes de respuesta directa de Ras1 y por lo tanto decidimos acotar más la lista de genes candidatos.

### Los genes diana con ETS

La MAPK controla el desarrollo neuronal a través de la fosforilación de dos factores de transcripción de la familia ETS: Yan y PntP2 (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994). Ambas proteínas son capaces de reconocer los sitios de unión ETS, una secuencia consenso de ADN bien caracterizada y conservada a lo largo de la evolución (Oikawa and Yamada, 2003). Para restringir la lista de *genes diana* a los posibles candidatos regulados directamente por la vía Ras1/MAPK, se realizó una búsqueda computacional de sitios de unión ETS en los promotores (1000bp *upstream* del sitio de inicio de transcripción) e intrones de los *genes diana*. Para fortalecer las predicciones se seleccionaron únicamente los ETS conservados, utilizando para ello los genomas de 12 *Drosophilidae* (Clark et al., 2007). De esta forma obtuvimos 38 *genes diana* con sitios de unión ETS (Tabla 9).

Genes diana con ETS				
RefSeq	Símbolo	sev <sup>St1</sup> / sev <sup>o2</sup>	Location ETSs	Descripción
NM_057278	Appl	sev <sup>St1</sup> / wt	intrón 1,2 y 5	Memoria a largo plazo; organización sináptica
NM_137147	CG10200	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream	Desarrollo de células tricógeno
NM_139587	CG14984	sev <sup>St1</sup> / wt	intrón 1	desconocido
NM_001104378	CG17838	sev <sup>St1</sup> / wt	intrón 1	Unión a mRNA. Neurogénesis
NM_164615	Cg25C	sev <sup>St1</sup> / sev <sup>o2</sup>	upstream	Colágeno IV
NM_166691	CG30423	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream	Proteína vacuolar
NM_168032	CG32267	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream	desconocido
NM_176245	CG33200	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream	desconocido
NM_142803	CG5326	sev <sup>St1</sup> / sev <sup>o2</sup>	intrón 1	Proteína de membrana
NM_140772	CG7341	sev <sup>St1</sup> / wt	intrón 1	desconocido
NM_001144604	CG7694	sev <sup>o2</sup> / wt	intrón1 y 2	Proteína zinc finger
NM_137903	CG9895	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream / intrón 1	Unión a secuencias específicas de DNA
NM_001043081	chn	sev <sup>o2</sup> / wt	upstream / intrón1	Unión a DNA; desarrollo del ojo
NM_135014	Clect27	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream	Lectina tipo C
NM_164879	cpr30F	sev <sup>St1</sup> / sev <sup>o2</sup>	upstream	Componente estructural de la cutícula
NM_141758	fau	sev <sup>o2</sup> / wt	upstream / intrón 5	Respuesta a anoxia
NM_168293	Fhos	sev <sup>St1</sup> / wt	intrón 1	Organización del citoesqueleto
NM_079003	Glaz	sev <sup>St1</sup> / wt	upstream	Respuesta celular al estrés oxidativo
NM_079781	HLHmbeta	sev <sup>o2</sup> / wt	upstream	Proteína <i>helix-loop helix</i> ; Unión al DNA
NM_079780	HLHmgamma	sev <sup>St1</sup> / sev <sup>o2</sup>	upstream	Proteína <i>helix-loop helix</i> ; Unión al DNA

La **tabla 9** continúa en la página siguiente

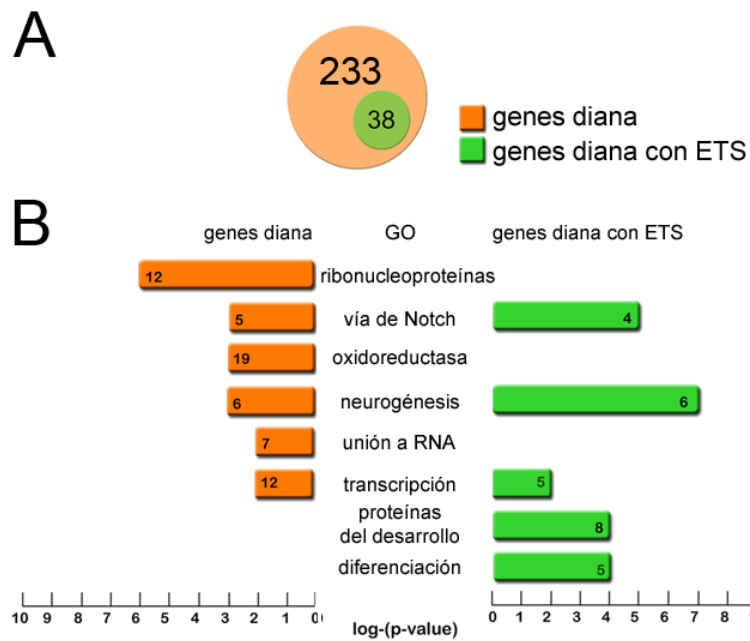
RefSeq	Símbolo	sev <sup>S11</sup> / sev <sup>d2</sup>	Location ETSs	Descripción
NM_079018	LamC	sev <sup>d2</sup> / wt	intrón1	Poros nuclear
NM_001032229	Lola	sev <sup>S11</sup> / sev <sup>d2</sup>	upstream / intrón1	organización de las proyecciones celulares
NM_079786	m4	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream	Proteína <i>helix-loop helix</i> ; Unión al DNA
NM_079847	Mlc2	sev <sup>d2</sup> / wt	upstream	Cadena ligera de la miosina 2
NM_001014522	Mp20	sev <sup>d2</sup> / wt	upstream	Unión a calcio; unión a actina
NM_001038960	Octβ2R	sev <sup>S11</sup> / sev <sup>d</sup>	upstream	Rodopsina-like
NM_078868	Oli	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream	Unión a DNA
NM_078981	Otk	sev <sup>d2</sup> / wt	intrón 2	Guía de axones; adhesión celular
NM_166055	phyl	sev <sup>S11</sup> / wt	intrón 1	Proteína <i>zinc finger</i> ; desarrollo de ojo
NM_135130	psd	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream	Organización de las microvellosidades
NM_078824	salr	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream / intrón 2	Desarrollo de órganos sensoriales
NM_001043153	siz	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream / intrón 1	Organización del citoesqueleto de actina
NM_057382	slp1	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream	Unión a polimerasa II
NM_057388	sog	sev <sup>S11</sup> / wt	intrón 1 / intrón 3	Vía de torso
NM_139496	spz5	sev <sup>S11</sup> / sev <sup>d</sup>	upstream / intrón 1	Guía de axones
NM_079823	stg	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream	Inductor de fosfatasa del ciclo celular
NM_079716	tsl	sev <sup>S11</sup> / wt	upstream / intrón1	Vía de torso
NM_165010	vir-1	sev <sup>S11</sup> / sev <sup>d</sup>	upstream	Respuesta defensiva ante virus

**Tabla 9: Lista de genes diana con ETS.** sev<sup>S11</sup> / sev<sup>d2</sup> indica el microarrays donde se la expresión del gen se vio modificada. Descripción: descripción general de los rasgos más característicos, basada en la información resumen de FlyBase [<http://www.flybase.org>].

A continuación, analizamos de nuevo los datos con el programa DAVID (Jiao et al., 2012) para estudiar las categorías Gene Ontology (GO) enriquecidas en el grupo de genes diana con ETS (figura 17).

Al comparar el perfil de categorías enriquecidas de genes diana y genes diana con ETS vimos que había una progresión de una lista a otra en la que desaparecían las categorías no esperables *ribonucleoproteinas* y *oxidoreductasa* mientras que incrementaba la significación de las categorías esperables *vía de Notch* y *neurogénesis*. Además, se observó el surgimiento de nuevas categorías: *proteínas del desarrollo* y *diferenciación*, que también encajarían dentro del marco de la determinación del R7.

El conjunto de estas observaciones nos hizo pensar que habíamos conseguido captar una lista optima de genes candidatos con la que continuar el análisis.



**Figura 17. Los genes diana con ETS.** (A) Diagrama que muestra la intersección entre los *genes diana* (naranja) y los *genes diana con ETS* (verde). (B) Categorías Gene Ontology (GO) El número de genes en cada categoría se muestra dentro de las barras. La longitud de las barras indica la significación.  $P_{valor} < 0,05$

### El grupo de los neurogénicos

Como ya se ha explicado con anterioridad la vía de Ras1 está mediando la decisión entre la determinación neural y no neural del R7 (Basler et al., 1991; Tomlinson and Ready, 1986) y curiosamente la categoría *neurogénesis* es la más enriquecida dentro del grupo de *genes diana con ETS*. En la Tabla 10 se muestran todos los genes que pertenecen a la categoría *neurogénesis*.

REFSEQ_MRNA	GENE NAME
NM_079786	E(spl) region transcript m4
NM_079781	E(spl) region transcript mbeta
NM_079780	E(spl) region transcript mgamma
NM_057278	beta amyloid protein precursor-like
NM_001032229	longitudinals lacking
NM_078981	off-track

**Tabla 10. Lista de genes de la categoría neurogénesis.** Lista de los seis genes anotados en la categoría funcional *neurogénesis* enriquecida en el grupo de genes candidatos *con ETS*.

Dentro del grupo *neurogénesis* encontramos los genes *m4*, *mbeta* y *mgamma* que son miembros del complejo *enhancer of split* y podrían representar una pieza del conocido diálogo entre Ras1 y Notch que forma parte de la red de regulación que determina el R7 (revisado en Doroquez and Rebay, 2006). Por otro lado; *longitudinal lacking (lola)*, *off-track (otk)* y  *$\beta$ -beta amyloid protein precursor-like (Appl)*, todos ellos genes involucrados en el desarrollo neural, podría ser ejemplos de genes que controlan la diferenciación neural del R7.

Tanto *lola* como *otk* intervienen en procesos de guía de axones (Cafferty et al., 2004; Giniger et al., 1994; Madden et al., 1999; Pulido et al., 1992), mientras que *Appl* se ha descrito en multitud de procesos del desarrollo neural como el transporte axonal (Gunawardena and Goldstein, 2001; Torroja et al., 1999a), el desarrollo neural (Li et al., 2004; Merdes et al., 2004), la formación de botones sinápticos (Ashley et al., 2005; Torroja et al., 1999b), la respuesta a daño cerebral (Leyssen et al., 2005) y la memoria a largo plazo (Goguel et al., 2011) entre otros. *Appl* es el ortólogo del gen humano amyloid precursor protein (APP); el precursor del péptido A $\beta$  involucrado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Hardy and Selkoe, 2002; Rosen et al., 1989). Además, La expresión de *APP* se ha visto estimulada por la vía de Ras1 en varios estudios hechos con cultivos de células de mamífero (Lahiri and Nall, 1995; Ohyagi and Tabira, 1993; Ruiz-Leon and Pascual, 2001; Xu and Rubin, 1993), aunque existe cierta controversia en las observaciones hechas *in vivo* (Forloni et al., 1993; Fukuta et al., 1993).

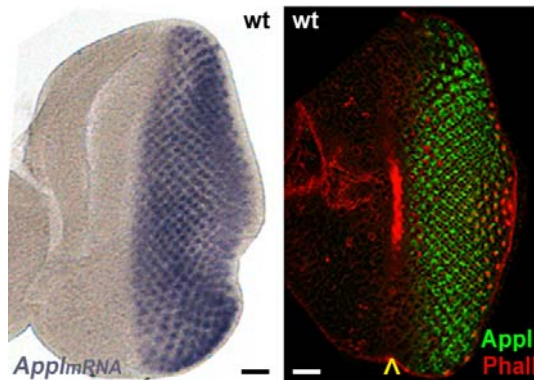
Llegados a este punto, decidimos seleccionar el candidato *Appl* para continuar el estudio, ya que nos ofrece la posibilidad, por un lado, de profundizar en la relación entre un miembro de la familia APP y Ras1, y por otro, de adquirir herramientas que nos ayuden a entender el papel de Ras1 en el desarrollo del R7.

## 2. La expresión de *Appl* en ojo

Una vez elegido el candidato el primer paso fue el de estudiar con detalle el patrón de expresión en el tejido de estudio: el disco imaginal de ojo.

### Expresión de *Appl* en disco imaginal de ojo

Mediante hibridación *in situ* observamos que *Appl* se expresa en la zona de determinación de los fotorreceptores, después del surco morfogénico. Este patrón coincide con el indicado en estudios previos donde se muestra que *Appl* se expresa en neuronas postmitóticas de varios tejidos incluyendo el disco imaginal de ojo (figura 18; Luo et al., 1990; Torroja et al., 1996). La traducción de *Appl* da lugar a una proteína transmembrana que puede someterse a escisión proteolítica (Luo et al., 1990). Mediante inmunohistoquímica observamos que los anticuerpos dirigidos contra el ectodominio amino terminal muestran una distribución punteada en la membrana de todos los fotorreceptores justo después del surco morfogénico, coincidiendo con el patrón de expresión del *mRNA* (figura 18).

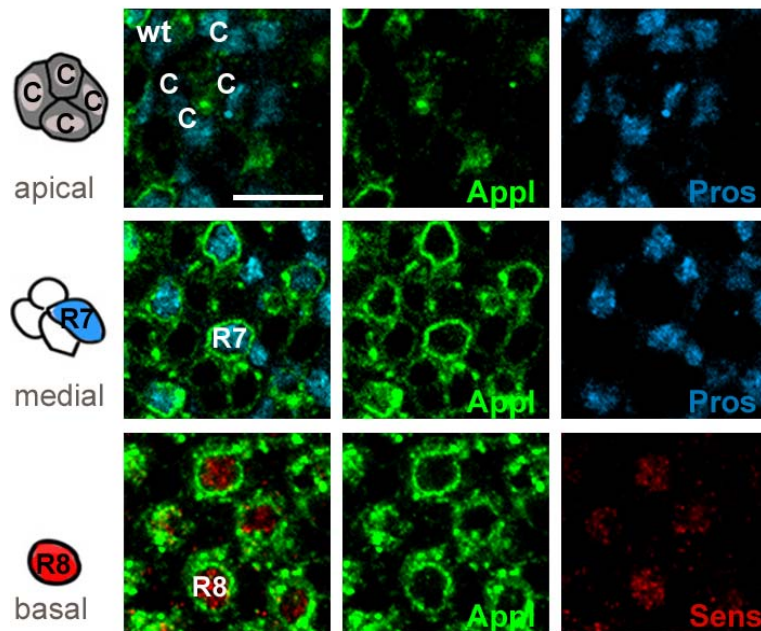


**Figura 18. Expresión de *Appl* en el disco imaginal del ojo.** Hibridación *in situ* de *Appl* (izquierda) y tinción (derecha) de *Appl* (verde), muestran expresión en la zona de determinación de los fotorreceptores justo detrás del surco morfogénico (chevron) y phalloidina (rojo).

### La distribución de *Appl* en fotorreceptores

Para observar con detalle la distribución de *Appl* en los fotorreceptores realizamos diferentes secciones ópticas en discos de ojo teñidos con *Appl* (figure 19). Mediante estas secciones pudimos comprobar que *Appl* no se expresa en las células cono y que está presente en la membrana de todos los

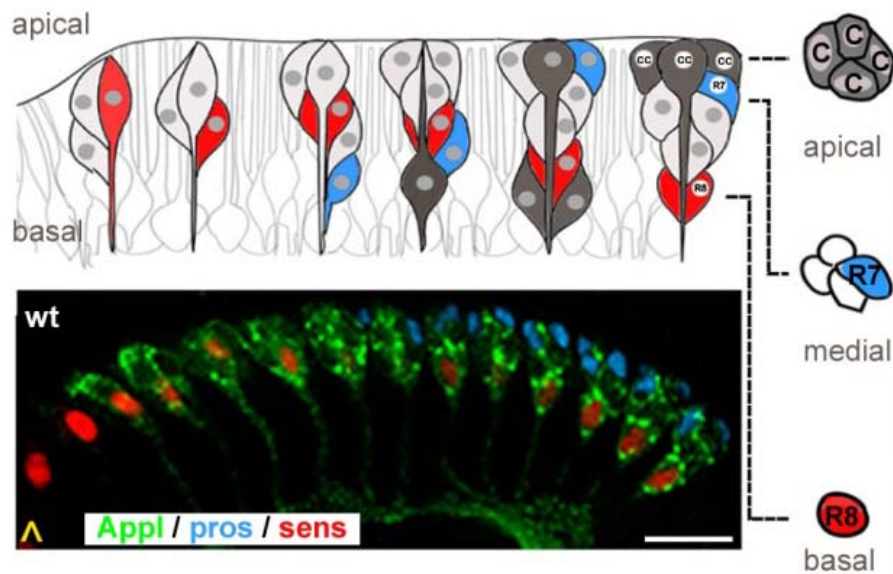
fotorreceptores. También advertimos ciertas diferencias en su distribución ya que los niveles en R7 y R8 parecen ser mayores que en el resto de fotorreceptores (figura 19).



**Figura 19. Distribución de Appl en los fotorreceptores; sección horizontal.** Tres secciones confocales, a diferente nivel, de omatidios teñidos con anti-appl (verde). El panel superior corresponde al nivel de cc (teñidas con anti-Próspero, azul), el panel del medio muestra niveles altos de Appl en la membrana del R7 (co-teñidas con anti-Próspero, azul) y niveles bajos en el resto de fotorreceptores (alrededor del R7); el panel inferior muestra una sección a través del R8 que también presenta altos niveles de Appl (co-teñidas con anti-senseless, rojo). Barra de escala: 10µm.

El disco de ojo es un epitelio monocapa, sin embargo la migración apical de los núcleos de los fotorreceptores según están siendo reclutados en el omatidio, generan una pseudo-estratificación del tejido (Wolff and Ready, 1993). Para descartar que las diferencias observadas en los niveles de Appl fuera una consecuencia de comparar fotorreceptores que no están al mismo nivel, realizamos secciones ópticas transversales de discos teñidos con Appl (figura 20).



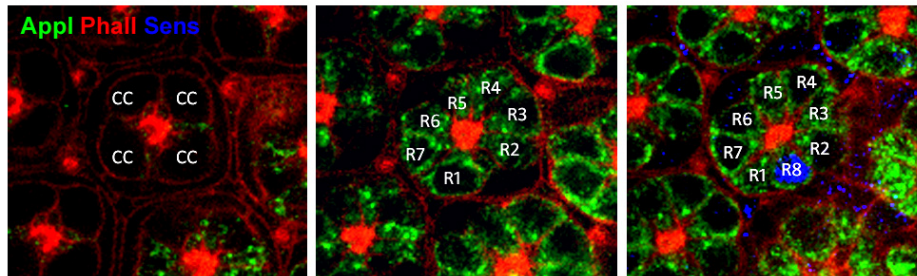


**Figura 20. Distribución de Appl en los fotorreceptores; sección transversal.** Dibujo de una sección transversal de un disco imaginal del ojo que muestra la organización apico-basal del epitelio (adaptado de Wolff and Ready, 1993). De izquierda a derecha se representa el reclutamiento progresivo de los fotorreceptores (R1-6 de color gris claro, R7 azul y R8 rojo) y las células conos (CC, gris oscuro). Los ommatidios más posteriores (derecha) muestran una organización cada vez más madura (apical: conos, media: R1-R7, basal: R8). La imagen confocal por debajo del dibujo corresponde a una sección óptica transversal de un disco de ojo que muestra niveles altos de Appl (verde) en la membrana del R7 (co-teñidas con anti-Próspero, azul) y del R8 (co-teñidas con anti-senseless, rojo). Anterior está a la izquierda. Barra de escala: 10µm

En estas secciones de nuevo se puede observar que tanto R7 como R8 tienen niveles más altos de Appl que el resto de fotorreceptores. Esta sección además nos permite seguir la distribución de Appl en el tiempo, ya que en un mismo plano confocal están incluidos desde los ommatidios más inmaduros que están cerca del surco morfogenético, hasta los más maduros en la parte más posterior del disco. De esta forma, advertimos que Appl aparece por primera vez en el precursor posmitótico del R8, seguido por R2/5, R3/4, R1/6 y finalmente el R7, siguiendo el orden en el que están siendo reclutados. Las diferencias en los niveles de Appl también parecen tener un patrón temporal ya que son más evidentes en la parte más posterior del disco de ojo, donde los ommatidios son más maduros, lo que sugiere que la expresión de Appl es dinámica.

## La distribución de Appl en el ojo de pupa

Ya que parece que la expresión de Appl es dinámica, nos preguntamos cuál sería su patrón en estados más avanzados del desarrollo, y si las diferencias de niveles entre fotorreceptores estarían entonces mantenidas. Por ello realizamos tinciones de Appl en ojos de pupa de 30 horas (figura 21).



