



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA DEL DESARROLLO

“Caracterización de *aaqetzalli (aaq)* y *Ferritina*, genes requeridos en el ectodermo durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL MENDOZA ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Instituto de Neurobiología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop
Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, CDMX. NOVIEMBRE, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA DEL DESARROLLO

“Caracterización de *aaqetzalli (aaq)* y *Ferritina*, genes requeridos en el ectodermo durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL MENDOZA ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Instituto de Neurobiología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop
Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, CDMX. NOVIEMBRE, 2016

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/724/2016
ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de septiembre de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del (la) alumno (a) MENDOZA ORTÍZ MIGUEL ÁNGEL con número de cuenta 505003386 con la tesis titulada: "Caracterización de *aaqetzalli* (*aaqz*) y *Ferritina*, genes requeridos en el ectodermo durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*", realizada bajo la dirección del (la) DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOBAR:

Presidente:	DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNÁIZ
Vocal:	DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
Secretario:	DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Suplente:	DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRAN
Suplente:	DRA. MARTHA VERÓNICA VÁZQUEZ LASLOP

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 11 de noviembre de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por aceptarme en el programa del doctorado y por todo el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para la realización de este proyecto de investigación [164428].

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [IN203110].

Especialmente deseo agradecer a los miembros del Comité Tutorial: Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, Rocío Salceda Sacanelles y Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop por sus conocimientos, sus orientaciones, su paciencia y su motivación, ya que han sido fundamentales para mi formación como investigador.

Agradecimientos

A la Dra. Teresa Peña Rangel, muy especialmente le agradezco el tiempo, disposición, paciencia y por toda la ayuda que me brindó en el desarrollo de este trabajo; gracias también por compartirme sus conocimientos, enseñanzas y consejos que fueron fundamentales para la conclusión de este posgrado.

A todos los compañeros del Laboratorio D-04 “Genética de transducción de señales”. Especialmente a mis amigos Néstor Nazario, Ismael Gimete, Alma Bertadillo, Francisco Carmona, Juan Manuel Murillo, Jeans Fernández y José Manuel Zamudio por su compañía, las porras y ánimos que me dieron en todo momento.

A la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Querétaro, en especial a la Dra. Anahi Antaramian, M. en C. Adriana González y Dr. Michael Jerzowski por su apoyo y asesoría técnica en la parte molecular de este proyecto.

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Querétaro, en especial a Nidia Hernández Ríos por su apoyo y asesoría técnica en la generación y procesamiento de imágenes utilizadas para este proyecto.

A una integrante muy valiosa del Laboratorio D-04 “Genética de Transducción de señales, Claudia González le agradezco su ayuda invaluable y la disposición en el trabajo.

A mis padres Anita Ortiz y José Luis Mendoza que siempre me apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica para poder llegar a ser una persona sobresaliente.

A mis hermanos y demás familia en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de todo este proceso académico.

A mi esposa, el amor de mi vida, mi esposa linda, gracias por tu paciencia, por tu comprensión, por tu dedicación, por tu fuerza, por tu amor y por ser tal y como eres. En realidad cada palabra tuya me llena por dentro de muchas fuerzas para conseguir el equilibrio que me permita dar el máximo de mí. Sé que mis palabras no bastan para decirte cuanto te agradezco.

Índice General	Página
Resumen	9
Abstract	10
Introducción.	11
1. La Embriogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i>.	11
2. La Formación del Anlagen Neural.	12
3. La Diferenciación del Neuroectodermo.	14
4. Organogénesis. Epidermis y Sistema Nervioso.	16
4.1 El sistema nervioso.	16
4.2 Epidermis	18
5. Polaridad Celular y Neurogénesis.	19
6. El locus <i>aaquetzalli</i> (<i>aqz</i>).	22
7. La expresión del gen <i>aqz</i>.	23
8. Mutantes de <i>aqz</i>.	25
9. Clones de línea germinal de <i>aqz</i>^{P1492}.	26
10. Los embriones mutantes en <i>aqz</i> presentan defectos en la formación del SN.	27
11. Investigación sobre el locus <i>aqz</i>.	27
12. La vía de señalización de Notch.	29
13. Función de la Ferritina en el desarrollo embrionario de <i>Drosophila</i>.	32
Hipótesis.	35
Objetivos Generales.	35
Objetivos Particulares.	35
Materiales y Métodos.	36
1. Moscas.	36
2. Hibridación <i>in situ</i> en embriones.	38
3. Evaluación del RNA total mediante la técnica Northern blot.	38
4. Generación de anticuerpos contra <i>Aqz</i>.	39
5. Evaluación de proteínas totales solubles mediante la técnica de Western blot	39

6. Inmunohistoquímica.	39
7. Preparación de cutículas.	41
8. Secuenciación.	41
9. Análisis de los fenotipos neurogénicos e interacción de <i>aqz</i> y la vía de señalización de Notch.	42
10. Rescate del gen <i>aqz</i>.	43
11. Dieta con hierro.	43
12. Procesamiento y adquisición de imágenes.	44
Resultados.	45
1. Caracterización molecular del <i>locus de aqz</i>.	45
1.1 Análisis de los cDNAs que abarcan la región genómica de <i>aqz</i> (CG9821).	45
1.2 Análisis de los productos moleculares del gen <i>aqz</i> .	48
1.2.1 Expresión de los transcritos.	48
1.2.2 Análisis molecular de la proteína Aqz.	51
1.2.3 Análisis molecular de la proteína GFP:: <i>Aqz</i> expresada en el alelo <i>aqz</i> ^{GFP} .	52
1.2.4 Análisis del perfil de la huellas ribosomales.	54
2. <i>aqz</i> desempeña un papel muy importante en la embriogénesis durante la diferenciación del ectodermo.	56
2.1 Caracterización del alelo <i>aqz</i> ^{GFP} .	56
2.2 Caracterización del alelo <i>aqz</i> ^{MB041} .	60
2.3 Análisis de complementación.	63
2.4 Rescate genómico.	65
3. Análisis de la expresión de las proteínas Aqz y GFP::<i>Aqz</i> en el desarrollo embrionario.	65
4. <i>aqz</i> tiene una función importante en el desarrollo del sistema nervioso durante la embriogénesis.	69
5. Interacciones genéticas de <i>aqz</i> con los genes de la vía de Notch (genes neurogénicos).	72