**Figura 21. Distribución de Appl en los fotorreceptores de pupa.** Imagen confocal de una sección óptica horizontal de un ojo de pupa a 30 horas del desarrollo teñido con anti-AppI (verde). El contorno celular está teñido con Phalloidina (rojo) y los R8 coteñidos con anti-senseless (azul).

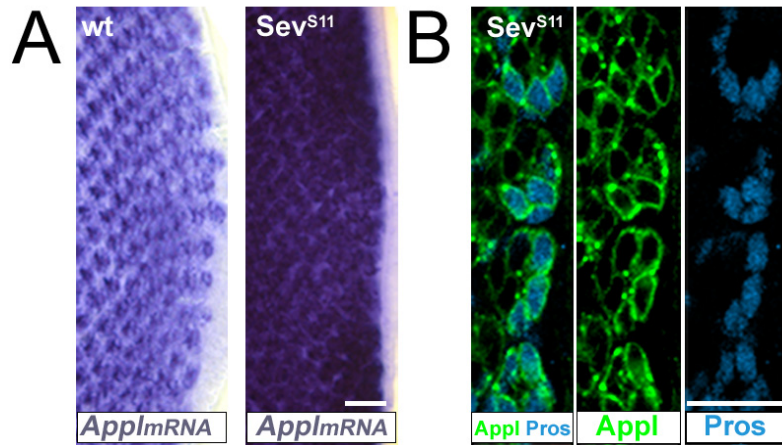
Como se puede observar en la figura 21, Appl continua presente en todos los fotorreceptores, sin embargo las diferencias entre R7, R8 y el resto de fotorreceptores parecen haber desaparecido.

De estos resultado podemos extraer que los niveles de Appl en R7 y R8 son altos en un momento concreto del desarrollo entre larva y pupa, lo que quizá esté relacionado con el papel de Appl en el desarrollo de estos dos fotorreceptores

## Sevenless activa la expresión de Appl

Para confirmar que la expresión de *AppI* incrementa a causa de la activación de Sev, realizamos hibridaciones *in situ* de *AppI* en discos de ojo *sev*<sup>S11</sup> y las comparamos con las de discos de tipo salvaje. Como se muestra en la figura 22A, los discos de ojo *sev*<sup>S11</sup> presentan mayor acumulación de *AppI* que los de tipo salvaje. También realizamos tinciones de Appl sobre discos *sev*<sup>S11</sup> para observar a nivel celular cuál era el efecto de la activación de Sev. El genotipo *sev*<sup>S11</sup> se caracteriza por la aparición de R7s extra como consecuencia de la activación constitutiva de Sev (Basler et al., 1991). Como ocurre en los R7 de discos de tipo salvaje, los R7s extra que se forman en los discos *sev*<sup>S11</sup> también mostraron niveles altos de la proteína Appl (figura 22B).





**Figura 22. Sevenless activa la expresión de *Appl*.** (A) Hibridación *in situ* de *Appl* en disco ojo de tipo salvaje y *sev*<sup>S11</sup> confirma que la expresión de *Appl* es mayor en discos de ojo *sev*<sup>S11</sup>. (B) Tinción de *Appl* en discos de ojo *sev*<sup>S11</sup> revela que los R7 extra generados por la activación constitutiva de *Sev*, presentan niveles altos de *Appl* (co-tinción anti-pros, azul; anti-*Appl*, verde). Anterior está a la izquierda. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

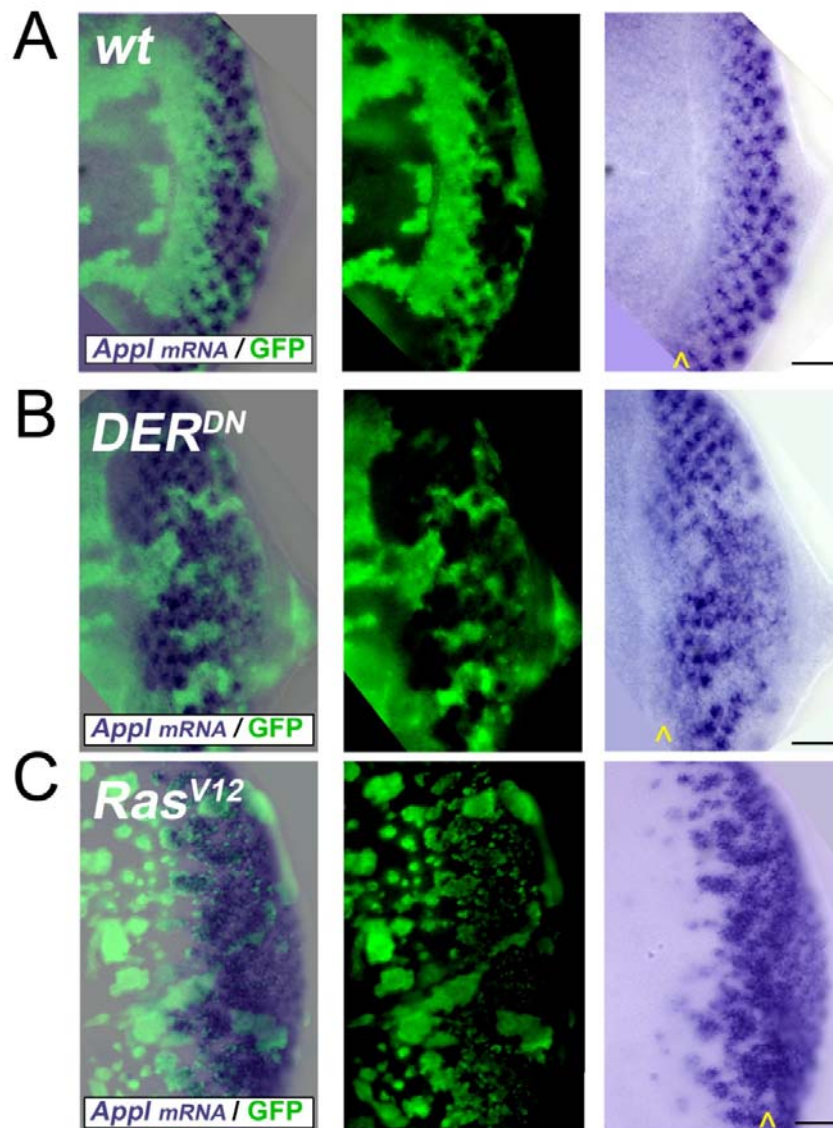
Estos resultados confirman que *Sev* activa la expresión de *Appl*, pero ¿Cómo de directa es esta regulación? ¿es *Appl* un target directo de la vía o su activación es consecuencia de la diferenciación neural?. La respuesta a estas preguntas es el objetivo de las siguientes secciones.

### 3. La vía de Ras1 en la regulación de *App1*

Los datos obtenidos hasta el momento nos proporcionan las primeras evidencias de una relación entre *Sev* y la expresión de *App1*. *Sev*, como se ha explicado con anterioridad, es un RTK que activa la cascada de las MAPK a través de Ras1 en el fotorreceptor R7 (Simon et al., 1991). Para explorar con detalle cuál es el papel de la vía de Ras1 en la regulación de *App1*, hemos realizado un estudio basado en análisis clonal, utilizando para ello diversos alelos que interfieren con dicha vía.

#### Ras1 controla la expresión de *App1*

Con el objetivo de bloquear la vía de Ras1 en todos los fotorreceptores, y observar cual era el efecto en la expresión de *App1*, realizamos clones de expresión de la construcción *DER<sup>DN</sup>*: una forma dominante negativa que impide la activación del DER endógeno (Freeman, 1996). Estos clones fueron generados a través de la técnica *flip-out*, de manera que la expresión de *DER<sup>DN</sup>* coincide con la expresión de la proteína fluorescente verde: GFP (ver materiales y métodos) (Pignoni and Zipursky, 1997). Como muestra la figura 23B, estos clones tiene como resultado la pérdida completa de la expresión de *App1*. Lo que indica que DER es necesario para la expresión de *App1*. Este resultado también sugiere que la regulación de *App1* por la vía de Ras, no está restringida al fotorreceptor R7 sino que podría extenderse a todos los fotorreceptores. A continuación, se analizaron clones de expresión de *Ras<sup>V12</sup>*, una forma activa de Ras1 que produce señalización constitutiva (Scholz et al., 1997). Se observó que *Ras<sup>V12</sup>* era suficiente para activar la expresión de *App1* en la zona anterior al surco morfogénico, donde *App1* no se expresa normalmente (Figura 23C). Sin embargo, la correlación entre *Ras<sup>V12</sup>* y la expresión de *App1* se vió limitada al área correspondiente al disco de ojo. Esta observación sugiere que el control de Ras1 sobre la expresión de *App1* necesita de un contexto en el que están convergiendo unas vías de señalización determinadas.

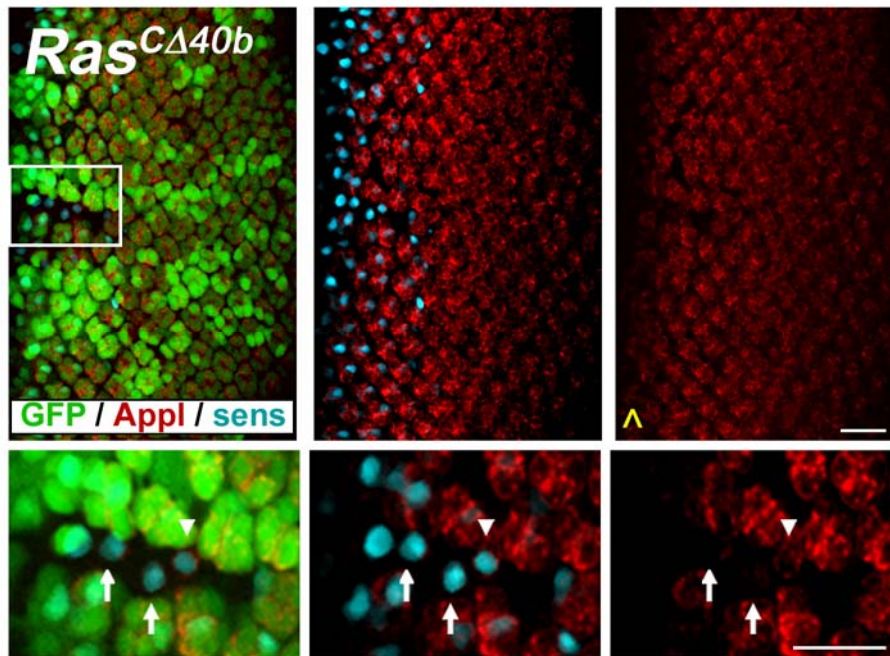


**Figura 23. Ras1 regula la expresión de *Appl*.** Hibridación *in situ* de *Appl* en discos de ojo con clones de tipo salvaje (A) expresando *DER<sup>DN</sup>* (B) o expresando *Ras<sup>V12</sup>* (C). Los clones están marcados con GFP. Surco morfogénico: chevron. En todas las imágenes anterior está a la derecha. Barras de escala: 10 $\mu$ m

La vía de Ras1 está íntimamente relacionada con la determinación de los fotorreceptores. Tanto es así que la actividad ectópica de Ras1 que se consigue con el alelo *Ras<sup>V12</sup>* es capaz de inducir la diferenciación de fotorreceptores ectópicos (Freeman, 1996), mientras que el bloqueo de la vía que se consigue mediante el alelo *DER<sup>DN</sup>* evita la formación de

fotorreceptores (Spencer et al., 1998). Esta relación tan estrecha nos hizo plantearnos la siguiente cuestión: ¿Cómo de directo es el control de Ras1 sobre la expresión de *App1*? ¿Es *App1* realmente un target de la vía de Ras1 o su expresión es consecuencia de la presencia/ausencia de fotorreceptores?.

Para distinguir entre estas dos posibilidades, hemos utilizado la capacidad de determinación del R8 en ausencia de señalización de la vía de Ras1 (Yang and Baker, 2001). Con este propósito hemos realizado *tween-clones* del alelo *Ras1<sup>ΔC40B</sup>*; alelo que a causa de una delección ha perdido la pauta de lectura abierta (Hou et al., 1995). Cerca del surco morfogenético, que precede a la determinación de los fotorreceptores y donde los clones tienen un tamaño mayor, se pudo detectar la presencia de R8s al examinar el marcador específico Senseless (Nolo et al., 2000). En estos R8s, como se puede observar en la figura 24, se ha producido una reducción severa de los niveles de *App1*. Este resultado sugiere que Ras1 controla la expresión de *App1* de manera independiente a la determinación de los fotorreceptores.



**Figura 24: TWEEN-clones de *Ras<sup>ΔC40b</sup>*.** La técnica FLP/FRT se utilizó para generar clones homocigotos de la mutación *Ras<sup>ΔC40b</sup>* (marcados por la ausencia de GFP) en tejido heterocigoto. Las células R8 marcadas con anticuerpo anti-senseless (cian) en los clones adyacentes al surco morfogenético (chevron amarillo) muestran niveles reducidos (punta de flecha) o ausencia (flecha) de *App1* (rojo). Paneles inferiores: detalle de la región marcada por el recuadro blanco. En todas las imágenes, anterior está a la derecha. Barra de escala: 10  $\mu$ m.



## 4. El factor de transcripción PntP2 en el control de la expresión de *Appl*

De los datos obtenidos podemos concluir que *Appl* es un target de la vía Ras1/MAPK, pero queda pendiente descifrar si es un target directo o indirecto. El output transcripcional activado por la vía canónica de Ras1/MAPK envuelve, en la mayoría de casos, al factor de transcripción Pnt (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994). Los resultados que se muestran a continuación tienen como objetivo de estudio la relación entre Pnt y *Appl*.

### Pnt media la regulación de *Appl*

Para estudiar el papel de Pnt en el control de la expresión de *Appl*, decidimos analizar la respuesta de *Appl* en ausencia de Pnt. Con este fin realizamos *twin clones* del alelo de pérdida de función *Pnt<sup>Δ88</sup>* que contiene una pequeña delección que afecta al extremo 3' (figura 25; Scholz et al., 1993).

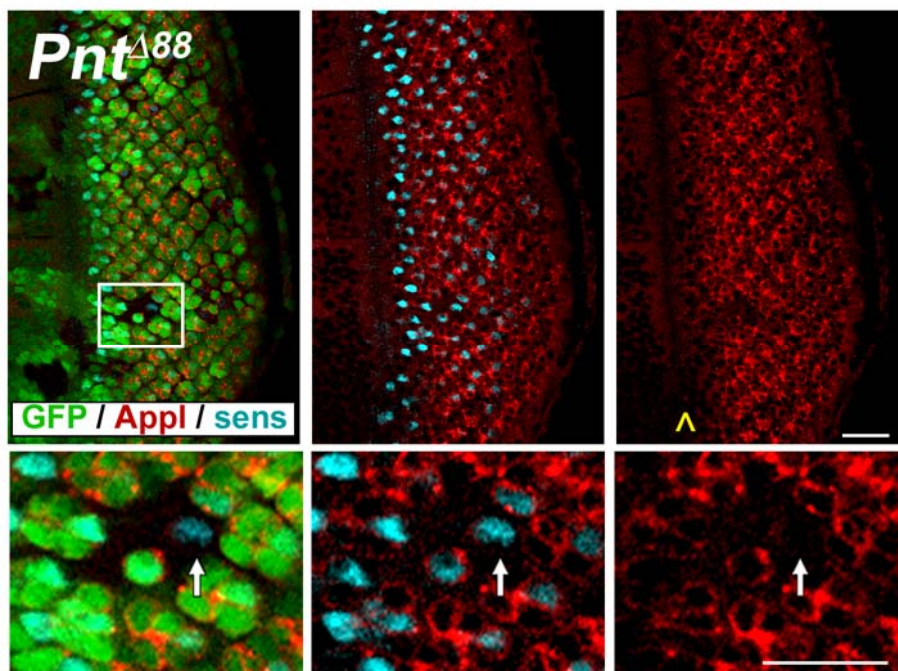
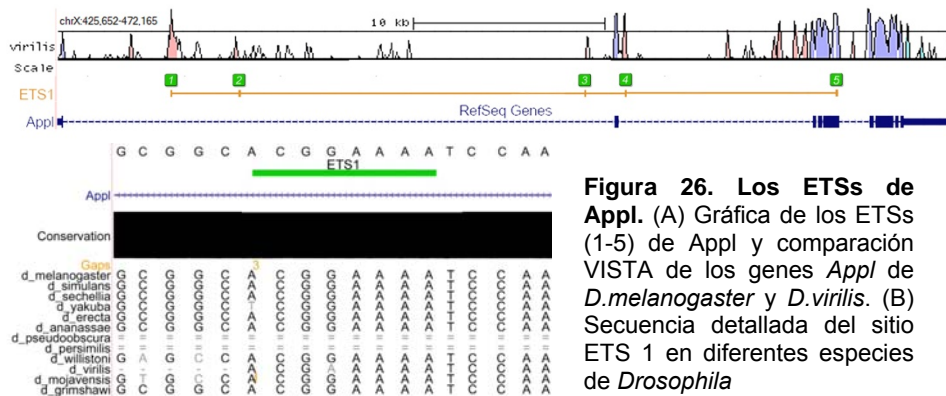


Figura 25: Twin clones de *pnt<sup>Δ88</sup>*. El pie de figura correspondiente se encuentra en la pagina que está a continuación.

Como ocurría en los clones de pérdida de función de *Ras1*, detectamos R8s con niveles normales de expresión de Senseless pero con niveles muy reducidos de *Appl* (Figura 25. comparar con Figura 24). Este resultado indica que *Pnt* es, al menos, uno de los factores de transcripción activado por la vía de *Ras1*, implicado en la regulación de *Appl*. En los clones más posteriores que engloban en muchos casos una única célula que corresponde a un R8, los niveles de *Appl* son normales.

### *Appl* es un target directo de *Pnt*

Durante el análisis de microarrays realizamos una búsqueda de ETS conservados en los genes candidatos para seleccionar los posibles targets directos de la vía *Ras*/MAPK (ver la sección análisis de microarrays del apartado 1. El transcriptoma de *sevenless*). De manera que llegado este punto, ya partíamos de la premisa de que *Appl* tiene ETSs conservados o bien en el promotor, o bien en alguno de sus intrones. Un total de siete ETSs distribuidos en tres intrones de *Appl* fueron identificados. Dos de ellos forman parte de una región repetitiva clasificada como Long Terminal Repeat (LTR) y por ello fueron descartados. La posición de los cinco ETSs (ETS1-5) restantes está representada en la figura 26. En esta misma figura además se puede observar la secuencia concreta de uno de estos ETSs.



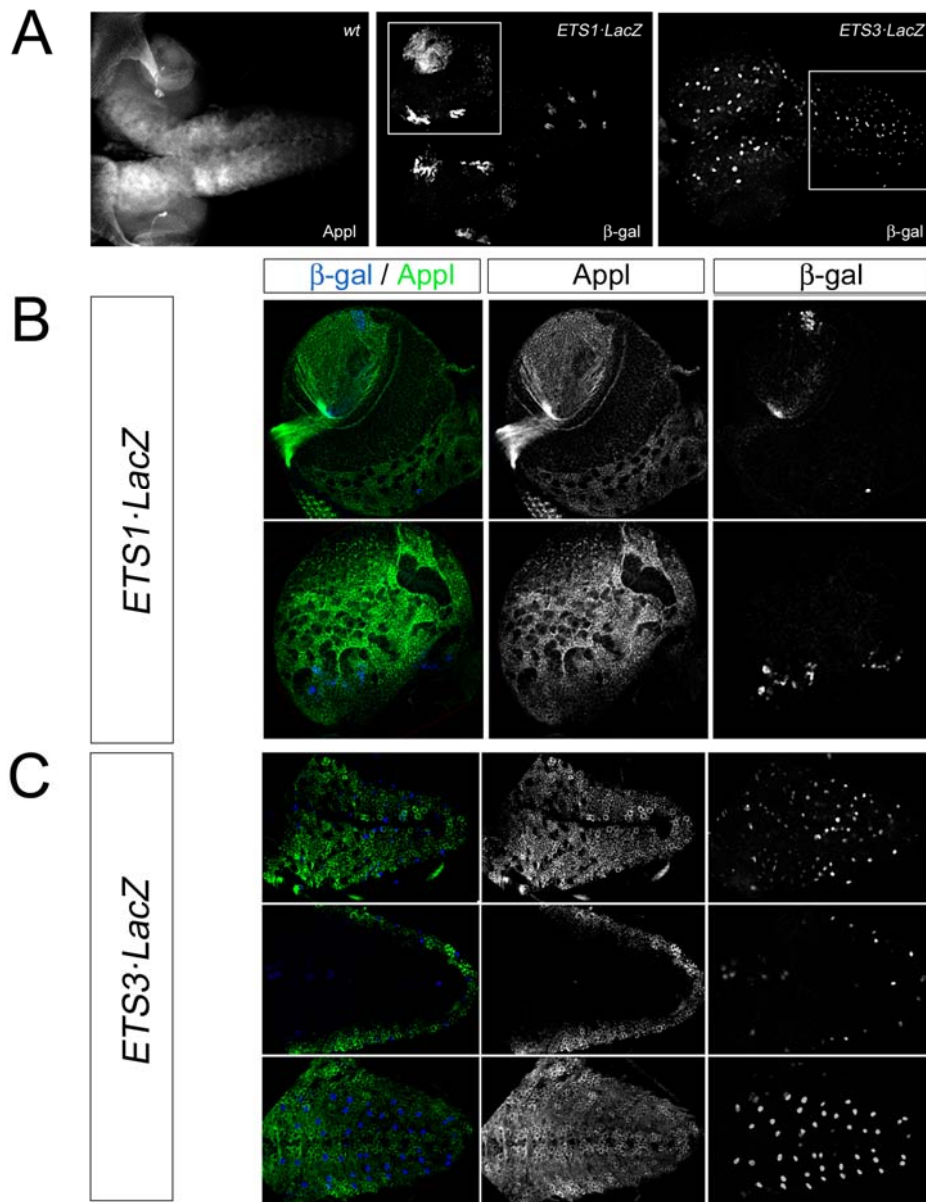
**Figura 25: Twin-clones de *pnt*<sup>Δ88</sup>.** La técnica FLP/FRT se utilizó para generar clones homocigotos de la mutación *pnt*<sup>Δ88</sup> (marcados por la ausencia de GFP) en tejido heterocigoto. Las células R8 marcadas con anticuerpo anti-senseless (cian) en los clones adyacentes al surco morfogénico (chevron amarillo) muestran ausencia (flecha) de proteína Appl (rojo). Paneles inferiores: detalle de la región marcada por el recuadro blanco. En todas las imágenes, anterior está a la derecha. Barra de escala: 10 μm.

Para evaluar si Pnt es capaz de inducir la expresión de *App1* mediante unión directa a los ETSs descritos en este trabajo, hemos realizado dos tipos de aproximaciones diferentes: estudios reportero-lacZ e inmunoprecipitaciones de cromatina (ChIP).

### Ensayos de reportero lacZ

La conservación de secuencia de regiones no codificantes es un indicador de *enhancers* potenciales (Visel et al., 2007). Los ETSs descritos en la secuencia de *App1*, están conservados en los ocho nucleótidos de longitud que caracterizan la matriz ETS (Fisher et al., 1991; Nye et al., 1992; Woods et al., 1992), pero además, están incluidos en amplias regiones conservadas (figura 26) que podrían estar actuando como *enhancers*. Una vez se han identificado los posibles *enhancers*, éstos se pueden conectar a un gen reportero por tal de ver si son capaces de regular la expresión génica *in vivo* y cuál es el patrón de expresión al que dan lugar. Con este objetivo produjimos *enhancers-LacZ* en mosca, de las regiones conservadas de *App1* que contienen ETSs (aproximadamente 500 pb). Para evitar los efectos secundarios de la inserción aleatoria generada en la transformación mediante elementos transponibles (Kaufman and Rio, 1992), se utilizó el sistema  $\Phi$ C31 (Bischof et al., 2007; Groth et al., 2004), que permite dirigir la inserción hacia posiciones predeterminadas dentro del genoma. Dos de los putativos *enhancers* que contienen el ETS1 y el ETS3 respectivamente fueron capaces de dirigir la expresión del lacZ en el cerebro (figura 27 A). Lo que indica que al menos en estos dos casos hemos seleccionado verdaderos *enhancers*. Además, el patrón de la expresión a la que dan lugar coincide parcialmente con el de la expresión de *App1* en cerebro (figura 27 B y C).

Sin embargo ninguno de los putativos *enhancers* fue capaz de dirigir la expresión de lacZ en disco imaginal de ojo (datos no mostrados). La forma en la que se realizaron las construcciones podría a lo mejor explicar el porqué de este resultado. Por un lado, el contexto genómico puede considerarse una limitación. Ya que los fragmentos se restringieron a 500 pb, es posible que alguna secuencia adyacente necesaria para la activación, no se haya incluido en la construcción, y/o que la modificación de la distancia del *enhancer* al promotor este afectando a la interacción entre ambos (Swanson et al., 2010). Por otro lado, aunque *enhancers* y promotores basales con frecuencia son compatibles, en ciertos casos, los *enhancers* pueden interaccionar con un tipo concreto de promotor de forma específica (Butler and Kadonaga, 2001; Merli et al., 1996). En este caso se utilizó el promotor mínimo Hsp70 (Wu et al., 2001), en lugar del

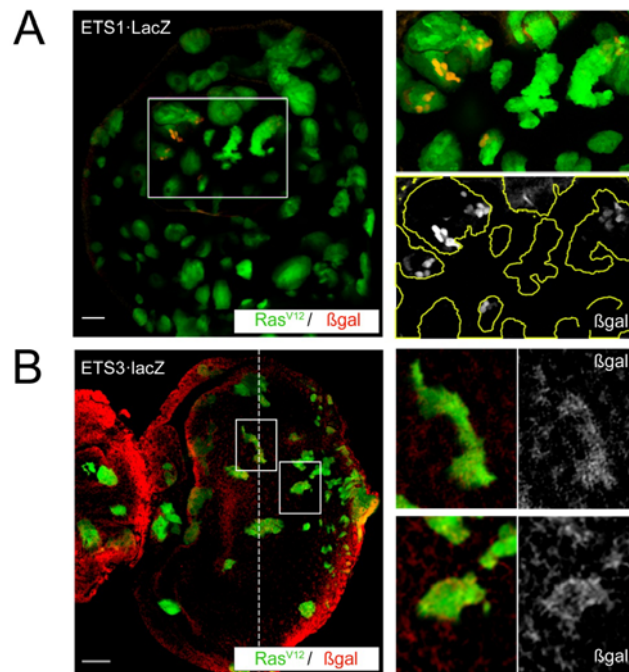


**Figura 27. Patrón de expresión de los *enhancers-lacZ*.** (A). Proyección en Z de tinciones de cerebros de larva III mostrando el patrón de expresión de Appl (izquierda) teñidos con anti-AppI; del *enhancer* que contiene el ETS1 (centro) teñido con anti- $\beta$ gal y del *enhancer* que contiene el ETS3 (derecha) también teñido con anti- $\beta$ gal. (B y C) Planos focales de co-tinciones de Appl (verde) y  $\beta$ gal (azul), en lóbulo óptico y cerebro central en moscas transgénicas del *enhancer* que contiene el ETS1 (B) y en el ganglio ventral de moscas transgénicas del *enhancer* que contiene en el ETS3 (C). En todas las imágenes Dorsal está arriba y ventral abajo.



propio promotor de *App1* que hubiera podido favorecer la comunicación con los *enhancers*. Por último, nuestras secuencias fueron clonadas en copia única en lugar de recurrir a la repetición en tándem que sensibiliza la respuesta de los *enhancers* y que se utiliza comúnmente en estudios de regiones reguladoras (Xu et al., 2000).

En consecuencia, se decidió favorecer la respuesta de los *enhancer* a la vía de Ras1 mediante clones de expresión constitutiva de *Ras<sup>V12</sup>*. En este nuevo contexto se observó que los *enhancers* de cerebro que contienen el ETS1 y el ETS3 eran capaces de activar la expresión del lacZ en disco imaginal de ala y de ojo respectivamente (figura 28). Este resultado revela la capacidad de ambos *enhancers* de responder a Ras1. Aunque es probable que esta respuesta se deba a la unión directa de Pnt a los ETS descritos en cada una de las construcciones, falta confirmar la especificidad mutando el los ETS de los *enhancers*.



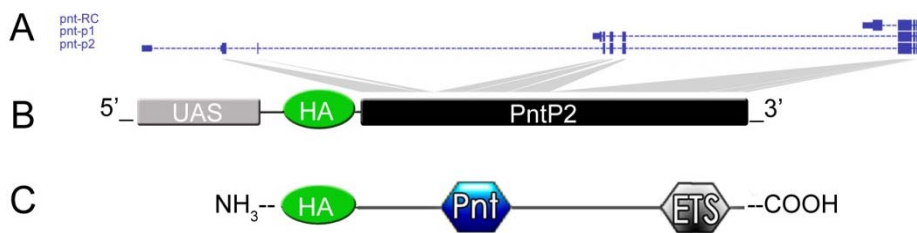
**Figura 28. Ras activa la expresión de los reportero-LacZ.** (A, B) clones de expresión de *Ras<sup>V12</sup>* (marcados con con GFP) en larvas transgénicas que contiene el *enhancer* con el ETS1 (A) y el ETS3 (B) activan la expresión de lacZ, (teñido con anti-β galactosidasa) en disco imaginal de ala (A) y en disco imaginal de ojo (B). Paneles de la derecha: detalle de la región indicada por los recuadros blancos. Línea amarilla: límite de los clones. Barras de escala: 10μm.

Ya que con los experimentos de reporteros-lacZ no se consiguió mimetizar la expresión de *App1* en ojo como cabría esperar y falta por confirmar la especificidad de la respuesta de los *enhancers* en los experimentos con clones, decimos enfrentar la pregunta a través de otro tipo de aproximación experimental.

### Ensayos de InmunoPrecipitaciones de Cromatina (ChIP)

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) se utiliza para investigar posibles interacciones proteína-DNA. Su objetivo es determinar si ciertas proteínas están asociadas con ciertas regiones genómicas, en nuestro caso, si el factor de transcripción Pnt está asociado con los ETS descritos en *App1*. Para llevar a cabo esta técnica, es vital disponer de anticuerpos específicos que reconozcan la proteína de estudio, sin embargo, en nuestro laboratorio no disponemos de anticuerpos que reconozcan la proteína Pnt. En consecuencia, el primer paso fue el de construir una proteína Pnt reconocible, es decir, una proteína Pnt con el epítipo de la hemaglutinina (HA).

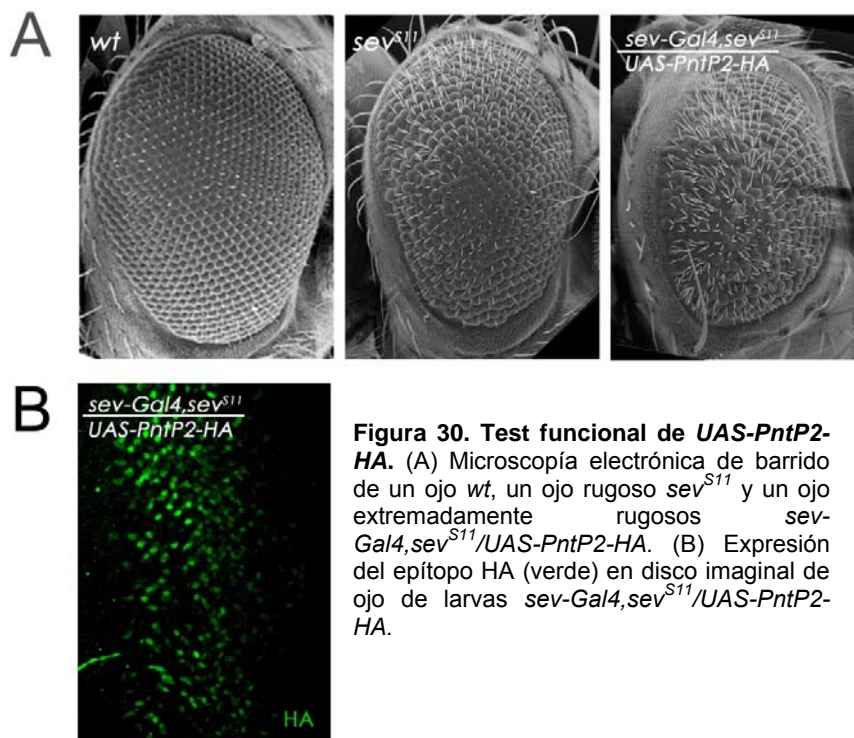
Pnt codifica dos activadores transcripcionales: *PntP1* y *PntP2* (Klambt, 1993; Scholz et al., 1997). Mientras que el papel de PntP1 en el desarrollo de ojo no está bien establecido, se sabe que la MAPK fosforila y activa PntP2 durante la especificación de los fotorreceptores (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994). Por este motivo utilizamos el cDNA de *PntP2* para la construcción de la proteína de fusión PntP2-HA. La secuencia génica del epítipo HA, un tipo de hemaglutinina que se encuentra en la superficie del virus *influenza* (Wiley and Skehel, 1987), se situó a 5' de *Pnt* para no interferir con el *dominio ETS* de unión a DNA que se encuentra hacia el final del cDNA de *Pnt* (figura 29 B y C).



**Figura 29. Construcción *UAS-PntP2-HA*.** (A) RefSeq genes correspondientes al locus *Pnt*. (B) Representación gráfica de la construcción *UAS-PntP2-HA* que se utilizó para generar moscas transgénicas. De 5' a 3': promotor inducible *UAS*, secuencia de la hemaglutinina (*HA*), cDNA de la isoforma *PntP2*. (C) Proteína de fusión *PntP2-HA*. De N-terminal a C-terminal: epítipo *HA*, *PntP2* con los dominios descritos por ScanProsite *Pnt* y *ETS*.

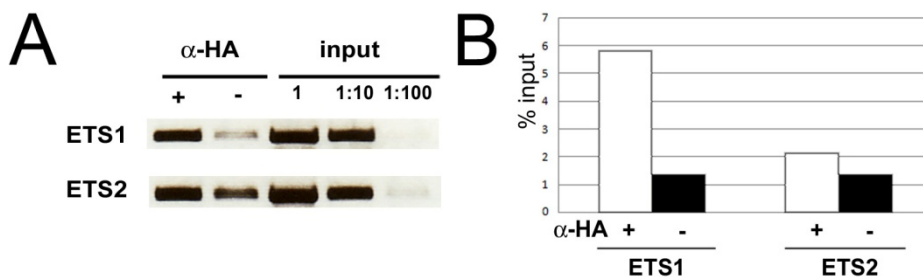
Finalmente toda la construcción se colocó *downstream* del promotor inducible UAS y se utilizó para obtener moscas transgénicas. En la figura 29 se puede observar una representación gráfica de la construcción.

Antes de utilizar la construcción *UAS-PntP2-HA* para los experimentos de ChIP, quisimos evaluar el efecto de su expresión en el desarrollo de ojo y comprobar así que estuviera funcionando correctamente. PntP2 no es capaz de unirse al DNA a no ser que esté fosforilado por MAPK (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994), por lo tanto decidimos incrementar las posibilidades de esta fosforilación dirigiendo la expresión de *PntP2* en un fondo en el que la vía de Ras1 estuviera constitutivamente activa; un fondo *sev<sup>S11</sup>*. La activación constitutiva de la vía de Ras1 en ojo tiene como resultado la transformación de células como a fotorreceptores R7 (Basler et al., 1991). Esta transformación lleva consigo una alteración de la estricta organización celular de los omatidios y como consecuencia, ojos con aspecto rugoso. La expresión de PntP2 en este contexto, debería incrementar el número de células como transformadas a R7 y por lo tanto incrementar también la rugosidad. Tal y como se esperaba, la expresión de *PntP2-HA* en el fondo *sev<sup>S11</sup>* resulta en ojos mucho más rugosos que en el genotipo *sev<sup>S11</sup>* por sí solo (figura 30), lo que demuestra la capacidad funcional de la construcción.



**Figura 30. Test funcional de *UAS-PntP2-HA*.** (A) Microscopía electrónica de barrido de un ojo *wt*, un ojo rugoso *sev<sup>S11</sup>* y un ojo extremadamente rugoso *sev-Gal4, sev<sup>S11</sup>/UAS-PntP2-HA*. (B) Expresión del epítipo HA (verde) en disco imaginal de ojo de larvas *sev-Gal4, sev<sup>S11</sup>/UAS-PntP2-HA*.

Posteriormente, se llevaron a cabo los experimentos de ChIP utilizando discos imaginales de ojo del genotipo previamente caracterizado *sev-Gal4,sev<sup>S11</sup>/UAS-PntP2-HA* (figura 30) como fuente de cromatina y el anticuerpo anti-HA para inmunoprecipitar el extracto. Como input del ensayo se utilizo un 10% del extracto sin inmunoprecipitar y como control negativo una muestra inmunoprecipitada sin anticuerpo, de manera que solo se obtuviera DNA unido a Pnt de manera inespecifica. El nivel de enriquecimiento de las regiones correspondientes al ETS1 y al ETS2 se analizó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y muestra que la región ETS1 unida a PntP2 está enriquecida respecto a la región ETS2 (figura 31).

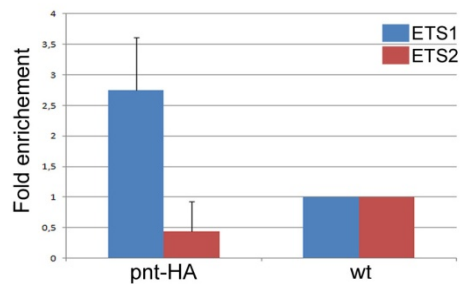


**Figura 31. ChIP de discos imaginales de ojo.** Ensayos de ChIP de discos *sev-Gal4,sev<sup>S11</sup>/UAS-PntP2-HA* inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-HA (+). Como control negativo, una alícuota se inmunoprecipitó sin anticuerpo (-). Una parte de la extracción de cromatina sin inmunoprecipitar se utilizó como input. (A) Regiones de ~500 pb correspondientes al ETS1 y al ETS2 amplificadas por PCR. (B) Cuantificación de las bandas de PCR, normalizadas respecto al input y representadas como porcentaje del input.

Durante la ejecución del experimento de ChIP pudimos observar que otras regiones de DNA que a priori no deberían unirse a PntP2 ya que no se encontró en ellas secuencias ETS, presentaban cierto enriquecimiento en la muestra (datos no mostrados). Esto nos llevo a pensar que el anticuerpo anti-HA estaba introduciendo un *background* que no estábamos teniendo en cuenta. La introducción exógena del epítipo HA que se utiliza en el experimento para reconocer PntP2, nos permitió observar cuál era el background del anticuerpo al realizar los experimentos de inmunoprecipitación en discos de ojo de tipo salvaje, ya que estos no expresan dicho epítipo. El enriquecimiento de las regiones ETS1 y ETS2 de discos de ojo de tipo salvaje inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-HA, se

utilizó para normalizar los resultados obtenidos anteriormente, obteniendo iguales resultados: región ETS1 unida a PntP2 enriquecida respecto a la región ETS2 (figura 32). En conjunto, estos resultados demuestran que *App1* es un target directo de la vía de Ras1, la cual controla la expresión de *App1* a través de la unión directa de PntP2 al ETS1.

Falta por analizar la capacidad de PntP2 de unirse a otros ETS, con especial interés en el ETS3, el cual consideramos un buen candidato ya que ha demostrado ser un *enhancer* de cerebro (figura 27) que responde a la activación de Ras1 (figura 28). Sin embargo al realizar PCRs de esta región obtuvimos un patrón de bandas inespecífico que imposibilitó el análisis en los experimentos de ChIPs (datos no mostrados).

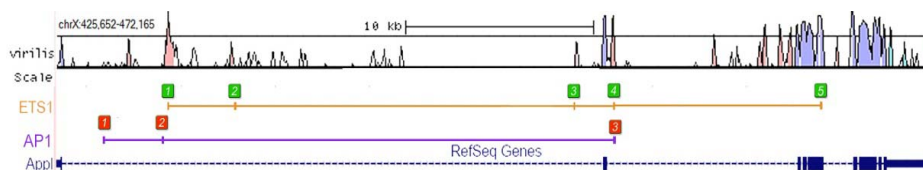


**Figura 32. Control del anticuerpo en los ensayos de ChIP.** Extracciones de cromatina de discos imaginales de ojo de tipo salvaje (*wt*) y discos del genotipo *sev-Gal4,sev<sup>S11</sup>/UAS-PntP2-HA* (*pnt-HA*) se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-HA. Como control negativo, una alícuota se inmunoprecipitó sin anticuerpo. Regiones de ~500 pb correspondientes al ETS1 y al ETS2 fueron amplificadas por PCR. En la figura se muestra el enriquecimiento de las bandas de PCR respecto el control negativo, una vez cuantificadas y normalizadas respecto la muestra de tipo salvaje.