6. Aqz y el control de la polaridad del epitelio.	77
7. Análisis de la expresión y caracterización de los fenotipos mutantes de la ferritina durante la etapa embrionaria.	81
7.1 Los mutantes de los genes que codifican para la ferritina presentan defectos en la formación de cutícula embrionarias.	81
7.2 La contribución materna de la ferritina influye en el desarrollo embrionario.	81
7.3 Los mutantes de la ferritina presentan defectos en el sistema nervioso central (SNC).	84
7.4 La activación de una apoptosis ectópica en los mutantes de la ferritina.	86
7.5 Localización y distribución de la ferritina durante el desarrollo embrionario.	88
8. Discusión y conclusión	92
9. Bibliografía	98
10. Apéndice.	104
10.1 Artículo publicado. Ferritin Is Required in Multiple Tissues during <i>Drosophila melanogaster</i> Development	104

Índice de figuras.	Página
Figura 1. Estadios del desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> .	13
Figura 2. Especificación secuencial del neuroectodermo y formación de los neuroblastos en <i>Drosophila</i> .	15
Figura 3. Diferenciación del ectodermo en <i>D. melanogaster</i> .	17
Figura 4. Esquema de una célula epitelial de <i>Drosophila</i> .	21
Figura 5. Mapa de la región genómica de <i>aqz</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .	23
Figura 6. Análisis de la proteína Aqz según la base de datos FlyBase.	24
Figura 7. Expresión de <i>aqz</i> en el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .	25
Figura 8. Fenotipos de embriones con alelos mutantes de <i>aqz</i> .	26
Figura 9. Evidencia de que <i>aqz</i> se requiere para el desarrollo del SN en <i>D. melanogaster</i> .	27
Figura 10. Los nuevos alelos mutantes de <i>aqz</i> presentan defectos en la cutícula.	28
Figura 11. El desarrollo del SNC y SNP en embriones silvestres y mutantes para <i>aqz</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .	29
Figura 12. Vía de señalización de Notch.	31
Figura 13. Expresión de la GFP:: <i>Ferritina</i> en el intestino de las larvas.	34
Figura 14. Secuencia de rescate, cDNAs e Inserciones genéticas alrededor de la región genómica de <i>aqz</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	46
Figura 15. Alineación de las secuencias <i>aqz</i> y <i>CG9837</i> .	47
Figura 16. La expresión de los diferentes transcritos del gen <i>aqz</i> en <i>D. melanogaster</i> .	50
Figura 17. La expresión del gen <i>aqz</i> durante el desarrollo embrionario.	51
Figura 18. Detección de proteínas Aqz en embriones de <i>D. melanogaster</i> en la etapa de 6-8 hrs..	53
Figura 19. Análisis del perfil de las huellas ribosomales de la expresión del locus <i>aqz</i> .	55
Figura 20. Análisis tipo Western de extractos proteicos solubles de	57

embriones homocigotos aqz^{GFP} y embriones homocigotos aqz^{GFP} con una y dos copias del rescate.

Figura 21. Caracterización de los fenotipos mutantes del alelo aqz^{GFP} . 57

Figura 22. Porcentaje de fenotipos mutantes en aqz^{GFP} y rescate con la construcción genómica del aqz ($aqz^{RESCATE}$). 58

Figura 23. Expresión de GFP::Aqz en embriones aqz^{GFP} . 59

Figura 24. Análisis tipo Western de extractos proteicos solubles de embriones silvestres utilizados como control (primer carril), embriones homocigotos aqz^{MB041} (segundo carril) y embriones homocigotos aqz^{MB041} con una (tercer carril) y dos copias del rescate (cuarto carril). 60

Figura 25. Caracterización de los fenotipos mutantes del alelo aqz^{MB041} . 61

Figura 26. Porcentaje de fenotipos mutantes en aqz^{MB041} y rescate con la construcción genómica del aqz ($aqz^{RESCATE}$). 62

Figura 27. Mapa físico de las deficiencias en el 3er cromosoma que incluyen la región 85B2 donde se ubica aqz . 64

Figura 28. Análisis de la expresión de las proteínas Aqz y GFP::Aqz en el desarrollo embrionario. 67

Figura 29. GFP::Aqz no se expresa en las células precursoras, pero sí en el tejido nervioso diferenciado. 68

Figura 30. Expresión de GFP::Aqz en la epidermis y en el sistema nervioso 68

Figura 31. Defectos en el SN desde etapas tempranas de la formación de este tejido en individuos mutantes de aqz . 71

Figura 32. Los embriones homocigotos mutantes aqz^{GFP} presentan fenotipos neurogénicos. 73

Figura 33. Los alelos aqz^{GFP} y aqz^{MB041} interaccionan genéticamente con genes neurogénicos. 76

Figura 34. aqz^{MB041} interacciona genéticamente con genes neurogénicos. 77

Figura 35. Los embriones mutantes de aqz presentan un neuroepitelio 79

con defectos de polaridad.

Figura 36. Los embriones mutantes de presentan un neuroepitelio con defectos en la uniones adherentes e irregularidad de la expresión de DI. 80

Figura 37. Los alelos mutantes de la ferritina presentan una gran variedad de fenotipos embrionarios. 83

Figura 38. Los alelos mutantes de la ferritina presentan fenotipos mutantes en el SNC. 85

Figura 39. Alteraciones en el desarrollo del SN en mutantes de la ferritina. 86

Figura 40. Los mutantes de ferritina presentan apoptosis en el SNC. 87

Figura 41. Acumulación de ferritina marcada en embriones con diferentes fondos genéticos. 90

Índice de tablas.	Página
Tabla 1. Lista de los cDNAs que abarcan la región genómica del gen <i>aqz</i> , usados para reconstruir teóricamente un cDNA “full-length”.	48
Tabla 2. Tabla de complementación de los alelos de <i>aqz</i> .	64
Tabla 3. Lista de anticuerpos marcadores utilizados para evaluar el desarrollo del SN en los mutantes de <i>aqz</i> .	69
Tabla 4. Alelos mutantes de <i>aqz</i> y alelos mutantes de los genes pertenecientes a la vía de Notch.	74