## 5. El factor de transcripción fos en la regulación de *Appl*

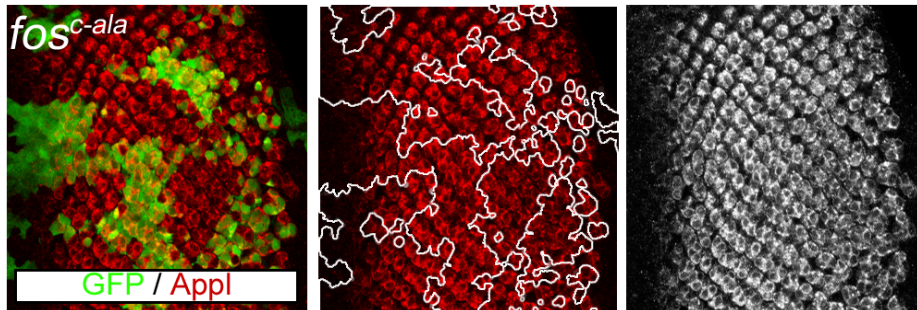
La vía de Ras1 controla la determinación de los fotorreceptores a través de al menos otros dos factores de transcripción: jun y fos (Bohmann et al., 1994; Ciapponi et al., 2001; Peverali et al., 1996; Treier et al., 1995). Ambos son miembros de la familia AP-1 y pueden cooperar formando complejos heterodiméricos de unión a DNA (Leppa and Bohmann, 1999; Peverali et al., 1996; Sluss et al., 1996; Wisdom, 1999). Es importante también mencionar que Treier y colaboradores en 1995 propusieron una labor conjunta de jun y Pnt actuando sobre los mismos genes diana para promover la diferenciación neuronal durante el desarrollo de ojo. En conjunto, esta información hizo que nos planteáramos la posibilidad de que, alguno de los dos o bien ambos miembros de la familia AP-1, estuvieran regulando la expresión de *Appl* en combinación con Pnt.

Para investigar esta posibilidad, en primer lugar realizamos una búsqueda en el promotor y en los intrones de *Appl* de secuencias AP-1 conservadas usando los modelos predictivos de Jaspar (Portales-Casamar et al., 2010) y Transfac (Matys et al., 2003) y la pista de conservación del Browser UCSC (Kuhn et al., 2007). A través de este sistema de predicción *in silico* encontramos tres secuencias AP-1 conservadas (figura 33). Curiosamente dos de estas secuencia AP-1 (2 y 3) se encuentran muy próximas a otras dos secuencias ETS (1 y 4 respectivamente) formando, a lo mejor, parte del mismo *enhancer*.



**Figura 33. Los sitios AP-1 de *Appl*.** Gráfica de los sitios AP-1(1-3) y ETS (1-5) de *Appl* y comparación VISTA de los genes *Appl* de *D. melanogaster* y *D. virilis*.

Este resultado apoya la posibilidad de que alguno o ambos miembros de la familia AP1 se estén uniendo físicamente a *App1* para regular de alguna forma su expresión. Sin embargo, al realizar clones *Flip-out* del alelo no fosforilable *fos<sup>c-ala</sup>*, que actúa como un dominante negativo de *fos*, no se observó ningún efecto sobre la expresión de *App1* (figura 34).



**Figura 34. fos no regula la expresión de *App1*.** Inmunotinción de *App1* (rojo) en discos de ojo con clones expresando *fos<sup>c-ala</sup>*. Los clones están marcados con GFP y con una línea blanca en el panel central. En todas las imágenes anterior está a la izquierda. Surco morfogénico: chevron. Barras de escala: 10 $\mu$ m

Falta por analizar el efecto de *jun* sobre la expresión de *App1*, pero parece que al menos *fos* no tiene ningún papel en este proceso. Podría ser que la activación de *App1* vía *Ras1* este mediada de forma específica a través de *Pnt*.



## 6. La vía de Ras1 en la regulación de *Appb* de *Danio rerio*

*Appl* es el ortólogo del gen *APP* de humanos que como se ha explicado en la introducción es el precursor del péptido A $\beta$  cuya acumulación correlaciona en muchos casos con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Hardy and Selkoe, 2002; Rosen et al., 1989). Ciertas mutaciones en la secuencia genómica de *APP* que favorecen la producción del péptido A $\beta$  parecen ser la causa de algunos casos de Alzheimer familiar enfermedad (Koo et al., 1990; Palmert et al., 1988). También la expresión incrementada de *APP* parece estar involucrada en casos hereditarios y podría ser la base de la aparición temprana de Alzheimer en pacientes con síndrome de Down (Querfurth et al., 1995). Por lo tanto, conocer cuáles son las vías que controlan la transcripción de *APP* podría tener implicaciones biomédicas, lo que nos hizo plantearnos la siguiente pregunta: ¿Está conservada la regulación de *Appl* vía Ras1 en otros organismos?.

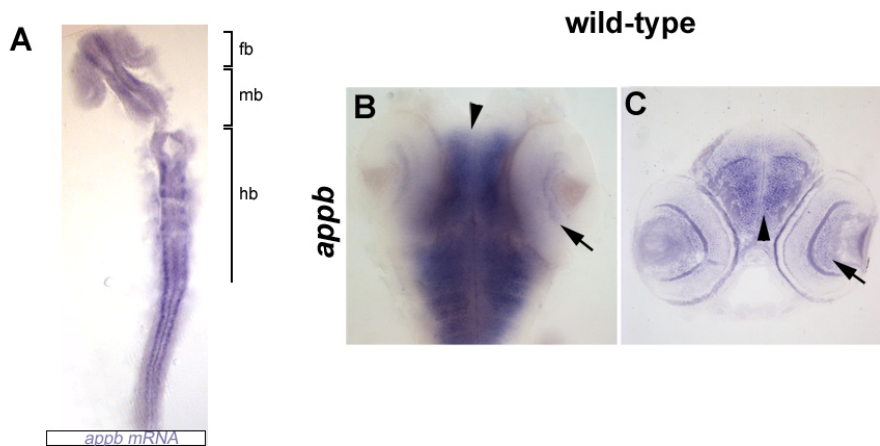
En varios estudios con cultivos de células de mamífero se ha observado que la expresión de *APP* está estimulada por la vía de Ras1 (Lahiri and Nall, 1995; Ohyagi and Tabira, 1993; Ruiz-Leon and Pascual, 2001; Xu and Rubin, 1993), sin embargo, existe cierta controversia en las observaciones hechas *in vivo*, (Forloni et al., 1993; Mobley et al., 1988) que por otro lado han sido escasas. Por ello, decidimos incrementar la información existe sobre el campo, introduciendo un nuevo estudio *in vivo* sobre la regulación de *Appb* en el vertebrado *Danio rerio*.

### La vía de Ras activa la expresión del gen *Appb* de *D.rerio*

Se ha demostrado que debido a una duplicación del genoma, el pez cebra comparado con mamíferos, tiene a menudo genes duplicados. Este es el caso del gen *APP* de mamífero, que en pez cebra tiene dos ortólogos: *Appa* y *Appb* (Musa et al., 2001). Durante las primeras 24 horas del desarrollo ambos parálogos tienen una expresión generalizada en el tejido nervioso (figura 36A; Musa et al., 2001), que ya presenta diferencias. Estas diferencias en el patrón de expresión se hacen más evidentes en estadios avanzados. En base a la expresión tardía de *Appb*, similar a la de humano y a la de *Drosophila*, ya que está restringida a sistema nervioso y vasculatura (Figura 35 B y C; Lee and



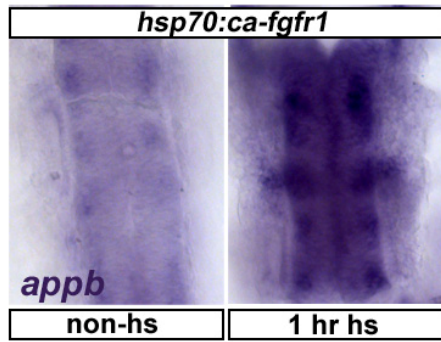
Cole, 2007), decidimos escoger este parólogo para investigar el efecto de la vía de Ras1 sobre su expresión.



**Figura 35. Expresión de *Appb*.** Hibridación *in situ* de *Appb* en embriones de 24 (A) y de 60 horas (B y C) de desarrollo. (A) *flat mount* en la que se puede observar la expresión temprana de *Appb* en sistema nervioso (*fb:forebrain*, *mb:midbrain*, *hb:hidbrain*). *Whole mount* (B) y sección transversal (C) que muestran la elevada expresión de *Appb* en el cerebro (punta de flecha) y en la retina (flecha).

Para manipular la vía de Ras en embriones de pez cebra hemos utilizado la línea transgénica Tg(hsp70:ca-fgfr1) (Eswarakumar et al., 2005; Kouhara et al., 1997; Marques et al., 2008). La construcción ca-fgfr1 codifica una forma constitutivamente activa del *Fibroblast Growth Factor Receptor1* (*fgfr1*) de *Xenopus* que bajo el control del promotor hsp70 puede inducirse por choque térmico. Al comparar hibridaciones *in situ* de *Appb* en embriones de 24 horas sin choque térmico y embriones de 24 horas que a las 13 horas después de la fertilización del huevo se les había aplicado una hora de choque térmico, se puede observar que hay un incremento generalizado de la expresión de *Appb* ligado a la activación de *fgfr1* (figura 36).

Este resultado apoya la hipótesis de que la regulación de la vía de Ras1 sobre la transcripción de *Appl* está conservada en la familia génica *APP*. Sin embargo aun quedan varias cuestiones pendientes. Una de las más acuciantes radica en la diferenciación neuronal promovida por la vía de Ras. Ya que la expresión de los distintos miembros de la familia *APP* está en parte asociada a este tipo celular, es difícil distinguir si el incremento de la expresión que se observa al activar la vía de Ras, es un efecto directo o una consecuencia de la diferenciación neuronal. Con *Drosophila* hemos podido resolver el problema, con pez cebra es una cuestión pendiente.



**Figura 36. Expresión de *Appb* en embriones *hsp70:ca-fgfr1*.** *In situ* de *Appb* en embriones de 24 horas sin choque térmico (derecha) y con una hora de choque térmico (izquierda) muestra un incremento de la expresión de *Appb* en cerebro posterior y ganglios sensoriales.

## 7. La función de Appl en el fotorreceptor R7

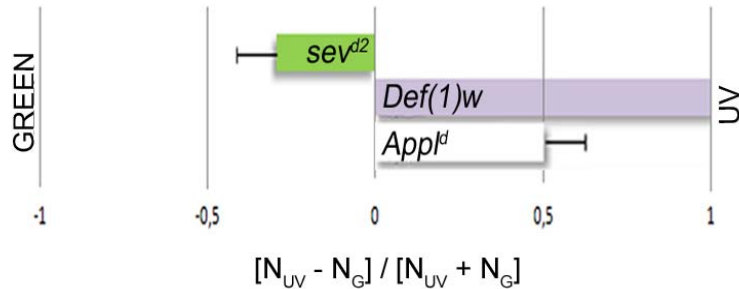
Los experimentos realizados hasta el momento sitúan a *Appl downstream* de la vía de Ras1 aparentemente en todos los fotorreceptores. Sin embargo, este vínculo parece particularmente sólido en el R7, donde la actividad de la vía y la expresión del *target* están ambas incrementadas en comparación con el resto de fotorreceptores. Esta observación hizo que nos planteáramos cuál podría ser la función de Appl en el fotorreceptor R7.

### Appl está implicado en el desarrollo del R7

Los fotorreceptores del ojo de *Drosophila*, pueden dividirse en tres subtipos según su contenido de opsinas. Los fotorreceptores externos (R1-R6) expresan la opsina Rh1 que es sensible a un amplio espectro de longitudes de onda, máxima en el rango del verde (Feiler et al., 1988; O'Tousa et al., 1985; Zuker et al., 1985), los fotorreceptores interiores R7 y R8 tienen patrones más complejos de expresión de opsinas: el fotorreceptor R7 expresa las opsinas sensibles a la luz ultravioleta Rh3 o Rh4 (Fryxell and Meyerowitz, 1987; Montell et al., 1987; Zuker et al., 1987), mientras que el R8 expresa la opsina Rh5 sensible a la luz azul o la Rh6 sensible a la luz verde (Chou et al., 1996; Chou et al., 1999; Huber et al., 1997; Papatsenko et al., 1997). El único fotorreceptor sensible a la luz ultravioleta es por tanto el fotorreceptor R7.

La ausencia de R7s en moscas con alelos de pérdida de función de *sev*, no afecta al fototropismo positivo que se observa en ensayos de comportamiento donde las moscas tienen que elegir entre luz y oscuridad (Fischbach, 1979). Sin embargo, en ensayos de preferencia espectral, las moscas mutantes *sev*, prefieren la luz visible a intensidades en las que las moscas de tipo salvaje tienen una fuerte preferencia por la luz ultravioleta (figura 23; Gerresheim, 1981; Harris et al., 1976). La elección entre luz ultravioleta y luz visible representa un robusto ensayo funcional que ha sido utilizado en diferentes *screenings* genéticos para la identificación de genes esenciales del desarrollo del R7 (Choe and Clandinin, 2005). Nosotros, hemos utilizado este mismo ensayo con moscas *Appl<sup>d</sup>* que a causa de una delección de la región del cromosoma X que corresponde al locus de *Appl* han pérdida por completo la expresión de la proteína (Luo et al., 1992). Para

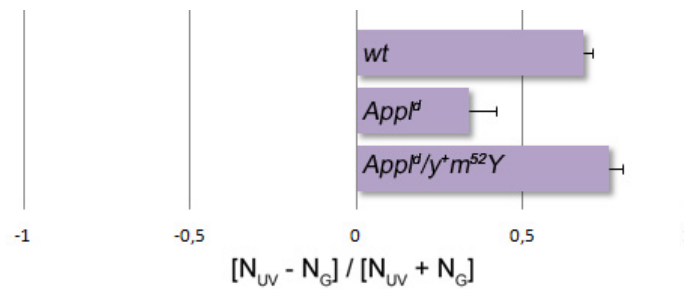
ello construimos un laberinto en forma de T con fuentes de luz ultravioleta y luz visible en los extremos (ver material y métodos para más detalle) y dejamos que las moscas eligieran entre estas dos condiciones durante 30 segundos. Como se puede ver en la figura 37, las moscas *Appl<sup>d</sup>* muestran una preferencia reducida por el ultravioleta en comparación con el caso control.



**Figura 37: *Appl* está implicado en la detección de la luz ultravioleta.** Ensayos de preferencia espectral basada en la discriminación entre la luz verde y ultravioleta. El número de moscas que elige la luz ultravioleta ( $N_{UV}$ ) y que elige la luz verde ( $N_G$ ) se cuenta y se utiliza para calcular el índice de elección  $[N_{UV} - N_G] / [N_{UV} + N_G]$ . Las moscas *Df(1)w* que se utilizaron como control tienden a moverse hacia la luz ultravioleta, mientras que las moscas *sev<sup>d2</sup>*, que carecen de R7s, se mueven hacia la luz verde. Las moscas *Appl<sup>d</sup>* tienden a moverse hacia el ultravioleta pero en menor medida que las moscas control.

La mutación *Appl<sup>d</sup>* se generó por la translocación de una duplicación que contiene todos los genes distales de *Appl* ( $y^1m^{64}$ ), al brazo derecho de un cromosoma X con delección terminal hasta el locus de *Appl* (*Df(1) RT<sup>518</sup>*). Esta construcción además de la delección de la región central de *Appl* genera una mutación en el gen *scute* (*sc*) (Luo et al., 1992; L.Torroja comunicación personal). *Sc* es un gen proneural que codifica un factor de transcripción *helix-loop-helix* que se requiere para la formación de órganos sensoriales externos como las macroquetas o los pelos sensoriales, pero no el desarrollo del ojo, donde el gen proneural implicado es *atonal* (Jarman et al., 1994), y solo si se expresa *sc* ectópicamente puede inducir la formación de omatidios (Sun et al., 2000). Sin embargo, *sc* sí se expresa en la médula (Egger et al., 2007) y aunque su función no es esencial, se cree que podría tener un papel redundante junto con *lethal of scute* en la regulación temporal de la formación de neuroblastos de la médula (Yasugi et al., 2008). Para descartar que el efecto observado en moscas *Appl<sup>d</sup>* fuera debido a la mutación *sc* en vez de a la de *Appl*, utilizamos la construcción  $y^+m^{52}Y$ , una translocación del locus de *Appl* al cromosoma Y, que permite rescatar la expresión de *Appl* en machos

*Appl<sup>d</sup>* (Luo et al., 1992) y realizamos de nuevo los experimentos de preferencia espectral (Figura 38).



**Figura 38. *Appl* rescata el fenotipo *Appl<sup>d</sup>*.** Ensayos de preferencia espectral. El índice de elección se calculó como se indica en la figura 37. En la figura se observa que las moscas *Appl<sup>d</sup>/y<sup>+</sup>m<sup>52</sup>Y* son capaces de rescatar el comportamiento normal de preferencia por la luz ultravioleta que tienen las moscas control. Para este experimento solo se utilizaron machos. Es importante mencionar que en este experimento todos los genotipos están en fondo *UAS Appl* ya que forman parte de una serie de experimentos de rescate condicional que están en preparación.

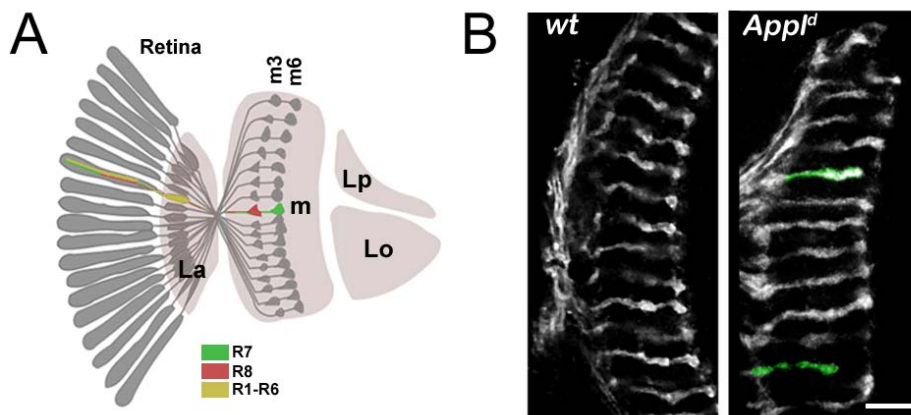
Este resultado indica que *Appl* y no *sc* está implicado de algún modo en el desarrollo del fotorreceptor R7 ya que su función última: la discriminación de la luz ultravioleta, está afectada en mutantes de *Appl* pero en machos *Appl<sup>d</sup>/y<sup>+</sup>m<sup>52</sup>Y*. Sin embargo no aporta información sobre el nivel al que está actuando *Appl*, ya que defectos en la determinación, la síntesis y estabilidad de las opsinas, la formación y guía de axones, la elección de compañero sináptico, la formación de la sinapsis o la neurotransmisión, entre otros, pueden dar lugar a resultados similares en ensayos de preferencia espectral.

### *Appl* está implicado en la guía axonal del R7

Ya que la vía de Ras1 está implicada en la determinación de los fotorreceptores y los resultados de esta tesis sitúan a *Appl* *downstream* de Ras1, decidimos explorar el papel de *Appl* en el proceso de determinación. Los ojos de las moscas *Appl<sup>d</sup>*, tienen una apariencia externa normal (datos no mostrados), sin la característica rugosidad que tienen los defectos en la determinación, de lo que inferimos que *Appl* no está involucrado en este proceso.

Defectos en la guía de los axones, que resultan en neuronas que no llegan al lugar correcto donde realizan la sinapsis, podrían fácilmente explicar los resultados observados en el ensayo de preferencia espectral, por ello decidimos explorar esta posibilidad. Las neuronas fotorreceptoras forman

sinapsis en distintos ganglios del lóbulo óptico, los fotorreceptores externos en la lámina y los fotorreceptores internos en la médula. La médula está organizada en columnas verticales y capas horizontales. Los R8 y R7 de un mismo omatidio proyectan sus axones en la misma columna pero en diferentes capas de la medula, M3 y M6 respectivamente (Figura 39A; Ting and Lee, 2007). La localización del axón del R7 en la médula se evaluó en moscas *Appl<sup>d</sup>*, observando un 2% de R7s con *targetin* incorrecto a diferencia de moscas de tipo salvaje que siempre desarrollan la conexión adecuada (figura 39B).