Resumen

Los movimientos morfogenéticos que se llevan a cabo durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster* modulan la formación y localización, tanto de una célula, como de un tejido epitelial para mantener la estructura y funcionalidad de dicho tejido dentro de un embrión. Para llevar a cabo estos movimientos, se requieren de cambios dinámicos y coordinados en la polaridad apico-basal y la organización del citoesqueleto en cada célula individual. Dichos cambios involucran rearrreglos en los contactos célula-célula y en la organización espacial del tráfico de proteínas dentro y fuera de la célula. La delaminación de los neuroblastos durante de la neurogénesis de *Drosophila*, es un proceso ampliamente caracterizado cuyo desarrollo requiere de un neuroepitelio polarizado, regulado por la interacción entre las proteínas que establecen el control de la polaridad apico-basal del epitelio y la vía de señalización de Notch. En este trabajo se muestra la caracterización funcional y molecular de *aaquetzalli* (*aqz*), un gen cuyas mutaciones afectan el desarrollo temprano del sistema nervioso, principalmente en la especificación del tejido y la polaridad de la células del neuroectodermo. Adicional a esto, también se muestra que la mutación, de manera individual o en conjunto, de los genes que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera de la ferritina, generan letalidad embrionaria con fenotipos en el sistema nervioso y epidermis, muy similares a los fenotipos mutantes *aqz*. En el caso del gen *aqz*, encontramos que éste se requiere para el mantenimiento de la polaridad celular del epitelio y la activación de la vía de Notch durante la neurogénesis. *aqz* codifica para una proteína pionera con dominios conservados. En los mutantes de la ferritina, a diferencia de los mutantes de *aqz*, no se observan defectos tempranos en el desarrollo de sistema nervioso. Los mutantes de la ferritina presentan defectos a nivel de la integridad estructural del tejido nervioso y epidermis, ya diferenciados. Los resultados obtenidos en este trabajo con base en la función de la ferritina en el embrión de *Drosophila*, sugieren que esta proteína funciona como un almacén de hierro, transporte intracelular de hierro y protección contra el estrés oxidante durante múltiples etapas en el desarrollo embrionario de *Drosophila*.

Abstract

Morphogenetic movements during embryogenesis require dynamic changes in epithelial cell polarity and cytoskeletal reorganization. Such changes involve, among others, rearrangements of cell-cell contacts and protein traffic. In *Drosophila melanogaster*, neuroblast delamination during early neurogenesis is a well-characterized process requiring a polarized neuroepithelium, regulated by the Notch signaling pathway. Maintenance of epithelial cell polarity ensues after proper Notch pathway activation during neurogenesis. We characterize, *aaquetzalli* (*aqz*), a gene whose mutations affect cell polarity and nervous system specification. Additionally, we present analyses of embryonic phenotypes for mutations in *Ferritin 1 heavy chain* (*Fer1HCH*), *Ferritin 2 light chain* (*Fer2LCH*) and in both genes simultaneously. Mutations in either gene or deletion of both genes results in a similar set of cuticular and nervous system embryonic phenotypes as *aqz*. *aqz* encodes pioneer proteins with a conserved domain. *aqz* expression occurs at all stages of the fly lifecycle, and is dynamic. *aqz* mutants are lethal, and disruption of cell polarity during embryonic ventral neuroepithelium differentiation results in loss of epithelial integrity and misplacement of membrane proteins (shown by misplacement of Crumbs, DECCadherin and Delta). *aqz* interacts genetically with the Notch signaling pathway. As a consequence, *aqz* mutant embryos with compromised apical-basal cell polarity develop spotty changes of neuronal and epithelial numbers of cells. In *ferritin* mutants, unlike *aqz* mutants, no defects are observed early in the development of the nervous system. Ferritin mutants have defects on structural integrity of nerve and epidermal tissue already differentiated. Our results are consistent with insect ferritin combining three functions: iron storage, intercellular iron transport, and protection from iron-induced oxidative stress. These functions are required in multiple tissues during *Drosophila* embryonic development.

Introducción.

1. La Embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

La embriogénesis es un proceso continuo, pero se ha organizado para su estudio en diferentes etapas (Fig. 1). Las etapas están subdivididas con límites artificiales con el objetivo de presentar un comienzo y un final del proceso embrionario para cada etapa. Durante la primera etapa, el embrión sólo sufre divisiones nucleares. El núcleo cigótico se divide 13 veces antes de la celularización. Los núcleos ya formados mayoritariamente migran a la periferia donde se van a rodear de membrana. Al final de la celularización se llega a la etapa de blastodermo celular. En la etapa subsecuente de gastrulación aparecen las tres capas germinales primordiales (ectodermo, mesodermo y endodermo). El ectodermo y mesodermo forman la banda germinal (Figs. 2 y 3). La extensión gradual posterior de la banda germinal sobre el lado dorsal del embrión se conoce como extensión de la banda germinal. Después de la extensión, la banda germinal sufre una retracción. De esta manera, se restaura la forma normal anatómica de la larva. Después de la retracción de la banda germinal queda un orificio en la superficie dorsal de la epidermis; este orificio es ocupado por un epitelio de células largas y planas, llamado amnioserosa [1]. El proceso de cerrado dorsal consiste en el movimiento o migración de las células laterales de la epidermis de ambos lados del embrión hasta encontrarse en la línea media del embrión. Estas células cubren completamente la amnioserosa y sellan al embrión dorsalmente. Los movimientos morfogenéticos que dan paso a la involución de la cabeza empiezan al mismo tiempo que la retracción de la banda germinal y consisten en la invaginación y rearreglo de varios de los tejidos del acron (parte anterior del embrión no metamérica) y los primeros tres segmentos del cuerpo, para dar origen a la cabeza [2]. Al final de la embriogénesis, las células epiteliales, que ahora cubren completamente el exterior del embrión, secretan la cutícula. Las células ectodérmicas ventrales secretan además varias hileras de dentículos característicos en número y forma para cada segmento.

2. La Formación del Anlagen Neural.

En el embrión de *Drosophila*, el anlagen neural o la primera agrupación de células precursoras del Sistema Nervioso (SN) aparece en la etapa de blastodermo con la especificación del neuroectodermo (Fig. 1). Un gradiente nuclear del factor de transcripción Dorsal [3], con concentraciones mayores en las células más ventrales, determina en primera instancia la posición y la extensión del neuroectodermo. De esta manera se activa la expresión de los genes de prepatrón neural y se antagoniza la actividad de Decapentaplegic (Dpp), un factor inductor de la epidermis dorsal [4]. Los altos niveles de la proteína nuclear Dl en la parte ventral inducen la expresión de *short gastrulation (sog)* definiendo el neuroectodermo. La función de Sog es antagonizar los efectos de dorsalización de Dpp. Dpp evita que el neuroectodermo se diferencie en epidermis dorsal. Los gradientes de los morfógenos Dpp y Sog actúan en conjunto con la vía de señalización de EGFR ("Epidermal Growth Factor Receptor", por sus siglas en inglés) para subdividir el neuroectodermo en tres dominios longitudinales, cada uno definido por la expresión de los genes "columnares" (Fig. 2B), *ventral nervous system defective (vnd)*, *intermediate neuroblast defective (ind)* y *muscle segment homeobox (msh)* [5].

Las asimetrías en el ovocito a lo largo del eje antero-posterior se establecen por la localización del mRNA de varios genes depositados en el ovocito por la madre, por ejemplo, con *bicoid (bcd)* en el polo anterior y *nanos* [6] en el polo posterior. Los productos traducidos de estos genes se difunden en el embrión, formando dos gradientes proteicos opuestos. Los genes "gap" responden a la concentración de proteínas de los genes de contribución materna. Sus productos proteicos interaccionan entre sí, de modo tal que cada proteína de los genes "gap" define regiones específicas del embrión. Las proteínas de los genes "gap" activan o reprimen junto con los genes de efecto materno a los genes de la regla de los pares como *even skipped*, *odd paired*, *fushi tarazu*, etc.

Todos estos genes activan a su vez la expresión de los genes de la polaridad de segmento (*engrailed*, *wingless*, *hedgehog*, *patched*, *gooseberry*, *invected*, etc.) en territorios de células adyacentes en cada segmento [7].

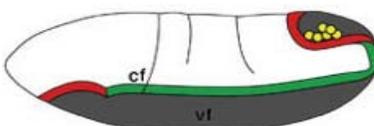
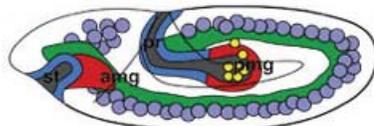
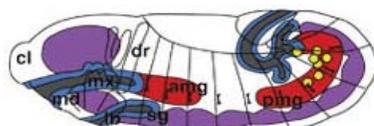
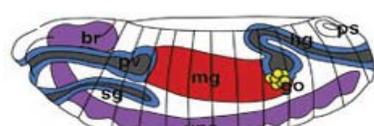
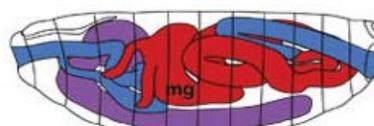
	No. de Etapa	Tiempo	Eventos
	1- 4	0:00 - 2:10 h	Divisiones del Blastodermo
	5	2:10 - 2:50 h	Blastodermo Celular
	6 - 7	2:50 - 3:10 h	Gastrulación
	8 - 11	3:10 - 7:20 h	Extensión de la banda germinal
	12 - 13	7:20 - 10:20 h	Retracción de la banda germinal
	14 - 15	10:20 - 13:00 h	Involución de la cabeza y cerrado dorsal
	16 - 17	13:00 - 22:00 h	Diferenciación

Figura 1. Estadios del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Embriones en vista lateral, orientados dorsalmente hacia arriba y anteriormente hacia la izquierda. Esta es la misma orientación en la que se observarán todas las imágenes de embriones en este trabajo. Los tiempos indicados son a 25°C de incubación. Endodermo (Verde), mesodermo (rojo) y SN (amarillo) (modificado de [8]).

La expresión conjunta de los genes que definen los ejes antero-posterior y dorso-ventral de los embriones de *Drosophila* forman un sistema de coordenadas que es interpretado de dos formas por las células del neuroectodermo: primero, se define la posición de los “clusters” proneurales, y segundo, se confiere una identidad única a los neuroblastos (Fig. 2) [4].

3. La Diferenciación del Neuroectodermo.

A partir del ectodermo ventral (neuroectodermo) se derivan la epidermis ventral y también el tejido nervioso; el ectodermo dorsal se transforma solamente en epidermis [9]. El ectodermo en la etapa 9 del desarrollo embrionario está organizado en dos regiones claramente definidas: una es ventromedial, inmediatamente adyacente al mesodermo; ésta consiste de células alargadas. Los neuroblastos y las células de la epidermis ventrolateral se derivan de esta región (Fig. 2B-E). La otra región ectodérmica es lateral, directamente continua a la amnioserosa, y consiste en células columnares y empacadas, derivadas de mitosis generadas en la etapa 8; la epidermis dorsal y las placodas traqueales se forman a partir de esta región [1].

4. Organogénesis. Epidermis y Sistema Nervioso.

La organogénesis comprende cambios citológicos que ocurren en los primordios embrionarios y que desembocan eventualmente en la formación de tejidos y órganos. Estos cambios incluyen movimientos morfogenéticos durante la gastrulación y la elongación de la banda germinal dando como resultado la formación de un patrón corporal básico, y las modificaciones debidas a procesos de crecimiento y de citodiferenciación ulteriores hasta desembocar en órganos y sistemas formados [1].