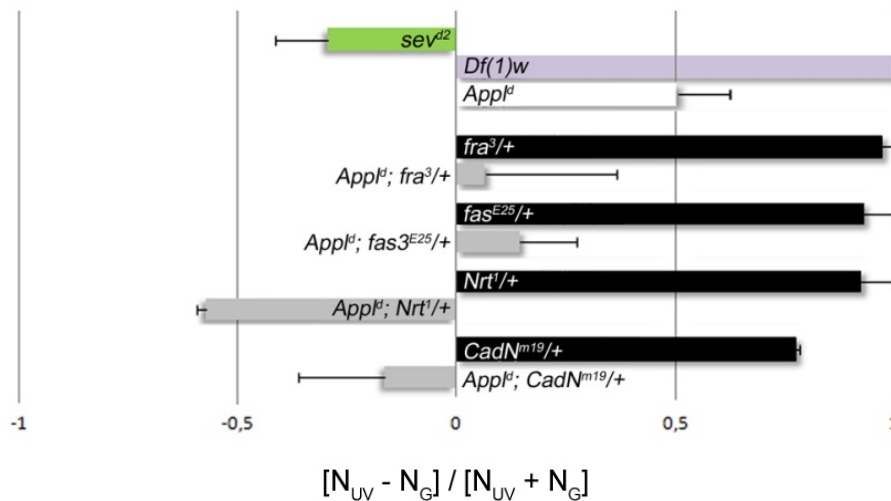


**Figura 39. *Appl* está implicado en la guía del axón del R7.** (A) Representación esquemática de las proyecciones de las células fotorreceptoras de la retina adulta en la lámina (La, R1-R6) y la médula (m, R8/R7) del lóbulo óptico. Se muestran también los ganglios ópticos más centrales (lobula [Lo] y la placa lobula [Lp]). (B) Tinción de los axones de los fotorreceptores R7 y R8 visualizados con anti-chaoptin en moscas de tipo salvaje (*wt*) y *Appl<sup>d</sup>*. Los R7 con errores con localización incorrecta se muestran coloreados en verde. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

### El fondo mutante de *Neurotactina* acentúa los fenotipos de *Appl*.

Siendo conscientes de la debilidad de los fenotipos, nos preguntamos si otras proteínas con una función similar podría estar compensando la pérdida de función de *Appl*. Esta posibilidad nos llevó a explorar el fenotipo *Appl<sup>d</sup>* en diferentes fondos heterocigotos de genes con participación descrita en el proceso de guía de axones. Con este objetivo se utilizaron los alelos *fra<sup>3</sup>* (Kolodziej et al., 1996), *fas<sup>E25</sup>* (Snow et al., 1989), *CadN<sup>m19</sup>* (Iwai et al., 1997)

y *Nrt<sup>1</sup>* (Speicher et al., 1998) de los respectivos genes *frazzled* (*fra*) (Bashaw and Goodman, 1999; Gong et al., 1999), *Fasciclina 3* (*Fas3*) (Rose and Chiba, 1999), *Cadherina-N* (*CadN*) (Ting et al., 2005) y *Neurotactina* (*Nrt*) (Hortsch et al., 1990) solos y en combinación con *App<sup>d</sup>* en ensayos de preferencia espectral (figura 40).



**Figura 40: El fondo *Nrt<sup>1</sup>* acentúa el fenotipo *App<sup>d</sup>* en ensayos de preferencia espectral.** Para calcular el índice de elección  $([N_{UV} - N_G] / [N_{UV} + N_G])$  se realizó el recuento del número de moscas que eligió la luz ultravioleta ( $N_{UV}$ ) y la luz verde ( $N_G$ ). Barra blanca: *App<sup>d</sup>*. Barras grises: *App<sup>d</sup>* en combinación con *fra<sup>3</sup>*, *fas<sup>E25</sup>*, *CadN<sup>m19</sup>* y *Nrt<sup>1</sup>*. Barras negras: *fra<sup>3</sup>*, *fas<sup>E25</sup>*, *CadN<sup>m19</sup>* y *Nrt<sup>1</sup>* por sí solos. La barra lila y verde representan el índice de elección del control *Df(1)w* y de *sev<sup>d2</sup>* respectivamente.

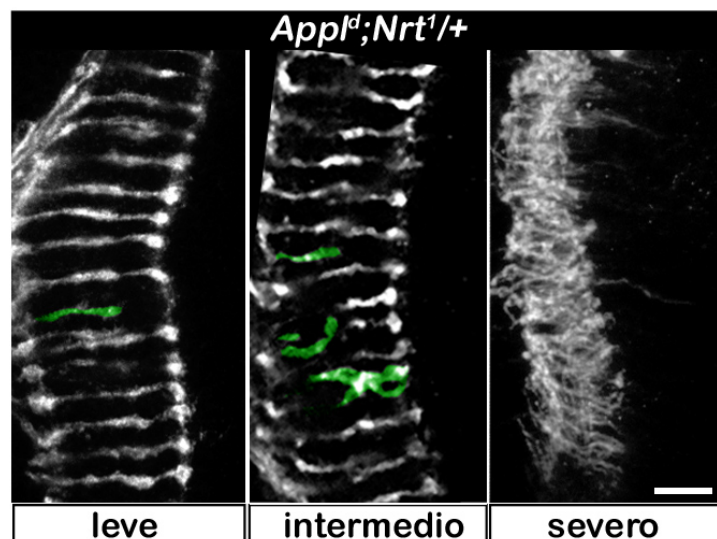
En estos ensayos se observó que el fondo *Nrt<sup>1</sup>* acentuaba de forma muy clara el fenotipo de *App<sup>d</sup>*. En el resto de combinaciones sin embargo, el resultado podría atribuirse en gran parte a un efecto aditivo. Estos datos, sugieren una interacción genética entre *App<sup>d</sup>* y *Nrt<sup>1</sup>* previamente señalada por (Merdes et al., 2004). *Nrt* es una molécula de adhesión celular (CAM) que trabaja en concierto junto con otras CAMs durante el proceso de guía de axones (Speicher et al., 1998). Se sospecha que tiene algún papel en el proceso de guía de axones de los fotorreceptores (Ruan et al., 2002) aunque nunca se ha estudiado en profundidad. En base a esta información y junto con los resultados obtenidos, parece probable que el fenotipo de *App<sup>d</sup>* en la guía del axón del R7 esté también acentuado en el fondo *Nrt<sup>1</sup>*. Para comprobar esta posibilidad, se evaluó la localización del axón del R7 en médulas de moscas *App<sup>d</sup>;Nrt<sup>1</sup>/+*. Al analizar los resultados se observó que

teniendo el mismo genotipo, había distintos fenotipos con diferencias en la severidad.

Los fenotipos (en una muestra con n=14) se dividieron en tres categorías:

- fenotipo leve: con un 3% de R7 deslocalizados, que se asemeja al de los mutantes *Appl<sup>d</sup>*, en el 56% de los cerebros contados.
- fenotipo Intermedio: con 12,5% de R7 deslocalizados, que supone una acentuación del fenotipo *Appl<sup>d</sup>*, en el 30% de los cerebros contados
- fenotipo severo: con los axones completamente desorganizados, en un 14% de los cerebros contados

En la figura 41 se muestra un ejemplo de cada categoría.



**Figura 41.** El fondo *Nrt<sup>1</sup>* acentúa el fenotipo *Appl<sup>d</sup>* en la guía del axón del R7. Tinción de los axones de los fotorreceptores R7 y R8 visualizados con anti-chaoptin en moscas *Appl<sup>d</sup>;Nrt<sup>1</sup>/+*, clasificados en tres categorías según la severidad del fenotipo. Los R7 con localización incorrecta se muestran coloreados en verde. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

De nuevo estos datos sugieren una interacción genética entre *Appl* y *Nrt* pero sobretodo refuerzan el papel de *Appl* en el guía del axón del R7 que podría ser la causa de los defectos observados en la detección de la luz ultravioleta.





## DISCUSIÓN



Uno de los grandes retos de la biología del desarrollo ha sido y es entender cómo se integran las distintas vías de señalización para que una célula active un destino celular específico. El desarrollo del ojo de *Drosophila* se ha utilizado durante años para descifrar el entramado de vías de señalización involucradas en el proceso y se ha alcanzando un gran nivel de conocimiento sobre las causas por las cuales una célula desencadena una determinada respuesta de diferenciación neural. El siguiente reto que queda por afrontar es el de descifrar en qué consiste esta respuesta.

## 1. El transcriptoma de *sevenless*

Las características de expresión y activación del receptor Sevenless durante el desarrollo del R7 nos ofrecen la oportunidad de manipular un destino celular sin alterar el resto de procesos del desarrollo. *Sev* ha sido un elemento clave en el desarrollo de esta tesis ya que la cuestión de partida que la ha motivado ha sido precisamente conocer cuáles son las características del fotorreceptor R7 que le hacen diferente al resto de fotorreceptores. Para responder esta pregunta hemos realizado un análisis de micrarrays que nos ha proporcionado una lista de genes cuya expresión se modifica en respuesta a alteraciones en *sev*. De todos los candidatos, nos hemos centrado en aquellos que al tener ETS conservados podrían responder de forma directa via Ras1/MAPK/PntP2.

Antes de comentar los resultados referentes a los *genes diana con ETS* me gustaría mencionar el caso particular de tres genes que identificamos como *genes diana: sev, Pnt y phyl*, ya que los tres son miembros clave de la vía Ras1, aunque solo *phyl* tiene ETS conservados. Varias publicaciones muestran que la isoforma P1 de *Pnt* y *phyl* están activadas transcripcionalmente por la vía de Ras1 (Chang et al., 1995; Dickson et al., 1995; Gabay et al., 1996). Esta observación pone de manifiesto una de las limitaciones del análisis realizado, ya que al considerar únicamente los ETS conservados estamos perdiendo aquellos ETS que pudiendo ser funcionales no están conservados. Las características de la matriz ETS hacen que sea relativamente fácil encontrar dianas en el genoma por azar, por ello decidimos aceptar el compromiso de perder candidatos en favor de solidez y fiabilidad. De todas formas, aunque la conservación de secuencia de regiones no codificantes es un indicador de *enhancers* potenciales (Visel et al., 2007), no hay que olvidar que son predicciones y hay

que validarlas. Por otro lado, *sev* aparece como un *gen diana* de su propio transcriptoma, sugiriendo un interesante *feedback loop* positivo que no se había propuesto hasta la fecha.

Respecto a los *genes diana con ETS*, la combinación de los resultados obtenidos de los microarrays con la búsqueda *in silico* de secuencias ETS nos ha permitido cuestionarnos no solo cuáles son los genes característicos del R7, si no cuáles de estos genes son dependientes de forma directa de la vía Ras1. Esta estrategia nos ha proporcionado una lista de genes enriquecida en categorías funcionales como: *vía de Notch*, *neurogénesis*, *transcripción*, *proteínas del desarrollo y diferenciación*. En conjunto estas categorías incluyen genes que estarían implicados en determinación y en diferenciación del R7.

### Determinación: Diálogo con la vía Notch

La determinación del fotorreceptor R7 depende de la capacidad del precursor de alcanzar niveles altos de Ras1. El aporte de *Sev* es por tanto crucial ya que al converger junto con DER en la misma cascada de señalización posibilita que se alcance el umbral de activación de Ras1 capaz de generar una respuesta. Este umbral característico se mantiene, al menos en parte, por la vía Notch que activa en el R7 la transcripción de *Yan* (Rohrbaugh et al., 2002), el antagonista de Pnt. Por otro lado la vía Notch facilita la determinación del fotorreceptor activando la transcripción de genes característicos de este destino celular, incluyendo el propio *sev* (Cooper and Bray, 2000; Tomlinson et al., 2011). En conjunto estas dos funciones ponen de manifiesto que la vía Notch tiene un papel dual en el proceso y sirven como ejemplo de la intrincada interacción entre las vías Notch y Ras1.

Procedentes del análisis de microarrays, encontramos tres *genes diana con ETS* que son miembros de la familia *enhancer of split (E(spl)-C)*, una familia génica activada transcripcionalmente por la vía Notch (Jennings et al., 1994). Dos de ellos *mβ* y *mγ* son factores de transcripción del tipo *helix-loop-helix (bHLH)*, los principales efectores de la vía Notch, mientras que *m4* forma parte de la familia *Bearded (Brd)* (Wurmbach et al., 1999). Las proteínas Bearded del locus *E(spl)* junto con las del locus *Brd-C* tienen un papel redundante en el establecimiento de un feedback negativo en la vía Notch, al antagonizar la activación del ligando Delta en la determinación de los órganos sensoriales de *Drosophila* (Chanet et al., 2009; Lai et al., 2000). Por lo tanto la regulación a nivel transcripcional de estos tres genes *E(Spl)* por la vía Ras1, podría significar un punto de encuentro entre las vías Ras1 y

Notch, que a través de  $m\beta$  y  $my$  promovería la vía Notch, mientras que a través de  $m4$  la inhibiría.

La combinatoria entre las vías Ras1 y Notch en el control de la determinación del R7 sugiere que los *genes diana* podrían tener promotores o *enhancers* con elementos de unión a factores de transcripción de ambas vías. Este tipo de regulación ya se ha demostrado en el desarrollo de las células como (Doroquez and Rebay, 2006). Sería interesante analizar la presencia de motivos de unión de  $Su(H)$  en los promotores e intrones de los 38 *genes diana con ETS*. Un análisis preliminar de los promotores de estos genes con el programa CBS (<http://compfly.bio.ub.es>; Blanco et al., en revisión), muestra que el motivo  $Su(H)$  está enriquecido en este grupo en comparación con el genoma completo de *Drosophila* (p-valor  $1 \cdot 10^{-16}$ ). Aunque requiere de un análisis profundo que incluya intrones y validaciones, el resultado es al menos sugerente, y esboza un nuevo punto de encuentro dentro del complejo diálogo entre estas dos vías.

### Diferenciación: procesos de guía de axones

*Longitudinal lacking (lola)*, *off-track (otk)* y *Appl* son tres *genes diana con ETS* agrupados dentro de la categoría *neurogénesis* que hemos encontrado enriquecida en el análisis de microarrays. Tanto *lola* como *otk* son genes que se sabe están involucrados en el proceso de guía de axones (Cafferty et al., 2004; Giniger et al., 1994; Madden et al., 1999; Pulido et al., 1992). El factor de transcripción *lola* actúa en varios procesos de guía de axones en el desarrollo del sistema nervioso (Goetze et al., 2003; Seeger et al., 1993) y en la proyección de las neuronas olfativas en el adulto (Spletter et al., 2007). Recientemente se han identificado varios genes implicados en la formación de axones y el desarrollo del ojo que son dependientes de *lola* (Gates et al., 2011). Además, se ha descrito que *lola* se expresa en disco imaginal de ojo e interviene en la determinación del R7, promoviendo este destino celular (Zheng and Carthew, 2008).

Asimismo, se sabe que *Otk* se expresa en todos los fotorreceptores e interviene en la guía de axones de R1 y R6 (Cafferty et al., 2004) y también durante el desarrollo del sistema nervioso en embriones (Winberg et al., 2001). Por otro lado, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis sugieren que *Appl* está involucrado en la guía del axón R7. Por lo tanto tres genes involucrados en la guía de axones y en diferenciación neuronal, podrían estar regulados de forma directa por la vía Ras1.

## 2. El gen *Appl*: Regulación de la expresión

A partir de los datos obtenidos del análisis de microarrays se seleccionó el gen *Appl* para realizar un análisis profundo de la relación con la vía Ras1 y de su función en el R7.

### La vía de Ras y la expresión de la familia APP

La relación de la vía Ras con la expresión de *APP* se ha planteado en diferentes estudios, sin embargo es todavía controvertida. Varios ligandos de receptores tirosina quinasa, tales como Nerve Growth factor (NGF) en cultivos de células de PC12 de rata (Cosgaya et al., 1996; Villa et al., 2001), y Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) y ácido retinoico (AR), en cultivos de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), estimulan la expresión de *APP* (Ruiz-Leon and Pascual, 2001; Ruiz-Leon and Pascual, 2004). Sin embargo, las células PC12 activan la diferenciación neuronal cuando se tratan con NGF (Greene, 1978) mientras que la diferenciación a neurona se puede activar en células SH-SY5Y al suplementar el medio con ácido retinoico (que activa la expresión del receptor tirosina quinasa-B (TRK-B)) y BDNF (que activa TRK-B) (Encinas et al., 2000; Kaplan et al., 1993). Por separado, BDNF y AR no pueden activar la diferenciación completa, aunque sí un fenotipo intermedio. De manera similar, BDNF y AR por sí solos, no pueden activar la transcripción de *APP*, pero sí BDNF con TrkB, o AR con BDNF ((Ruiz-Leon and Pascual, 2003). *APP* se expresa en sistema nervioso en condiciones normales, lo que plantea la cuestión de si la activación de la expresión de *APP* que se observa en estos experimentos es un efecto directo de la vía Ras, o una consecuencia de la diferenciación neural.

En nuestro trabajo, la expresión de *Appl* se observó incrementada en los microarrays en los que se comparaba discos de ojo *sev<sup>S11</sup>* con discos *wt* y se confirmó mediante hibridación *in situ* de discos de ojo del mismo genotipo. El incremento de la expresión de *Appl* en estos experimentos, de manera similar a lo que ocurre con los experimentos con células de mamíferos, está ligado a la diferenciación neural, ya que el alelo *sev<sup>S11</sup>* provoca transformación de las células cono (no neurales) a fotorreceptor R7 y por lo tanto tiene como resultado discos de ojo con mayor número de neuronas. También los experimentos en los que la inhibición de la activación de DER provoca pérdida de la expresión de *Appl* y la activación constitutiva de Ras1 genera expresión ectópica de *Appl*, están ligados a la diferenciación neural,

ya que *DER<sup>DN</sup>* impide la diferenciación de todos los fotorreceptores y *Ras<sup>V12</sup>* causa determinación de fotorreceptores ectópicos.

Preocupados por saber si la relación era directa o una consecuencia de la diferenciación neuronal, resolvimos estudiar el fotorreceptor R8 y aprovechar que la determinación de este fotorreceptor es independiente de la vía Ras1. De esta manera pudimos ver que R8s determinados en ausencia de Ras1 o de Pnt tenían niveles reducidos o casi inapreciables de *Appl*. La demostración definitiva de que *Appl* es un target directo surgió de los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en los que se detectó que PntP2 se unía al ETS1 de *Appl*.

En conjunto estos resultados obtenidos en *Drosophila* demuestran un mecanismo conservado por el que la vía Ras1 estimula la producción de *Appl*. Sin embargo otros estudios realizados *in vivo* introducen cierta controversia ya que NGF incrementa los niveles de mRNA de *APP* en cerebros de hámster pero no en cerebros de rata (Forloni et al., 1993; Mobley et al., 1988; Neve et al., 1996). En este trabajo introducimos un nuevo estudio realizado *in vivo* en el que se observa que la expresión del gen *Appb* de pez cebra se induce por activación del receptor fgfr1 apoyando la hipótesis de la conservación.

### Otros factores involucrados en la regulación de *Appl*

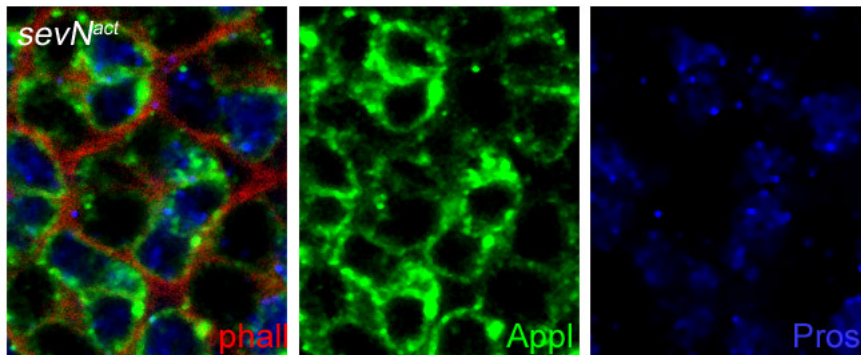
La inducción de *Appl* mediada por Ras1 en nuestros experimentos siempre ha estado circunscrita al ojo. Por ejemplo, en el experimento de clones *Ras<sup>V12</sup>* se puede observar que la activación de Ras1 genera expresión ectópica de *Appl*, pero sólo en las zonas próximas al surco morfogénico del disco de ojo y en ningún otro tejido. Este resultado manifiesta que se requiere de un contexto específico para la activación de *Appl* vía Ras1, y por tanto, muy probablemente de la colaboración de otros factores de transcripción.

En la búsqueda de otros factores de transcripción que pudieran estar involucrados en la regulación de *Appl*, analizamos fos el cual se sabe que responde a la activación de Ras1 en ojo y en otros contextos (Peverali et al., 1996). Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la expresión de *Appl*. Fos y jun dimerizan para actuar como factores de transcripción (Leppa and Bohmann, 1999; Peverali et al., 1996; Sluss et al., 1996; Wisdom, 1999) y quizá sea necesario trabajar con ambas proteínas a la vez para poder observar un efecto sobre *Appl*.