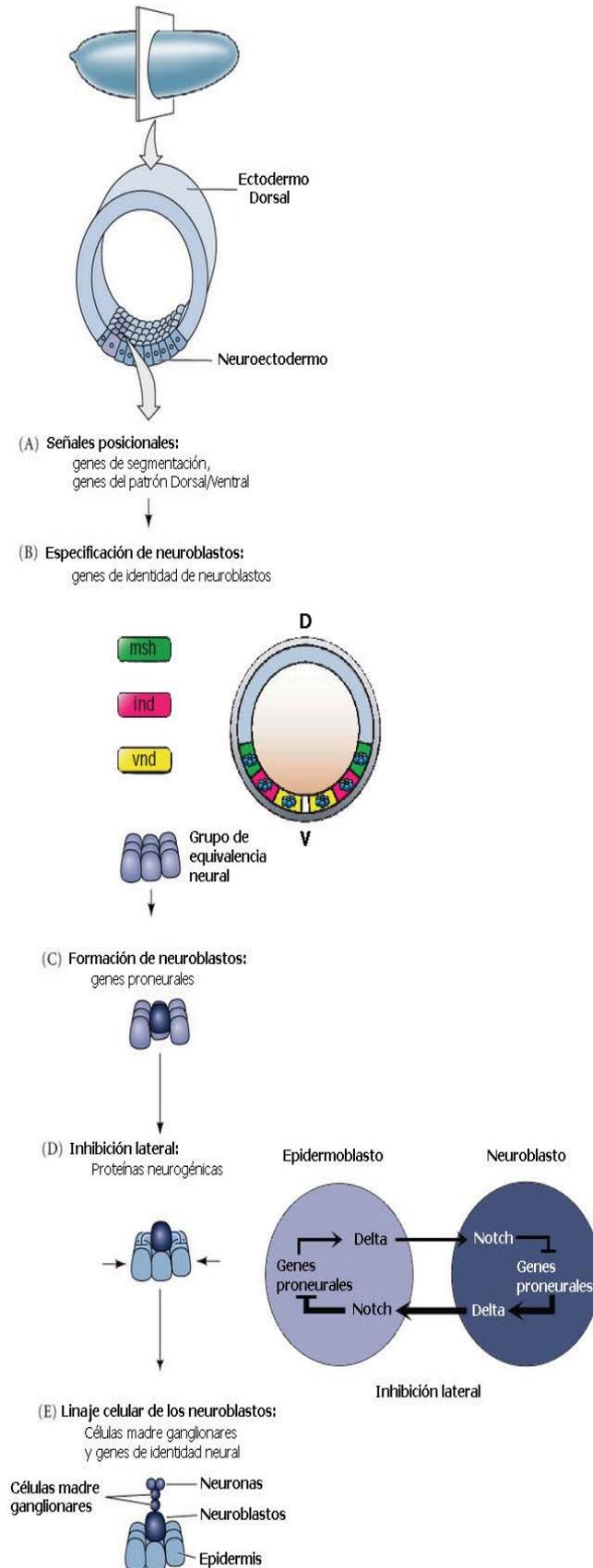


Figura 2. Especificación secuencial del neuroectodermo y formación de los neuroblastos en *Drosophila*.

(A) El neuroectodermo se especifica en la región ventral del embrión como consecuencia de la señalización posicional a lo largo del eje dorsal-ventral. (B) Imagen esquemática de un corte transversal de un embrión de *Drosophila*. Los genes *ventral nervous system defective (vnd)*, *intermediate neuroblast defective (ind)* y *muscle segment homeobox (msh)* dividen el neuroectodermo en tres dominios columnares en respuesta a gradientes morfogénicos antagonistas de Dpp y Sog. (B y C) Grupo de células precursoras de neuroblastos especificadas por la expresión de genes proneurales, que son factores de transcripción de tipo bHLH. (D) La interacción entre las células precursoras de neuroblastos (grupos proneurales) provoca que una célula del grupo se convierta en neuroblasto. Estas interacciones están mediadas por la vía de Notch. (D, derecha) Esquema simplificado de la inhibición lateral, proceso mediado por Notch, Delta y los genes proneurales. (E) Divisiones asimétricas de los neuroblastos para generar células madre ganglionares (CMG) y la diferenciación posterior de las CMG a neuronas. Imagen modificada de Gilbert, 2006 [10]; Egger y col., 2007 [5].

4.1 El sistema nervioso.

El sistema nervioso (SN) está formado por tres diferentes subtipos:

- El Sistema Nervioso Central (SNC), el cual se origina a partir de los neuroblastos y las células progenitoras de la línea media e incluye al cerebro y la cadena ganglionar ventral.
- El Sistema Nervioso Periférico (SNP), el cual se origina de las células progenitoras de los órganos sensoriales y conforma el sistema sensorial.
- El Sistema Nervioso Estomatogástrico (SNE), el cual se origina a partir de tres invaginaciones en el lado dorsal del *stomodeum* en la parte anterior dorsal del embrión [8].

El desarrollo del SNC es un proceso que se ha dividido en tres etapas para su estudio:

En la primera etapa, se forma el anlagen neurogénico (células que van a dar origen al tejido neuroectodérmico, Fig. 2A-B). Las células ventromediales del ectodermo adquieren propiedades neurogénicas, diferenciando a la región neurogénica del tejido remanente.

El segundo paso consiste en la segregación de las células neurogénicas progenitoras a partir de la región neural recién diferenciada (Fig. 2C-D). Los tipos de células progenitoras requeridos para formar el SN embrionario son varios: a) los neuroblastos, b) las células progenitoras de la línea media y c) las células progenitoras de los órganos sensoriales. Los neuroblastos se forman como células alargadas localizadas a ambos lados de la línea media ventral [1]. Las células progenitoras de la línea media derivan del mesoectodermo. Estas células forman una sola hilera a cada lado del embrión y separan el neuroectodermo del mesodermo. Las células progenitoras de los órganos sensoriales derivan de posiciones más laterales y son las precursoras del SNP.

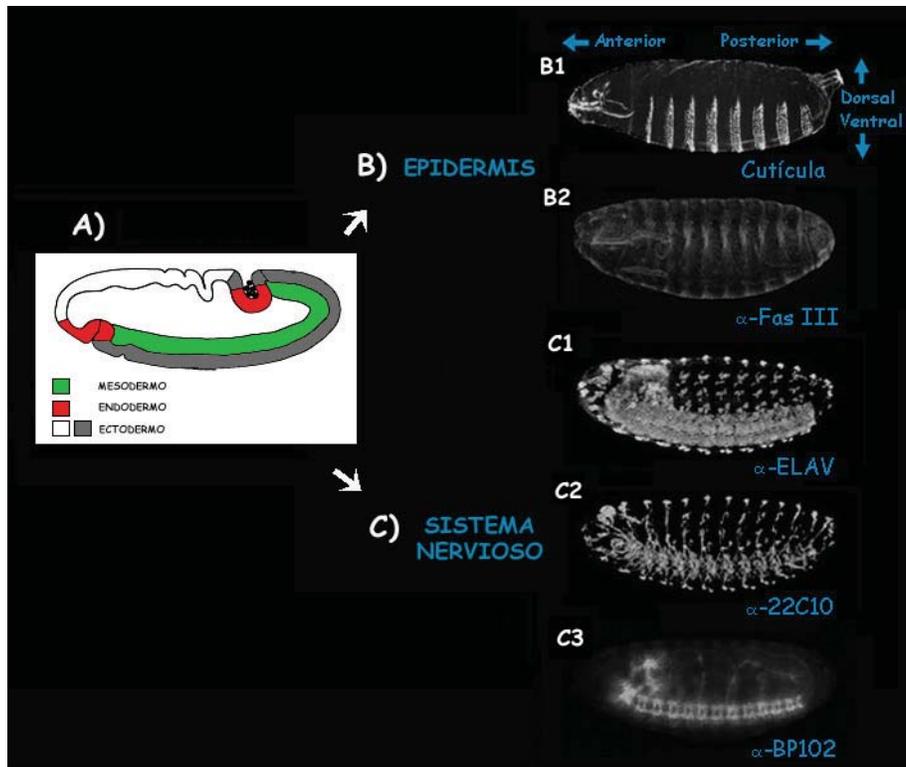


Figura 3. Diferenciación del ectodermo en *D. melanogaster*. (A) Embrión en la etapa 5, al inicio de la gastrulación. En esta etapa se determinan las tres capas germinales primordiales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Endodermo (rojo): este tejido representa el primordio del intestino. Mesodermo (verde): a partir de este tejido se forman los músculos, el tejido graso, los hemocitos, las glándulas linfoides y la porción somática de las gónadas. Ectodermo (gris): este tejido se diferencia en SN y epidermis [1]. Imágenes a la derecha y en blanco: (B) Epidermis. B1: cutícula de un embrión silvestre y B2: Inmunohistoquímica contra la Fasciclina III (Fas III), una proteína de adhesión celular que sirve como marcador de epidermis [11]. (C) SN [11]. C1, C2 y C3: inmunohistoquímica del SNC y SNP de embriones en la etapa 17. C1: Inmunohistoquímica contra “Embrionic Letal Abnormal Vision” (ELAV), un marcador nuclear de neuronas [12,13]. C2: Inmunohistoquímica contra 22C10/Futsch, una proteína asociada a microtúbulos que sirve como marcador de cuerpos celulares y axones del SN [14,15]. C3: Inmunohistoquímica contra BP102, proteína no caracterizada que marca las comisuras del SNC [16].

La delaminación de los neuroblastos a partir del neuroectodermo ocurre secuencialmente en aproximadamente 3 h al mismo tiempo que ocurre la gastrulación. Sin embargo, la mayoría de las células de la región media ventral

(neurogénica) no se delaminan y permanecen en la periferia para formar epidermoblastos. Así, las células del neuroectodermo tienen que decidir entre dos vías alternativas: neurogénesis o epidermogénesis. La decisión de convertirse en células neuronales o epidermis está controlada por dos grupos de genes, los genes proneurales, genes que codifican para factores de transcripción tipo bHLH, y genes neurogénicos, que conforman la vía de Notch [17]; como se describió anteriormente.

El último paso en la formación del SN es la producción y la citodiferenciación de las neuronas y las células gliales a partir de los neuroblastos que se diferencian primero a células madre ganglionares y que finalizan su diferenciación en neuronas y células gliales (Fig. 2E).

4.2 Epidermis

La epidermis, derivada del ectodermo, es la capa epitelial exterior del embrión, larva y adulto; este tejido secreta la cutícula que constituye el exoesqueleto de la mosca. La diversidad celular dentro de la epidermis se manifiesta externamente en la gran variedad de elementos desplegados por la cutícula. Estos elementos incluyen: dentículos, quetas y órganos sensoriales. Estos últimos tienen una distribución topológica característica [8]. La epidermis se forma a partir de las células que permanecen en la superficie embrionaria después de la segregación de los neuroblastos de la capa ectodérmica (Fig. 2C-E). La diversidad celular durante el desarrollo de la epidermis es más prominente en etapas tardías de la embriogénesis, a partir de la retracción de la banda germinal. Esta diversidad celular se manifiesta morfológicamente al final de la embriogénesis cuando se forman los elementos característicos de la cutícula. Estos elementos confieren una morfología individual y característica a los segmentos, como se mencionó anteriormente. En la parte interna, esta diversidad también se manifiesta en arreglos celulares diferenciables que generarán los elementos característicos de la capa cuticular (como dentículos, quetas. etc.).

Después de un periodo inicial de divisiones mitóticas, al final de la retracción de la banda germinal, la epidermis exhibe diferencias regionales muy claras, con células cuboidales en la región laterodorsal y células delgadas y elongadas en la región ventral, en la vecindad de la cadena ganglionar ventral. En este mismo tiempo los órganos sensoriales se vuelven aparentes. Las células de la epidermis dorsolateral se elongan y migran sobre la amnioserosa para llevar a cabo el cerrado dorsal del embrión [1].

5. Polaridad Celular y Neurogénesis.

La formación de la polaridad en una célula, es un proceso crítico para la función y la generación de una gran diversidad celular. Durante la neurogénesis del embrión de *Drosophila*, se especifican distintos destinos celulares de manera intrínseca debido a una distribución interna desigual de los factores determinantes del destino celular, y/o externa, por los factores extracelulares establecidos en el ambiente extracelular [18].

La formación y mantenimiento de esta polaridad requiere de una integración dinámica de varios procesos celulares: A) Contactos entre célula-célula (uniones adherentes) y contactos entre célula y la matriz extracelular. B) Tráfico vesicular polarizado de proteínas y lípidos para establecer dominios membranales específicos. C) Dominios proteínicos polarizados en la membrana plasmática con proteínas estructurales o armazón para generar una organización apical o basolateral en la membrana. D) Organización e interacción de los polímeros que conforman el citoesqueleto con la maquinaria molecular que establece la adhesión celular (Fig. 4) [19].