Como hemos comentado con anterioridad la combinatoria entre las vías Ras1 y Notch en el control de la determinación del R7 sugiere que los



*genes diana* podrían tener promotores o *enhancers* con elementos de unión a factores de transcripción de ambas vías. Aprovechando la disponibilidad del alelo *sevN<sup>act</sup>*, que dirige la expresión de Notch constitutivamente activo en todas las células del grupo de equivalencia hemos realizado un experimento preliminar para evaluar el posible efecto de Notch sobre la expresión de *Appl*. La activación ectópica de la vía Notch en los precursores R1/R6 hace que éstos se determinen como R7 (Cooper and Bray, 2000; Tomlinson and Struhl, 2001) y como se observa en la figura 42 las células transformadas a R7 tienen altos niveles de expresión de *Appl*. Este resultado aunque preliminar parece indicar que Notch también activa la expresión de *Appl* aunque se desconoce si directa o indirectamente. Esta cuestión es particularmente importante ya que recientemente se ha descrito que Notch activa la expresión de *sev* (Tomlinson et al., 2011).



**Figura 42. Notch activa la expresión de Appl.** Tinción de *Appl* en discos de ojo *sevNotch<sup>act</sup>* revela que los R7 extra generados por la activación constitutiva de *Notch*, presentan niveles altos de *Appl* (co-tinción anti-pros, azul; anti-*Appl*, verde). El contorno celular está marcado con phalloidina en Rojo. Anterior está a la izquierda.

### 3. El gen *App1*: El contexto genómico

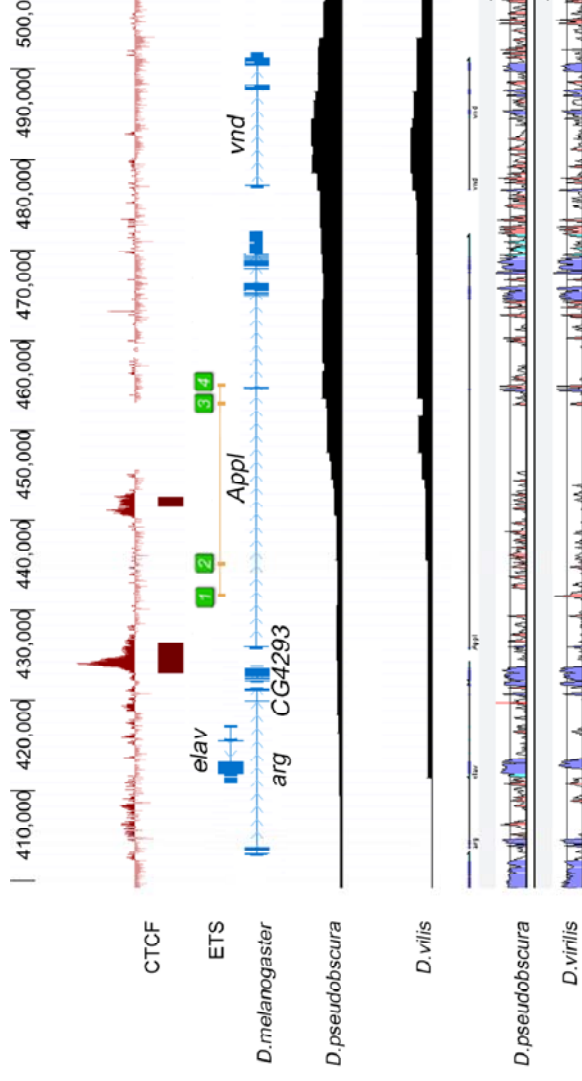
El gen *App1* se encuentra en el extremo del cromosoma X entre dos genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso: *embryonic lethal abnormal vision (elav)* y *ventral nervous system defective (vnd)* (Martin-Morris and White, 1990; Rosen et al., 1989). Como *App1*, *elav* se expresa exclusivamente en neuronas, desde el inicio de la diferenciación neuronal (Robinow and White, 1991) mientras que, *vnd* tiene un patrón de expresión complejo que es suma de dos isoformas con expresión no solapante (Stepchenko et al., 2011). La isoforma 2A se expresa desde estadios tempranos del desarrollo embrionario en los precursores de las neuronas, los neuroblastos a los que dan lugar y algunas de las células de la progenie de estos neuroblastos. Durante este estadio, se sabe que actúa como un gen proneural esencial para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Jimenez et al., 1995; Mellerick and Nirenberg, 1995). Más tarde se detecta en neuroblastos del ganglio ventral larvario y en la lámina del adulto (Stepchenko et al., 2011). La isoforma 2B por el contrario se expresa en neuronas en diferenciación incluyendo los fotorreceptores (Stepchenko et al., 2011). La proximidad en el genoma y la similitud en los patrones de expresión entre *App1* e *elav* plantea la posibilidad de una regulación conjunta a través de elementos reguladores compartidos, mientras que esa misma proximidad junto con los patrones de expresión tan diferentes entre *App1* y el gen de desarrollo *vnd* sugiere la existencia de algún elemento que los separe.

El rango de acción de un determinado grupo de *enhancers* se cree que está definido por elementos *insulator* a los que se une la proteína CTCF (Ohlsson et al., 2010). Aunque la función de CTCF no puede inferirse de su localización sobre el genoma, se sabe que algunos de los lugares a los que se une actúan como barreras, confinando la acción de los elementos reguladores a los genes que quedan dentro de los límites. Negre y colaboradores en 2011 hicieron públicos los lugares de unión de CTCF en *Drosophila* que habían detectado mediante la técnica *chip-on-chip* (Negre et al., 2011). Utilizando estos datos se puede ver que, al contrario de lo que se esperaría, los elementos que regulan *App1* e *elav* podrían estar separados por CTCF (Figura 43). Los elementos reguladores de *App1* y *vnd* también podrían estar separados por CTCF pero curiosamente la unión de CTCF que separaría estos dos módulos de expresión se produce dentro del primer intrón de *App1* (Figura 43) sugiriendo que los *enhancers* situados dentro de la

región genómica de *Appl* pero entre el *insulator* y *vnd* estarían regulando la expresión de *vnd* y no la de *Appl*.

Los genes clave del desarrollo como *vnd* con frecuencia muestran una regulación excepcionalmente compleja modulada por numerosos elementos reguladores que a menudo se extienden a los genes vecinos (Maeso et al., 2012; Nelson et al., 2004). Utilizando el programa Ancora (Engstrom et al., 2008), se puede observar que *vnd* se encuentra en una región con alta densidad de regiones conservadas que se extiende dentro de la región genómica de *Appl* incluyendo parte del primer intrón (figura 43), enfatizando por tanto la importancia de las secuencias intrónicas de *Appl* sobre la regulación de *vnd*.

En los experimentos de *enhancer lacZ*, se observó que el *enhancer* que contenía el ETS3 dirigía la expresión del *lacZ* en células que por tamaño y localización podrían asociarse a neuroblastos de la parte ventral del cerebro larvario y algunas neuronas en la parte dorsal (figura 27C). *Appl* solo colocaliza con la expresión de este *enhancer* en algunas células de la parte dorsal y nunca con los putativos neuroblastos (figura 27C) coincidiendo con la expresión exclusiva de neuronas posmitóticas previamente descrita para *Appl* (Martin-Morris and White, 1990; Torroja et al., 1996). Sin embargo *vnd* sí se expresa en neuroblastos ventrales del ganglio ventral larvario y en algunas de las células progenitoras de estos neuroblastos (Stepchenko et al., 2011). Como se observa en la figura 43 la unión de CTCF al primer intrón de *Appl*, separa el ETS3 de *Appl* y lo agrupa junto con *vnd* sugiriendo de nuevo que ciertas regiones intrónicas de *Appl* podría estar acumulando secuencias reguladoras que actúan sobre el gen del desarrollo *vnd* y no sobre *Appl*. El *enhancer* que engloba el ETS1 sin embargo colocaliza con *Appl* (Figura 27B) y coincide parcialmente con el patrón de expresión de *Appl* descrito en cerebro larvario (Torroja et al., 1996), reforzando la tesis de que la unión de PntP2 al ETS1 (figura 31) actúa activando la expresión de *Appl*.



**Figura 43. El contexto genómico de *Appl*.** Representación gráfica de varias características del contexto genómico de *Appl*. De arriba a abajo: *Chip on chip* de la proteína CTCF, los lugares de unión con un enriquecimiento significativo están representados por cajas. Genes Refseq que flanquean *Appl* y representación de la localización de los ETS conservados 1 y 3. Perfil de densidad de regiones conservadas que se obtiene mediante el programa Ancora al comparar *D. melanogaster* con *D.Pseudobscura* y *D.virilis* respectivamente (60 bp y >90% de similitud). Conservación de la región mostrada con el programa VISTA entre *D.melanogaster* y *D.Pseudobscura* y entre *D. melanogaster* y *D.virilis* (azu: exones, rosa: intrones y celeste:regiones UTRs)

## 4. La proteína Appl: la función en R7

El trabajo realizado define *Appl* como un gen *downstream* de la vía Ras1 con una estrecha relación con el R7 donde tanto la activación de la vía como la expresión de *Appl* están incrementadas respecto al resto de fotorreceptores. De esta relación se desprende una cuestión fundamental: ¿Cuál es la función de Appl en el R7?.

### Guía de axones

Los estudios previos sobre la función de Appl y de otros miembros de la familia APP aportan evidencias sólidas de un papel en sistema nervioso, adulto y en desarrollo, en diferentes procesos que pueden agruparse en tres clases: 1. Supervivencia y muerte celular, 2. Sinaptogénesis y transporte axonal y 3. Adhesión celular y crecimiento de neuritas. En este trabajo hemos observado que en mutantes *Appl<sup>d</sup>* la percepción de la luz ultravioleta está afectada, y que este mal funcionamiento es debido, al menos en parte, por una localización inadecuada de axones de R7, sugiriendo que Appl está involucrado en procesos de guía de axones. Este resultado se englobaría por tanto, dentro de la tercera categoría de funciones descritas, junto con el trabajo de Leyssen y colaboradores que en 2005 mostraron como Appl, a través de interacción con la quinasa Abl, puede inducir arborización axonal después de trauma cerebral en individuos adultos de *Drosophila*. Otro trabajo con una dirección similar es el realizado en el laboratorio del Dr. Bassem Hassan por la doctoranda Alessia Soldano (en revisión). En este trabajo los autores muestran que Appl actúa como un factor orientador de axones en *mushroom bodies* (MB; los centros de aprendizaje y memoria de *Drosophila*) para asegura que la ramificación de las neuronas sea la correcta. También en MB el papel de Appl esta mediado por la quinasa Abl a la que se une físicamente ([comunicación personal](#)). Una vez allí Abl fosforila y activa la proteína de polaridad celular Dishevelled (Dsh) ([comunicación personal](#); [Singh et al., 2010](#)), que interviene en la reorganización del citoesqueleto a través de las GTPasas Rho y Rac ([Fanto et al., 2000](#)). En conjunto ambos trabajos contribuye a la construcción de un escenario en el que el papel de Appl en el proceso de guía de axones es cada vez más sólido y parece estar mediado por la quinasa Abl.

Nuestro trabajo aporta una nueva evidencia sobre el papel de Appl en la guía de axones y sugiere que en este proceso, Appl interacciona con la proteína de adhesión Nrt. Nrt es un miembro de la familia *Cholinesterase-like adhesion molecule* (CLAM) que forma uniones heterofílicas (Barthalay et al., 1990; de la Escalera et al., 1990) y que se distingue de las colinesterasas por la ausencia de algunos residuos de la región catalítica impidiendo la función enzimática pero que guarda gran homología con el dominio colinesterasa. La enzima acetilcolinesterasa (AChE), que comparte homología de dominio colinesterasas con Nrt (Scholl and Scheiffele, 2003), colocaliza de forma sorprendente con APP en cultivos de célula humanas. Además APP y AChE están involucradas en procesos de migración celular y cierre de herida, y se ha sugerido que ambas proteínas podrían interaccionar como parte del mismo complejo (Anderson et al., 2008), aunque la unión física no está resuelta. En *Drosophila* Nrt se expresa inicialmente en embriogénesis temprana durante la celularización y posteriormente se restringe al sistema nervioso central y periférico. Nrt también se expresa en los disco imaginales, y dentro del disco imaginal de ojo en los fotorreceptores (de la Escalera et al., 1990; Hortsch et al., 1990). Mutaciones tanto en su ligando Amalgam (Ama) (Fremion et al., 2000) como en la propia Nrt actúan modificando el fenotipo de la quinasa Abl en procesos de guía de axones, sugiriendo que la adhesión celular dirigida por la unión Ama-Nrt podría jugar un papel en la activación de la quinasa Abl durante la guía de axones (Liebl et al., 2003). En base a esta información, la interacción genética observada entre Appl y Nrt podría explicarse por la formación de un complejo o de complejos diferentes que finalmente convergen a través de Abl. Pero tampoco hay que olvidar que la interacción Appl-Nrt ya había sido propuesta en el desarrollo de los órganos mecano-sensoriales, y que en este contexto parece ser independiente de Abl (Merdes et al., 2004).

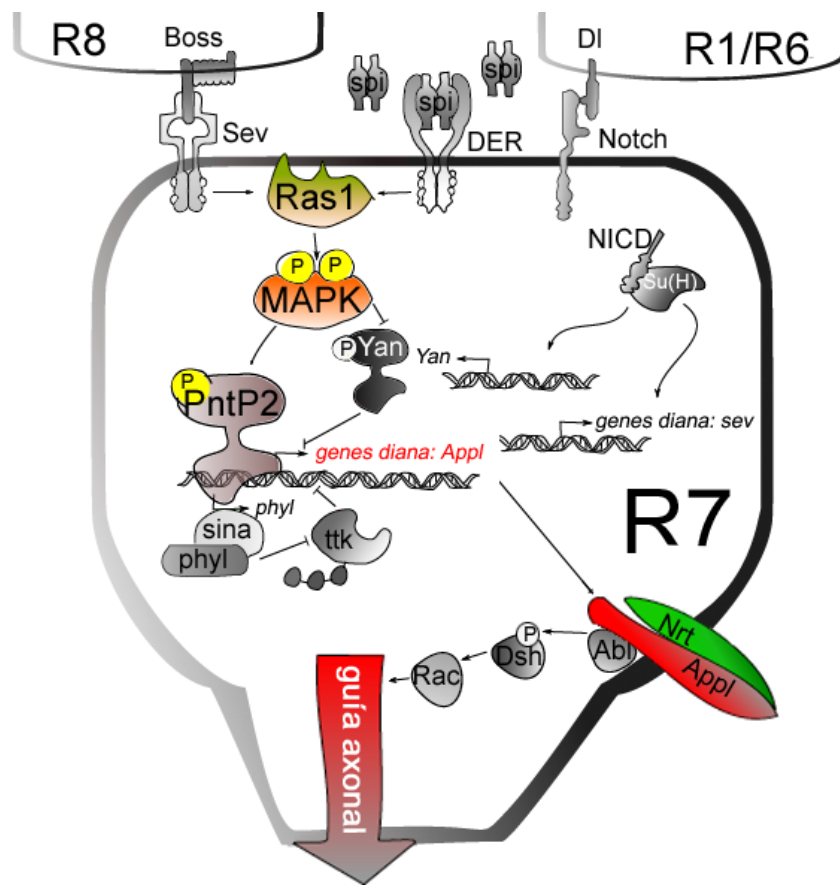
Por otro lado, en los experimentos con fondo heterocigoto *Nrt*<sup>1</sup>, el fenotipo de *App*<sup>d</sup> es más acusado tanto en los experimentos de elección espectral como en los de guía de axones, pero no son igual de penetrantes. La percepción de la luz ultravioleta y por ende la función del R7 parece estar más afectada que la guía de axones. Por ello no podemos descartar que ambas proteínas estén involucradas en otros procesos de la vida neural como el transporte axonal o la sinaptogénesis, funciones previamente descritas de Appl (Ashley et al., 2005; Gunawardena and Goldstein, 2001; Torroja et al., 1999a; Torroja et al., 1999b).

Finalmente, también es importante mencionar que nuestro trabajo se ha centrado en el estudio del desarrollo del fotorreceptor R7 y los fenotipos

que se muestran están relacionados con este fotorreceptor, sin embargo no podemos descartar que Appl esté involucrado en procesos similares en el resto de fotorreceptores, donde también se expresa, especialmente en el R8 donde la expresión de Appl, como en el R7, es mayor que en el resto de fotorreceptores y donde la organización axonal también se ve afectada en los fenotipos severos de las moscas *App<sup>d</sup>/Nrt<sup>1</sup>/+*.

## 5. Modelo integrador

Producto de las observaciones realizadas en esta Tesis se propone un modelo integrador que reúne los *inputs* de las distintas vías de señalización de R7 y que resulta en un *output* de expresión de *App1* (figura 44). Este modelo integra también los resultados referentes a la interacción de *App1* con *Nrt* y propone un nexo entre *App1* y la reorganización del citoesqueleto que tiene lugar durante la guía axonal.



**Figura 44. Modelo integrador.** La vía de Ras1 a través de PntP2 induce la expresión de *App1* en los fotorreceptores en desarrollo y especialmente en el R7 dado que la activación de la vía es mayor en este tipo celular. *App1* formaría un complejo proteico con *Nrt* en la membrana del R7 y promovería la activación de la quinasa *Abl* que a su vez activaría la proteína *Dsh* por fosforilación. *Dsh* fosforilado activaría la GTPasa *Rac* para regular la organización del citoesqueleto y por ende la guía axonal.



## 6. *Drosophila* como modelo de enfermedades neurodegenerativas: la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia relacionada con el envejecimiento. Es una enfermedad progresiva y mortal caracterizada por la pérdida de memoria y las funciones cognitivas. Uno de los rasgos principales de la enfermedad de Alzheimer es la formación de placas amiloides cuyo componente principal es el péptido  $A\beta$  procedente del procesamiento de APP. Aunque es todavía un debate abierto si la acumulación de placas son la causa de la enfermedad de Alzheimer o un simple marcador de la progresión de la enfermedad, la mayoría de los modelos sugieren que la acumulación de  $A\beta$  juega un papel central (Tanzi and Bertram, 2005). Ya que las muestras clínicas solo pueden analizarse post mórtem, el desarrollo de modelos animales que mimeticen la progresión de la enfermedad es esencial para distinguir entre factores causativos y consecutivos. Mientras que los modelos vertebrados pueden proporcionar una relación evolutiva más cercana, los modelos invertebrados todavía pueden proporcionar información útil acerca de la progresión de la enfermedad y la función de los genes implicados.

Durante la última década, *Drosophila* ha surgido como modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer. El corto tiempo de desarrollo unido a una esperanza de vida también corta, la hacen especialmente útil para estudios de trastornos relacionados con la edad. Además, aproximadamente el 70% de los genes causantes de enfermedades humanas están conservados en *Drosophila* (<http://superfly.ucsd.edu/homophila/>) incluyendo varios genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer como *APP* (*App1*), *presinilinas* (*psn*) y *tau* (*tau*) (Reiter et al., 2001). El desarrollo técnico y el avance en el conocimiento del modelo son armas también poderosas que permiten evaluar el efecto de mutaciones a nivel celular o de tejido, generar transgénicos, expresar genes de forma controlada en el espacio y en el tiempo y analizar comportamientos como la locomoción, el aprendizaje y la memoria.

A pesar de existir el homólogo en *Drosophila* de APP, algunos elementos críticos para el desarrollo de la enfermedad, como la secuencia  $A\beta$  no parecen estar conservados en *App1* (Coulson et al., 2000), por ello la mayoría de grupos que han modelado la enfermedad de Alzheimer en

*Drosophila* lo han hecho a través de la expresión de construcciones transgénicas de *APP* consiguiendo fenotipos similares a los de la enfermedad de Alzheimer tales como depósitos A $\beta$ , neurodegeneración relacionada con la edad, y una dramática reducción de la esperanza de vida. Estos fenotipos en *Drosophila* son de gran utilidad para entender el avance y el establecimiento de la enfermedad, pero también como base de screenings genéticos (van de Hoef et al., 2009) y farmacológicos (Micchelli et al., 2003).

Por otro lado, existe una corriente que propone que la pérdida de la función normal de *APP* podría ser parte de la patología de la enfermedad de Alzheimer, particularmente durante los primeros estadios de la enfermedad, caracterizada por pérdida de memoria (Neve et al., 2000). Por ello los trabajos que tienen como objetivo el estudio de la función endógena de *APP* o de sus homólogos, como *Appl* en *Drosophila*, podría aportar nuevos conocimientos con importantes implicaciones en nuestra comprensión de algunos aspectos de la enfermedad de Alzheimer. Sobre este campo, *Drosophila* ha demostrado tener un gran potencial con trabajos que describen la función de *Appl* en procesos como el transporte axonal, la formación de botones sinápticos o la memoria a largo plazo entre otros (Ashley et al., 2005; Goguel et al., 2011; Gunawardena and Goldstein, 2001; Torroja et al., 1999a; Torroja et al., 1999b). Además el trabajo realizado por Leyssen y colaboradores junto con el realizado en esta tesis y el casi simultaneo de Soldano y colaboradores comienzan a dibujar un papel cada vez más sólido de *Appl* en la guía de axones (Soldano et al., comunicación personal; Leyssen et al., 2005).