Como se describió anteriormente, el sistema nervioso de *Drosophila* se origina del ectodermo ventro-lateral del embrión, al cual se le denomina neuroectodermo. La vía de señalización que controla este proceso de neurogénesis es la vía de Notch, la cual funciona regulando el destino neural o epidérmico de las células que conforman el neuroectodermo (inhibición lateral) y posteriormente la diferenciación de los precursores neurales a neurona o glía

(divisiones asimétricas). Durante la inhibición lateral, las células que se delaminan del neuroectodermo se diferencian como células precursoras del sistema nervioso (neuroblastos) [20]. Este proceso presenta dos importantes retos a la integridad de las uniones adherentes entre células. Primero, los neuroblastos que se están delaminando deberán de perder su contacto célula-célula con las células neuroectodérmicas vecinas. Después, las células remanentes deberán establecer nuevas uniones adherentes para llenar los orificios dejados en la capa neuroectodérmica. Si todas las células de este epitelio son forzadas a diferenciarse en neuroblastos, todas perderán las uniones adherentes, por tanto se perderá la organización de la estructura epitelial. Los mecanismos causantes de esta alteración estructural no se han descrito por completo pero el restablecimiento normal de la estructura del epitelio depende de la formación de las uniones adherentes y su interacción con las proteínas reguladoras de la polaridad apical (PRPA) y basolateral (PRPB) [21]. Las PRPA mantienen interacciones de apoyo mutuo con las uniones adherentes para mantener la integridad del epitelio. Las proteínas PRPB establecen interacciones de competitividad negativa con las PRPA, generan y mantienen una polaridad apico-basal en las células del epitelio [19]. Las PRPA en *Drosophila* incluyen a Crumbs (Crb), proteína cinasa C atípica (α PKC, por sus siglas en inglés); la GTPasa Cdc42 perteneciente a la familia Rho de las GTPasas; las proteínas adaptadoras o armazón Bazooka (Baz, en *Drosophila* Par3), Par6, Stardust (Sdt), y Patj. Además, las proteínas PTEN, Moesin y Yurt también son consideradas como PRPA. Las uniones adherentes que conectan a las células epiteliales unas con otras, tienen como principal componente al complejo Cadherina-catenina (CCC). En *Drosophila*, el complejo CCC está integrado por DE-cadherina (DE-cad, Shotgun) la cual une la proteína catenina-p120 y la proteína adaptadora Armadillo (Arm, el homólogo de *Drosophila* para la β -catenina).

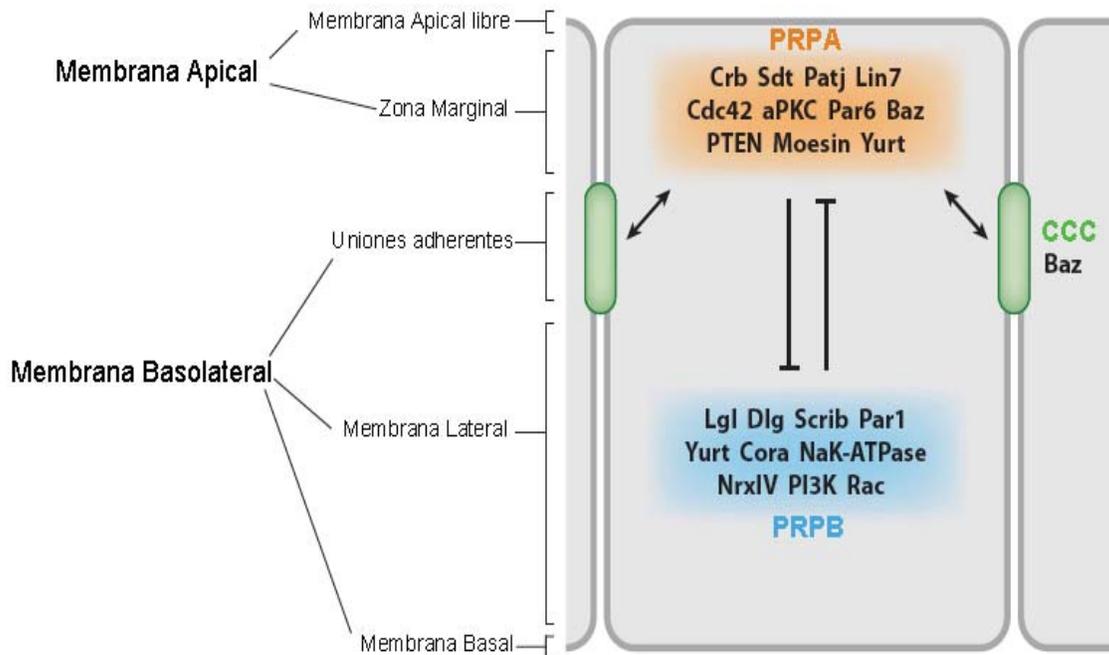


Figura 4. Esquema de una célula epitelial de *Drosophila*. A la izquierda de la imagen se muestran las principales regiones de la membrana plasmática de una célula epitelial. En naranja, se observan las principales Proteínas Reguladoras de la Polaridad Apical (PRPA) y su interacción con las uniones adherentes (en verde). La polaridad apico-basal de las células epiteliales se forma y mantiene a través de las interacciones de las proteínas PRPA y las Proteínas Reguladoras de la Polaridad Basal (PRPB, en azul). Imagen modificada de Tepass, 2012 [19].

Se ha encontrado una conexión importante entre la función de las PRPAs y la vía de Notch durante la neurogénesis. Los mecanismos moleculares establecidos por la interacción entre las PRPAs para regular la integridad de las uniones celulares y la polaridad del epitelio, al parecer también afectan la polarización de los componentes de la vía de Notch durante la inhibición lateral y posteriores divisiones asimétricas de los neuroblastos [22];[18].