También la expresión de *APP*, cómo se ha explicado en varios momentos a lo largo de este manuscrito, parece estar implicada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el campo de la regulación transcripcional en la enfermedad de Alzheimer es el menos explorado en *Drosophila*. En este trabajo, aportamos las primeras evidencias de que *Appl* está regulado por la vía *Ras1 in vivo*.



## CONCLUSIONES



1. El transcriptoma de *sevenless* está enriquecido en las categorías funcionales: *vía de Notch*, *neurogénesis*, *transcripción*, *proteínas del desarrollo* y *diferenciación* que en conjunto explican el papel de *sevenless* en la determinación y la diferenciación del fotorreceptor R7
2. *Appl* es un gen diana de *sevenless* que contiene secuencias conservadas de unión a la familia de factores de transcripción ETS
3. *Appl* se expresa en todos los fotorreceptores pero su expresión es diferencial siendo mayor en los fotorreceptores R7 y R8 que en el resto de fotorreceptores. Esta expresión elevada en R7 correlaciona con los altos niveles de activación de la vía Ras1 característicos de este tipo celular.
4. La vía de Ras1 regula la expresión de *Appl* de forma directa a través de la unión de PntP2 al ETS1 y no como consecuencia de la presencia/ausencia de fotorreceptores. Dicha regulación está circunscrita al dominio del ojo, revelando la necesidad de un contexto específico
5. La expresión del gen *Appb* del vertebrado *Danio rerio*, ortólogo del gen *Appl* de *Drosophila* y de *APP* en humanos, se activa a través del receptor tirosina quinasa *fgfr1* sugiriendo que la activación de los genes de la familia *APP* vía RTK/Ras está conservada evolutivamente.
6. *Appl* tiene un papel relevante en el desarrollo del fotorreceptor R7 ya que la percepción de la luz ultravioleta, detectada específicamente por este fotorreceptor, está afectada en mutantes *Appl<sup>d</sup>*
7. *Appl* está involucrado en la guía axonal del fotorreceptor R7 en colaboración con la proteína de adhesión Neurotactina, con la que podría estar formando un complejo.



## BIBLIOGRAFÍA





- Almudi, I.** (2009). Socs 36E como regulador negativo de la vía de Sevenless en la determinación del fotorreceptor R7. In *Genetica*, (ed. Barcelona: Universitat de Barcelona).
- Anderson, A. A., Ushakov, D. S., Ferenczi, M. A., Mori, R., Martin, P. and Saffell, J. L.** (2008). Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes. *J Cell Physiol* **215**, 82-100.
- Araki, W., Kitaguchi, N., Tokushima, Y., Ishii, K., Aratake, H., Shimohama, S., Nakamura, S. and Kimura, J.** (1991). Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 265-71.
- Ashley, J., Packard, M., Ataman, B. and Budnik, V.** (2005). Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J Neurosci* **25**, 5943-55.
- Baker, N. E., Yu, S. and Han, D.** (1996). Evolution of proneural atonal expression during distinct regulatory phases in the developing *Drosophila* eye. *Curr Biol* **6**, 1290-301.
- Banerjee, U., Renfranz, P. J., Hinton, D. R., Rabin, B. A. and Benzer, S.** (1987a). The sevenless+ protein is expressed apically in cell membranes of developing *Drosophila* retina; it is not restricted to cell R7. *Cell* **51**, 151-8.
- Banerjee, U., Renfranz, P. J., Pollock, J. A. and Benzer, S.** (1987b). Molecular characterization and expression of sevenless, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye. *Cell* **49**, 281-91.
- Barthalay, Y., Hipeau-Jacquotte, R., de la Escalera, S., Jimenez, F. and Piovant, M.** (1990). *Drosophila* neurotactin mediates heterophilic cell adhesion. *EMBO J* **9**, 3603-9.
- Bashaw, G. J. and Goodman, C. S.** (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* **97**, 917-26.
- Basler, K., Christen, B. and Hafen, E.** (1991). Ligand-independent activation of the sevenless receptor tyrosine kinase changes the fate of cells in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **64**, 1069-81.
- Basler, K. and Hafen, E.** (1988). Sevenless and *Drosophila* eye development: a tyrosine kinase controls cell fate. *Trends Genet* **4**, 74-9.
- Basler, K., Yen, D., Tomlinson, A. and Hafen, E.** (1990). Reprogramming cell fate in the developing *Drosophila* retina: transformation of R7 cells by ectopic expression of rough. *Genes Dev* **4**, 728-39.
- Begemann, G., Michon, A. M., vd Voorn, L., Wepf, R. and Mlodzik, M.** (1995). The *Drosophila* orphan nuclear receptor seven-up requires the Ras pathway for its function in photoreceptor determination. *Development* **121**, 225-35.
- Bilen, J. and Bonini, N. M.** (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* **39**, 153-71.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-7.
- Blanco, E., Messeguer, X., Smith, T. F. and Guigo, R.** (2006). Transcription factor map alignment of promoter regions. *PLoS Comput Biol* **2**, e49.
- Bohmann, D., Ellis, M. C., Staszewski, L. M. and Mlodzik, M.** (1994). *Drosophila* Jun mediates Ras-dependent photoreceptor determination. *Cell* **78**, 973-86.

- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klambt, C.** (1994). The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* **370**, 386-9.
- Butler, J. E. and Kadonaga, J. T.** (2001). Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev* **15**, 2515-9.
- Cafferty, P., Yu, L. and Rao, Y.** (2004). The receptor tyrosine kinase Off-track is required for layer-specific neuronal connectivity in *Drosophila*. *Development* **131**, 5287-95.
- Cagan, R. L., Kramer, H., Hart, A. C. and Zipursky, S. L.** (1992). The bride of sevenless and sevenless interaction: internalization of a transmembrane ligand. *Cell* **69**, 393-9.
- Calhoun, M. E., Burgermeister, P., Phinney, A. L., Stalder, M., Tolnay, M., Wiederhold, K. H., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Sommer, B., Staufenbiel, M. et al.** (1999). Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14088-93.
- Carmine-Simmen, K., Proctor, T., Tschape, J., Poeck, B., Triphan, T., Strauss, R. and Kretzschmar, D.** (2009). Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* **33**, 274-81.
- Carthew, R. W. and Rubin, G. M.** (1990). seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* **63**, 561-77.
- Ciapponi, L., Jackson, D. B., Mlodzik, M. and Bohmann, D.** (2001). *Drosophila* Fos mediates ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites. *Genes Dev* **15**, 1540-53.
- Clark, A. G., Eisen, M. B., Smith, D. R., Bergman, C. M., Oliver, B., Markow, T. A., Kaufman, T. C., Kellis, M., Gelbart, W. Iyer, V. N. et al.** (2007). Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* **450**, 203-18.
- Cooper, M. T. and Bray, S. J.** (2000). R7 photoreceptor specification requires Notch activity. *Curr Biol* **10**, 1507-10.
- Cosgaya, J. M., Latasa, M. J. and Pascual, A.** (1996). Nerve growth factor and ras regulate beta-amyloid precursor protein gene expression in PC12 cells. *J Neurochem* **67**, 98-104.
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K. and Masters, C. L.** (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* **36**, 175-84.
- Curtiss, J. and Mlodzik, M.** (2000). Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* **127**, 1325-36.
- Chanet, S., Vodovar, N., Mayau, V. and Schweisguth, F.** (2009). Genome engineering-based analysis of Bearded family genes reveals both functional redundancy and a nonessential function in lateral inhibition in *Drosophila*. *Genetics* **182**, 1101-8.
- Chang, H. C., Solomon, N. M., Wassarman, D. A., Karim, F. D., Therrien, M., Rubin, G. M. and Wolff, T.** (1995). phyllopod functions in the fate determination of a subset of photoreceptors in *Drosophila*. *Cell* **80**, 463-72.
- Choe, K. M. and Clandinin, T. R.** (2005). Thinking about visual behavior; learning about photoreceptor function. *Curr Top Dev Biol* **69**, 187-213.
- Chou, W. H., Hall, K. J., Wilson, D. B., Wideman, C. L., Townson, S. M., Chadwell, L. V. and Britt, S. G.** (1996). Identification of a novel *Drosophila*

opsin reveals specific patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells. *Neuron* **17**, 1101-15.

**Chou, W. H., Huber, A., Bentrop, J., Schulz, S., Schwab, K., Chadwell, L. V., Paulsen, R. and Britt, S. G.** (1999). Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila*: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development* **126**, 607-16.

**Daigle, I. and Li, C.** (1993). *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 12045-9.

**de la Escalera, S., Bockamp, E. O., Moya, F., Piovant, M. and Jimenez, F.** (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases. *EMBO J* **9**, 3593-601.

**De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J. et al.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-22.

**Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D. and Hafen, E.** (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* **360**, 600-3.

**Dickson, B. J., Dominguez, M., van der Straten, A. and Hafen, E.** (1995). Control of *Drosophila* photoreceptor cell fates by phyllopod, a novel nuclear protein acting downstream of the Raf kinase. *Cell* **80**, 453-62.

**Dominguez, M. and Hafen, E.** (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* **11**, 3254-64.

**Dominguez, M., Wasserman, J. D. and Freeman, M.** (1998). Multiple functions of the EGF receptor in *Drosophila* eye development. *Curr Biol* **8**, 1039-48.

**Doroquez, D. B. and Rebay, I.** (2006). Signal integration during development: mechanisms of EGFR and Notch pathway function and cross-talk. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 339-85.

**Dou, S., Zeng, X., Cortes, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Honjo, T. and Vales, L. D.** (1994). The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **14**, 3310-9.

**Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A. E.** (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* **30**, 207-10.

**Egger, B., Boone, J. Q., Stevens, N. R., Brand, A. H. and Doe, C. Q.** (2007). Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Dev* **2**, 1.

**Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. and Comella, J. X.** (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* **75**, 991-1003.

**Engstrom, P. G., Fredman, D. and Lenhard, B.** (2008). Ancora: a web resource for exploring highly conserved noncoding elements and their association with developmental regulatory genes. *Genome Biol* **9**, R34.

**Eswarakumar, V. P., Lax, I. and Schlessinger, J.** (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 139-49.

- Fanto, M., Weber, U., Strutt, D. I. and Mlodzik, M.** (2000). Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Curr Biol* **10**, 979-88.
- Fazeli, M. S., Breen, K., Errington, M. L. and Bliss, T. V.** (1994). Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci Lett* **169**, 77-80.
- Feiler, R., Harris, W. A., Kirschfeld, K., Wehrhahn, C. and Zuker, C. S.** (1988). Targeted misexpression of a *Drosophila* opsin gene leads to altered visual function. *Nature* **333**, 737-41.
- Fischbach, K. F.** (1979). Simultaneous and successive colour contrast expressed in "slow" phototactic behaviour of walking *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A Volume* **130**, 10.
- Fischbach, K. F. and Dittrich, A. P. M.** (1989). The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wild-type structure. *Cell Tissue Res*, 34.
- Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A. and Papas, T. S.** (1991). High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene* **6**, 2249-54.
- Forloni, G., Del Bo, R., Angeretti, N., Smiroldo, S., Gabellini, N. and Vantini, G.** (1993). Nerve growth factor does not influence the expression of beta amyloid precursor protein mRNA in rat brain: in vivo and in vitro studies. *Brain Res* **620**, 292-6.
- Fortini, M. E., Simon, M. A. and Rubin, G. M.** (1992). Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. *Nature* **355**, 559-61.
- Freeman, M.** (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **87**, 651-60.
- Freeman, M.** (1997). Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* **124**, 261-70.
- Fremion, F., Darboux, I., Diano, M., Hipeau-Jacquotte, R., Seeger, M. A. and Piovant, M.** (2000). Amalgam is a ligand for the transmembrane receptor neurotactin and is required for neurotactin-mediated cell adhesion and axon fasciculation in *Drosophila*. *EMBO J* **19**, 4463-72.
- Fryxell, K. J. and Meyerowitz, E. M.** (1987). An opsin gene that is expressed only in the R7 photoreceptor cell of *Drosophila*. *EMBO J* **6**, 443-51.
- Fukuta, M., Matsuno, K., Hui, C. C., Nagata, T., Takiya, S., Xu, P. X., Ueno, K. and Suzuki, Y.** (1993). Molecular cloning of a POU domain-containing factor involved in the regulation of the *Bombyx* sericin-1 gene. *J Biol Chem* **268**, 19471-5.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B. Z. and Klambt, C.** (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* **122**, 3355-62.
- Gates, M. A., Kannan, R. and Giniger, E.** (2011). A genome-wide analysis reveals that the *Drosophila* transcription factor Lola promotes axon growth in part by suppressing expression of the actin nucleation factor Spire. *Neural Dev* **6**, 37.
- Gerresheim, F.** (1981). Isolation and characterization of mutants with altered phototactic reaction to monochromatic light in *Drosophila melanogaster*, vol. Ph.D (ed. Munich, Germany: Munich University).

- Gerresheim, F.** (1988). Isolation of *Drosophila melanogaster* mutants with a wavelength-specific alteration in their phototactic response. *Behav Genet* **18**, 227-46.
- Giniger, E., Tietje, K., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994). *lola* encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in *Drosophila*. *Development* **120**, 1385-98.
- Goeke, S., Greene, E. A., Grant, P. K., Gates, M. A., Crowner, D., Aigaki, T. and Giniger, E.** (2003). Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **6**, 917-24.
- Goguel, V., Belair, A. L., Ayaz, D., Lampin-Saint-Amaux, A., Scaplehorn, N., Hassan, B. A. and Preat, T.** (2011). *Drosophila* amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *J Neurosci* **31**, 1032-7.
- Golembo, M., Schweitzer, R., Freeman, M. and Shilo, B. Z.** (1996). Argos transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* **122**, 223-30.
- Gong, Q., Rangarajan, R., Seeger, M. and Gaul, U.** (1999). The netrin receptor frazzled is required in the target for establishment of retinal projections in the *Drosophila* visual system. *Development* **126**, 1451-6.
- Goodman, Y. and Mattson, M. P.** (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* **128**, 1-12.
- Greene, L. A.** (1978). Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J Cell Biol* **78**, 747-55.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. and Calos, M. P.** (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* **166**, 1775-82.
- Gunawardena, S. and Goldstein, L. S.** (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* **32**, 389-401.
- Hadjieconomou, D., Timofeev, K. and Salecker, I.** (2011). A step-by-step guide to visual circuit assembly in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 76-84.
- Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J. E. and Rubin, G. M.** (1987). *Sevenless*, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science* **236**, 55-63.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A.** (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-5.
- Harris, W. A., Stark, W. S. and Walker, J. A.** (1976). Genetic dissection of the photoreceptor system in the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* **256**, 415-39.
- Hart, A. C., Kramer, H., Van Vactor, D. L., Jr., Paidhungat, M. and Zipursky, S. L.** (1990). Induction of cell fate in the *Drosophila* retina: the bride of *sevenless* protein is predicted to contain a large extracellular domain and seven transmembrane segments. *Genes Dev* **4**, 1835-47.
- Hayashi, T., Kojima, T. and Saigo, K.** (1998). Specification of primary pigment cell and outer photoreceptor fates by *BarH1* homeobox gene in the developing *Drosophila* eye. *Dev Biol* **200**, 131-45.



- Heberlein, U., Mlodzik, M. and Rubin, G. M.** (1991). Cell-fate determination in the developing *Drosophila* eye: role of the rough gene. *Development* **112**, 703-12.
- Heisenberg, M. and Buchner, E.** (1977). The role of retinal cell types in visual behavior of *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology* **177**, 35.
- Higashijima, S., Kojima, T., Michiue, T., Ishimaru, S., Emori, Y. and Saigo, K.** (1992). Dual Bar homeo box genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. *Genes Dev* **6**, 50-60.
- Hiroimi, Y., Mlodzik, M., West, S. R., Rubin, G. M. and Goodman, C. S.** (1993). Ectopic expression of seven-up causes cell fate changes during ommatidial assembly. *Development* **118**, 1123-35.
- Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., Plasterk, R. et al.** (2007). APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1971-6.
- Hortsch, M., Patel, N. H., Bieber, A. J., Traquina, Z. R. and Goodman, C. S.** (1990). *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* **110**, 1327-40.
- Hou, X. S., Chou, T. B., Melnick, M. B. and Perrimon, N.** (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* **81**, 63-71.
- Hsieh, J. J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M. G. and Hayward, S. D.** (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* **16**, 952-9.
- Hsiung, F. and Moses, K.** (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum Mol Genet* **11**, 1207-14.
- Huber, A., Schulz, S., Bentrop, J., Groell, C., Wolfrum, U. and Paulsen, R.** (1997). Molecular cloning of *Drosophila* Rh6 rhodopsin: the visual pigment of a subset of R8 photoreceptor cells. *FEBS Lett* **406**, 6-10.
- Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M. and Uemura, T.** (1997). Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the *Drosophila* embryonic CNS. *Neuron* **19**, 77-89.
- Jacobsen, K. T. and Iverfeldt, K.** (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2299-318.
- Jarman, A. P., Grell, E. H., Ackerman, L., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994). Atonal is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**, 398-400.
- Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1995). Role of the proneural gene, atonal, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* **121**, 2019-30.
- Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (1994). The Notch signalling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 3537-48.
- Jiao, X., Sherman, B. T., Huang, D. W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A.** (2012). DAVID-WS: A Stateful Web Service to Facilitate Gene/Protein List Analysis. *Bioinformatics*.

- Jimenez, F., Martin-Morris, L. E., Velasco, L., Chu, H., Sierra, J., Rosen, D. R. and White, K.** (1995). vnd, a gene required for early neurogenesis of *Drosophila*, encodes a homeodomain protein. *EMBO J* **14**, 3487-95.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B.** (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6.
- Kaplan, D. R., Matsumoto, K., Lucarelli, E. and Thiele, C. J.** (1993). Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. *Neuron* **11**, 321-31.
- Kaufman, P. D. and Rio, D. C.** (1992). P element transposition in vitro proceeds by a cut-and-paste mechanism and uses GTP as a cofactor. *Cell* **69**, 27-39.
- Kimmel, B. E., Heberlein, U. and Rubin, G. M.** (1990). The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing *Drosophila* eye where it can specify photoreceptor cell subtype. *Genes Dev* **4**, 712-27.
- Kinoshita, A., Whelan, C. M., Berezovska, O. and Hyman, B. T.** (2002). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem* **277**, 28530-6.
- Kitadate, Y., Shigenobu, S., Arita, K. and Kobayashi, S.** (2007). Boss/Sev signaling from germline to soma restricts germline-stem-cell-niche formation in the anterior region of *Drosophila* male gonads. *Dev Cell* **13**, 151-9.
- Klambt, C.** (1993). The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**, 163-76.
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87**, 197-204.
- Koo, E. H., Sisodia, S. S., Cork, L. C., Unterbeck, A., Bayney, R. M. and Price, D. L.** (1990). Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates. *Neuron* **4**, 97-104.
- Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. and Schlessinger, J.** (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**, 693-702.
- Kuhn, R. M., Karolchik, D., Zweig, A. S., Trumbower, H., Thomas, D. J., Thakapallayil, A., Sugnet, C. W., Stanke, M., Smith, K. E., Siepel, A. et al.** (2007). The UCSC genome browser database: update 2007. *Nucleic Acids Res* **35**, D668-73.
- Kumar, J. P., Tio, M., Hsiung, F., Akopyan, S., Gabay, L., Seger, R., Shilo, B. Z. and Moses, K.** (1998). Dissecting the roles of the *Drosophila* EGF receptor in eye development and MAP kinase activation. *Development* **125**, 3875-85.
- Lahiri, D. K. and Nall, C.** (1995). Promoter activity of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1. *Brain Res Mol Brain Res* **32**, 233-40.



- Lai, E. C., Bodner, R., Kavalier, J., Freschi, G. and Posakony, J. W.** (2000). Antagonism of notch signaling activity by members of a novel protein family encoded by the bearded and enhancer of split gene complexes. *Development* **127**, 291-306.
- Lanier, L. M. and Gertler, F. B.** (2000). From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 80-7.
- Lee, J. A. and Cole, G. J.** (2007). Generation of transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under control of zebrafish amyloid precursor protein gene regulatory elements. *Zebrafish* **4**, 277-86.
- Leppa, S. and Bohmann, D.** (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* **18**, 6158-62.
- Leysen, M., Ayaz, D., Hebert, S. S., Reeve, S., De Strooper, B. and Hassan, B. A.** (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the Drosophila brain. *EMBO J* **24**, 2944-55.
- Li, S., Li, Y., Carthew, R. W. and Lai, Z. C.** (1997). Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* **90**, 469-78.
- Li, S., Xu, C. and Carthew, R. W.** (2002). Phyllopod acts as an adaptor protein to link the ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack. *Mol Cell Biol* **22**, 6854-65.
- Li, Y., Liu, T., Peng, Y., Yuan, C. and Guo, A.** (2004). Specific functions of Drosophila amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and nonneural tissues. *J Neurobiol* **61**, 343-58.
- Liebl, E. C., Rowe, R. G., Forsthoefel, D. J., Stammer, A. L., Schmidt, E. R., Turski, M. and Seeger, M. A.** (2003). Interactions between the secreted protein Amalgam, its transmembrane receptor Neurotactin and the Abelson tyrosine kinase affect axon pathfinding. *Development* **130**, 3217-26.
- Luo, L., Tully, T. and White, K.** (1992). Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene. *Neuron* **9**, 595-605.
- Luo, L. Q., Martin-Morris, L. E. and White, K.** (1990). Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* **10**, 3849-61.
- Madden, K., Crowner, D. and Giniger, E.** (1999). LOLA has the properties of a master regulator of axon-target interaction for SNb motor axons of Drosophila. *Dev Biol* **213**, 301-13.
- Maeso, I., Irimia, M., Tena, J. J., Gonzalez-Perez, E., Tran, D., Ravi, V., Venkatesh, B., Campuzano, S., Gomez-Skarmeta, J. L. and Garcia-Fernandez, J.** (2012). An ancient genomic regulatory block conserved across bilaterians and its dismantling in tetrapods by retrogene replacement. *Genome Res* **22**, 642-55.
- Marques, S. R., Lee, Y., Poss, K. D. and Yelon, D.** (2008). Reiterative roles for FGF signaling in the establishment of size and proportion of the zebrafish heart. *Dev Biol* **321**, 397-406.
- Martin-Morris, L. E. and White, K.** (1990). The Drosophila transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* **110**, 185-95.
- Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., Hirai, S., Ohno, S., Kita, Y., Kawasumi, M. et al.** (2001). c-Jun N-terminal

kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *J Neurosci* **21**, 6597-607.

**Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gossling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A. E., Kel-Margoulis, O. V. et al.** (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res* **31**, 374-8.

**Mellerick, D. M. and Nirenberg, M.** (1995). Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of Drosophila embryos. *Dev Biol* **171**, 306-16.

**Merdes, G., Soba, P., Loewer, A., Bilic, M. V., Beyreuther, K. and Paro, R.** (2004). Interference of human and Drosophila APP and APP-like proteins with PNS development in Drosophila. *EMBO J* **23**, 4082-95.

**Merli, C., Bergstrom, D. E., Cygan, J. A. and Blackman, R. K.** (1996). Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes. *Genes Dev* **10**, 1260-70.

**Micchelli, C. A., Esler, W. P., Kimberly, W. T., Jack, C., Berezovska, O., Kornilova, A., Hyman, B. T., Perrimon, N. and Wolfe, M. S.** (2003). Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in Drosophila. *FASEB J* **17**, 79-81.

**Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S. and Rubin, G. M.** (1990). The Drosophila seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* **60**, 211-24.

**Mobley, W. C., Neve, R. L., Prusiner, S. B. and McKinley, M. P.** (1988). Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9811-5.

**Montell, C., Jones, K., Zuker, C. and Rubin, G.** (1987). A second opsin gene expressed in the ultraviolet-sensitive R7 photoreceptor cells of Drosophila melanogaster. *J Neurosci* **7**, 1558-66.

**Morante, J. and Desplan, C.** (2004). Building a projection map for photoreceptor neurons in the Drosophila optic lobes. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 137-43.

**Musa, A., Lehrach, H. and Russo, V. A.** (2001). Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Dev Genes Evol* **211**, 563-7.

**Nakayama, K., Ohkawara, T., Hiratochi, M., Koh, C. S. and Nagase, H.** (2008). The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis. *Neurosci Lett* **444**, 127-31.

**Narindrasorasak, S., Lowery, D. E., Altman, R. A., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Greenberg, B. D. and Kisilevsky, R.** (1992). Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab Invest* **67**, 643-52.

**Negre, N., Brown, C. D., Ma, L., Bristow, C. A., Miller, S. W., Wagner, U., Kheradpour, P., Eaton, M. L., Loriaux, P., Sealfon, R. et al.** (2011). A cis-regulatory map of the Drosophila genome. *Nature* **471**, 527-31.

**Nelson, C. E., Hersh, B. M. and Carroll, S. B.** (2004). The regulatory content of intergenic DNA shapes genome architecture. *Genome Biol* **5**, R25.

**Neve, R. L., McPhie, D. L. and Chen, Y.** (2000). Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res* **886**, 54-66.

**Neve, R. L., Valletta, J. S., Li, Y., Ventosa-Michelman, M., Holtzman, D. M. and Mobley, W. C.** (1996). A comprehensive study of the spatiotemporal

pattern of beta-amyloid precursor protein mRNA and protein in the rat brain: lack of modulation by exogenously applied nerve growth factor. *Brain Res Mol Brain Res* **39**, 185-97.

**Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J.** (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**, 349-62.

**Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D. and Graves, B. J.** (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* **6**, 975-90.

**O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M.** (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* **78**, 137-47.

**O'Tousa, J. E., Baehr, W., Martin, R. L., Hirsh, J., Pak, W. L. and Applebury, M. L.** (1985). The *Drosophila* ninaE gene encodes an opsin. *Cell* **40**, 839-50.

**Ohlsson, R., Bartkuhn, M. and Renkawitz, R.** (2010). CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma* **119**, 351-60.

**Ohyagi, Y. and Tabira, T.** (1993). Effect of growth factors and cytokines on expression of amyloid beta protein precursor mRNAs in cultured neural cells. *Brain Res Mol Brain Res* **18**, 127-32.

**Oikawa, T. and Yamada, T.** (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* **303**, 11-34.

**Palmert, M. R., Golde, T. E., Cohen, M. L., Kovacs, D. M., Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Usiak, M. F., Younkin, L. H. and Younkin, S. G.** (1988). Amyloid protein precursor messenger RNAs: differential expression in Alzheimer's disease. *Science* **241**, 1080-4.

**Papatsenko, D., Sheng, G. and Desplan, C.** (1997). A new rhodopsin in R8 photoreceptors of *Drosophila*: evidence for coordinate expression with Rh3 in R7 cells. *Development* **124**, 1665-73.

**Pepple, K. L., Atkins, M., Venken, K., Wellnitz, K., Harding, M., Frankfort, B. and Mardon, G.** (2008). Two-step selection of a single R8 photoreceptor: a bistable loop between senseless and rough locks in R8 fate. *Development* **135**, 4071-9.

**Perez, S. E. and Steller, H.** (1996). Migration of glial cells into retinal axon target field in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* **30**, 359-73.

**Peverali, F. A., Isaksson, A., Papavassiliou, A. G., Plastina, P., Staszewski, L. M., Mlodzik, M. and Bohmann, D.** (1996). Phosphorylation of *Drosophila* Jun by the MAP kinase rolled regulates photoreceptor differentiation. *EMBO J* **15**, 3943-50.

**Pignoni, F. and Zipursky, S. L.** (1997). Induction of *Drosophila* eye development by decapentaplegic. *Development* **124**, 271-8.

**Poeck, B., Fischer, S., Gunning, D., Zipursky, S. L. and Salecker, I.** (2001). Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of *Drosophila*. *Neuron* **29**, 99-113.

**Portales-Casamar, E., Thongjuea, S., Kwon, A. T., Arenillas, D., Zhao, X., Valen, E., Yusuf, D., Lenhard, B., Wasserman, W. W. and Sandelin, A.** (2010). JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* **38**, D105-10.

- Pulido, D., Campuzano, S., Koda, T., Modolell, J. and Barbacid, M.** (1992). Dtrk, a Drosophila gene related to the trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cell adhesion molecule. *EMBO J* **11**, 391-404.
- Querfurth, H. W. and LaFerla, F. M.** (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329-44.
- Querfurth, H. W., Wijsman, E. M., St George-Hyslop, P. H. and Selkoe, D. J.** (1995). Beta APP mRNA transcription is increased in cultured fibroblasts from the familial Alzheimer's disease-1 family. *Brain Res Mol Brain Res* **28**, 319-37.
- Raabe, T.** (2000). The sevenless signaling pathway: variations of a common theme. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 151-63.
- Reinke, R. and Zipursky, S. L.** (1988). Cell-cell interaction in the Drosophila retina: the bride of sevenless gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell* **55**, 321-30.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E.** (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res* **11**, 1114-25.
- Rister, J., Pauls, D., Schnell, B., Ting, C. Y., Lee, C. H., Sinakevitch, I., Morante, J., Strausfeld, N. J., Ito, K. and Heisenberg, M.** (2007). Dissection of the peripheral motion channel in the visual system of Drosophila melanogaster. *Neuron* **56**, 155-70.
- Robinow, S. and White, K.** (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during Drosophila melanogaster development. *J Neurobiol* **22**, 443-61.
- Rohrbaugh, M., Ramos, E., Nguyen, D., Price, M., Wen, Y. and Lai, Z. C.** (2002). Notch activation of yan expression is antagonized by RTK/pointed signaling in the Drosophila eye. *Curr Biol* **12**, 576-81.
- Rose, D. and Chiba, A.** (1999). A single growth cone is capable of integrating simultaneously presented and functionally distinct molecular cues during target recognition. *J Neurosci* **19**, 4899-906.
- Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q. and White, K.** (1989). A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2478-82.
- Ruan, W., Long, H., Vuong, D. H. and Rao, Y.** (2002). Bifocal is a downstream target of the Ste20-like serine/threonine kinase misshapen in regulating photoreceptor growth cone targeting in Drosophila. *Neuron* **36**, 831-42.
- Ruiz-Leon, Y. and Pascual, A.** (2001). Brain-derived neurotrophic factor stimulates beta-amyloid gene promoter activity by a Ras-dependent/AP-1-independent mechanism in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* **79**, 278-85.
- Ruiz-Leon, Y. and Pascual, A.** (2003). Induction of tyrosine kinase receptor b by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience* **120**, 1019-26.
- Ruiz-Leon, Y. and Pascual, A.** (2004). Regulation of beta-amyloid precursor protein expression by brain-derived neurotrophic factor involves activation of both the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathways. *J Neurochem* **88**, 1010-8.
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K. and Masters, C. L.** (1989).

Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **320**, 1446-52.

**Sambrook, J. and Russell, D.** (1989 ). Molecular cloning: A laboratory manual.

**Scholz, H., Deatrick, J., Klaes, A. and Klambt, C.** (1993). Genetic dissection of pointed, a Drosophila gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics* **135**, 455-68.

**Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A. and Klambt, C.** (1997). Control of midline glia development in the embryonic Drosophila CNS. *Mech Dev* **64**, 137-51.

**Scholl, F. G. and Scheiffele, P.** (2003). Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. *Trends Neurosci* **26**, 618-24.

**Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T. and Cole, G.** (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* **3**, 689-94.

**Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D. and Goodman, C. S.** (1993). Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**, 409-26.

**Shilo, B. Z.** (2003). Signaling by the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* **284**, 140-9.

**Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Laverty, T. R. and Rubin, G. M.** (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-16.

**Singh, J., Yanfeng, W. A., Grumolato, L., Aaronson, S. A. and Mlodzik, M.** (2010). Abelson family kinases regulate Frizzled planar cell polarity signaling via Dsh phosphorylation. *Genes Dev* **24**, 2157-68.

**Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C., Wilson, C., Davis, R. J. and Ip, Y. T.** (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila. *Genes Dev* **10**, 2745-58.

**Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K. and Masters, C. L.** (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* **14**, 2117-27.

**Snow, P. M., Bieber, A. J. and Goodman, C. S.** (1989). Fasciclin III: a novel homophilic adhesion molecule in Drosophila. *Cell* **59**, 313-23.

**Speicher, S., Garcia-Alonso, L., Carmena, A., Martin-Bermudo, M. D., de la Escalera, S. and Jimenez, F.** (1998). Neurotactin functions in concert with other identified CAMs in growth cone guidance in Drosophila. *Neuron* **20**, 221-33.

**Spencer, S. A., Powell, P. A., Miller, D. T. and Cagan, R. L.** (1998). Regulation of EGF receptor signaling establishes pattern across the developing Drosophila retina. *Development* **125**, 4777-90.

**Spletter, M. L., Liu, J., Su, H., Giniger, E., Komiyama, T., Quake, S. and Luo, L.** (2007). Lola regulates Drosophila olfactory projection neuron identity and targeting specificity. *Neural Dev* **2**, 14.

**Stepchenko, A. G., Pankratova, E. V., Doronin, S. A., Gulag, P. V. and Georgieva, S. G.** (2011). The alternative protein isoform NK2B, encoded by the vnd/NK-2 proneural gene, directly activates transcription and is expressed following the start of cells differentiation. *Nucleic Acids Res* **39**, 5401-11.



- Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2000). Ectopic scute induces *Drosophila* ommatidia development without R8 founder photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6815-9.
- Swanson, C. I., Evans, N. C. and Barolo, S.** (2010). Structural rules and complex regulatory circuitry constrain expression of a Notch- and EGFR-regulated eye enhancer. *Dev Cell* **18**, 359-70.
- Tanzi, R. E. and Bertram, L.** (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-55.
- Taru, H., Iijima, K., Hase, M., Kirino, Y., Yagi, Y. and Suzuki, T.** (2002). Interaction of Alzheimer's beta -amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade. *J Biol Chem* **277**, 20070-8.
- Ting, C. Y. and Lee, C. H.** (2007). Visual circuit development in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 65-72.
- Ting, C. Y., Yonekura, S., Chung, P., Hsu, S. N., Robertson, H. M., Chiba, A. and Lee, C. H.** (2005). *Drosophila* N-cadherin functions in the first stage of the two-stage layer-selection process of R7 photoreceptor afferents. *Development* **132**, 953-63.
- Tio, M., Ma, C. and Moses, K.** (1994). *spitz*, a *Drosophila* homolog of transforming growth factor- $\alpha$ , is required in the founding photoreceptor cells of the compound eye facets. *Mech Dev* **48**, 13-23.
- Tio, M. and Moses, K.** (1997). The *Drosophila* TGF  $\alpha$  homolog *Spitz* acts in photoreceptor recruitment in the developing retina. *Development* **124**, 343-51.
- Tomlinson, A., Bowtell, D. D., Hafen, E. and Rubin, G. M.** (1987). Localization of the sevenless protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* **51**, 143-50.
- Tomlinson, A., Kimmel, B. E. and Rubin, G. M.** (1988). *rough*, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R2 and R5 for inductive interactions in the developing eye. *Cell* **55**, 771-84.
- Tomlinson, A., Mavromatakis, Y. E. and Struhl, G.** (2011). Three distinct roles for notch in *Drosophila* R7 photoreceptor specification. *PLoS Biol* **9**, e1001132.
- Tomlinson, A. and Ready, D. F.** (1986). Sevenless: a cell-specific homeotic mutation of the *Drosophila* eye. *Science* **231**, 400-2.
- Tomlinson, A. and Ready, D. F.** (1987). Cell fate in the *Drosophila* ommatidium. *Dev Biol* **123**, 264-75.
- Tomlinson, A. and Struhl, G.** (2001). Delta/Notch and Boss/Sevenless signals act combinatorially to specify the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Mol Cell* **7**, 487-95.
- Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I. and White, K.** (1999a). Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* **9**, 489-92.
- Torroja, L., Luo, L. and White, K.** (1996). APPL, the *Drosophila* member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons. *J Neurosci* **16**, 4638-50.
- Torroja, L., Packard, M., Gorczyca, M., White, K. and Budnik, V.** (1999b). The *Drosophila* beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* **19**, 7793-803.
- Treier, M., Bohmann, D. and Mlodzik, M.** (1995). JUN cooperates with the ETS domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the *Drosophila* eye. *Cell* **83**, 753-60.

- Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B. and Herz, J.** (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **273**, 33556-60.
- Tsruya, R., Schlesinger, A., Reich, A., Gabay, L., Sapir, A. and Shilo, B. Z.** (2002). Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the Drosophila EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev* **16**, 222-34.
- Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M.** (2001). Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**, 173-82.
- van de Hoef, D. L., Hughes, J., Livne-Bar, I., Garza, D., Konsolaki, M. and Boulianne, G. L.** (2009). Identifying genes that interact with Drosophila presenilin and amyloid precursor protein. *Genesis* **47**, 246-60.
- Villa, A., Latasa, M. J. and Pascual, A.** (2001). Nerve growth factor modulates the expression and secretion of beta-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells. *J Neurochem* **77**, 1077-84.
- Visel, A., Bristow, J. and Pennacchio, L. A.** (2007). Enhancer identification through comparative genomics. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 140-52.
- Voas, M. G. and Rebay, I.** (2003). The novel plant homeodomain protein rhinoceros antagonizes Ras signaling in the Drosophila eye. *Genetics* **165**, 1993-2006.
- Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A. and Manet, E.** (1995). RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res* **23**, 4939-45.
- Wasco, W., Peppercorn, J. and Tanzi, R. E.** (1993). Search for the genes responsible for familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 203-8.
- Wassarman, D. A., Therrien, M. and Rubin, G. M.** (1995). The Ras signaling pathway in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 44-50.
- Wentzell, J. S., Bolkan, B. J., Carmine-Simmen, K., Swanson, T. L., Musashe, D. T. and Kretzschmar, D.** (2012). Amyloid precursor proteins are protective in Drosophila models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **46**, 78-87.
- Wernet, M. F., Labhart, T., Baumann, F., Mazzoni, E. O., Pichaud, F. and Desplan, C.** (2003). Homothorax switches function of Drosophila photoreceptors from color to polarized light sensors. *Cell* **115**, 267-79.
- Wernet, M. F., Velez, M. M., Clark, D. A., Baumann-Klausener, F., Brown, J. R., Klovstad, M., Labhart, T. and Clandinin, T. R.** (2012). Genetic dissection reveals two separate retinal substrates for polarization vision in Drosophila. *Curr Biol* **22**, 12-20.
- Wiley, D. C. and Skehel, J. J.** (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **56**, 365-94.
- Winberg, M. L., Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P. M., Montell, D. and Goodman, C. S.** (2001). The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* **32**, 53-62.
- Wisdom, R.** (1999). AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* **253**, 180-5.
- Wolff, T. and Ready, D. F.** (1993). Pattern Formation in the *Drosophila* Retina. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. Volume II (ed.

M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 1277-1326. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E. and Smith, J.** (1998). Principles of Development.

**Woods, D. B., Ghysdael, J. and Owen, M. J.** (1992). Identification of nucleotide preferences in DNA sequences recognised specifically by c-Ets-1 protein. *Nucleic Acids Res* **20**, 699-704.

**Wu, C. H., Madabusi, L., Nishioka, H., Emanuel, P., Sypes, M., Arkhipova, I. and Gilmour, D. S.** (2001). Analysis of core promoter sequences located downstream from the TATA element in the hsp70 promoter from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **21**, 1593-602.

**Wurmbach, E., Wech, I. and Preiss, A.** (1999). The Enhancer of split complex of *Drosophila melanogaster* harbors three classes of Notch responsive genes. *Mech Dev* **80**, 171-80.

**Xu, C., Kauffmann, R. C., Zhang, J., Kladny, S. and Carthew, R. W.** (2000). Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye. *Cell* **103**, 87-97.

**Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.

**Yang, L. and Baker, N. E.** (2001). Role of the EGFR/Ras/Raf pathway in specification of photoreceptor cells in the *Drosophila* retina. *Development* **128**, 1183-91.

**Yasugi, T., Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M. and Tabata, T.** (2008). *Drosophila* optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. *Development* **135**, 1471-80.

**Yoshikawa, K., Aizawa, T. and Hayashi, Y.** (1992). Degeneration in vitro of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* **359**, 64-7.

**Zheng, L. and Carthew, R. W.** (2008). Lola regulates cell fate by antagonizing Notch induction in the *Drosophila* eye. *Mech Dev* **125**, 18-29.

**Zuker, C. S., Cowman, A. F. and Rubin, G. M.** (1985). Isolation and structure of a rhodopsin gene from *D. melanogaster*. *Cell* **40**, 851-8.

**Zuker, C. S., Montell, C., Jones, K., Laverty, T. and Rubin, G. M.** (1987). A rhodopsin gene expressed in photoreceptor cell R7 of the *Drosophila* eye: homologies with other signal-transducing molecules. *J Neurosci* **7**, 1550-7.