6. El locus *aaquetzalli* (*aqz*).

El gen *aqz* se encuentra en el brazo derecho del tercer cromosoma en la región *85B2* del genoma de *D. melanogaster*. La región codificante para *aqz* consta de aproximadamente 7000 pares de bases y se sobrelapa parcialmente en la posición 5' con un ARN no codificante (*CR43130*) y en la posición 3' con el gen *CG9837*; ambos con función desconocida (Fig. 5). A partir de esta secuencia se forman al menos cuatro transcritos, diferentes en tamaño y composición (Fig. 5). La proteína de aproximadamente 30 KDa (Fig. 6A), presenta un alto grado de homología con proteínas codificadas por genes de especies filogenéticamente cercanas a *D. melanogaster* como son: *D. simulans* (*aqz/Dsim*) y *D. pseudooscura* (*aqz/Dp*) [23]. Estos genes, al igual que *aqz*, se reportan como de función desconocida (Fig. 6B). Los análisis tipo BLAST de la secuencia de *aqz* también revelan una elevada identidad con la proteína codificada por otro gene de *D. melanogaster* ubicado en el cromosoma X (*CG32797/Dm*) y con algunas proteínas de otros invertebrados y vertebrados (Fig. 6C-D). *Aqz* contiene un dominio conservado en la parte 5' de la proteína. La homología consta de una secuencia rica en prolina común en proteínas de invertebrados y vertebrados, característica de los receptores nucleares co-activadores de la transcripción (dominio proteico PNRC) ó "PNRC-domain proteins" (por sus siglas en inglés, "Proline-rich Nuclear Receptor Co-activator") [24];[25] (Fig. 6C).

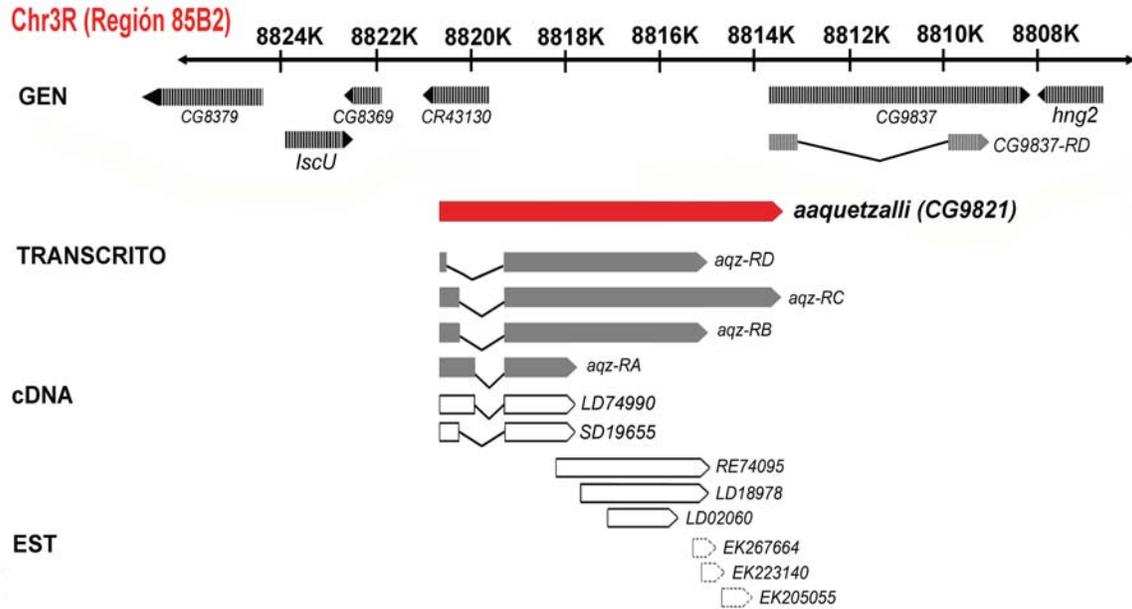


Figura 5. Mapa de la región genómica de *aqz* de *Drosophila melanogaster*. La secuencia de *aqz* abarca un poco más de 7 Kb, del nucleótido 8,813,490 hasta el 8,820,682 en la base del cromosoma 3R en la región 85B2 (flecha sólida roja). Debajo de la línea del cromosoma (Chr3R), se indican otros genes que mapean en las regiones aledañas a *aqz* (flechas negras y grises con rayas verticales). De acuerdo con los programas de predicción molecular, *aqz* codifica para cuatro diferentes mRNA, cada uno con dos exones (flechas de color gris) y un intrón (línea de color negro). Se indican los cDNAs (flechas blancas con bordes negros continuos) y los ESTs del locus (flechas blancas con líneas negras punteadas)[23].

7. La expresión del gen *aqz*.

En trabajos recientes de nuestro laboratorio, se ha determinado el patrón de expresión del transcrito de *aqz* y la presencia de Aqz durante el desarrollo embrionario (Figs. 13 y 16). Además de la etapa embrionaria, también se observó la expresión del gen en adultos. En este análisis de expresión se observaron solo dos transcritos, a diferencia de los 4 establecidos por el programa de predicción. El peso molecular de los transcritos es de aproximadamente 5030 y 7530 nucleótidos (Fig. 7). El primero de tamaño muy similar a los transcritos *aqz-RB* ó *aqz-RD*, y el segundo a *aqz-RC*. Estos datos se apoyan también en la existencia de varios cDNAs parcialmente sobrelapados que darían un cDNA "full length" del tamaño aproximado de las bandas observadas en nuestros análisis tipo Northern (Fig. 5) [26].

A) MTYSHNSVRNNIRMTTASATKSI RLKKGAAASATSASNSSTPSPTSAPVSPVTSVSASAPATPLVTAHSNSIASSTNNA QFLSSSPTSLGFLGLSALATPPNQQRQLQSQSTGSKNKYQSSQQQRQSPQQQQGSSVGGGGFFANNRRNGGGR SPQAMQVRQSPATILGGGFSPGIVGGSARKQRK **SPSLGGKISPOHQMQHPLIPTALTHFAGSKCFDAPAPTALPKPPQ**HWTLRSRSEGLPMMMPMPKQVPMQTRSKRNLLDDFDTHNLKLLLVQS

B)

Aqz/Dm MTYSHNSVRNNIRMTTASATKSI RLKKGAAASATSASNSSTPSPTSAPVSPVTSVSASAPAT
Aqz/Dsim MTYSHNSVRNNIRMTTASATKSI RLKKGAAASATSASNSSTPSPTSAPVSPVTSVSASAPAT
AQZ/Dp MTYSHNSVRNNIRMTTASATK**A**IRKKGAA**G**SA.SAS...TPSPTSA.....

Aqz/Dm PLVTAHSNSIASSTNNAQFLSSSPTSLGFLGLSALATPPNQQRQLQSQSTGSKNKYQQ
Aqz/Dsim PLVTAHSNSIASSTNNAQFLSSSPTSL**L**GLGLSALATPPNQQRQLQSQSTGSKNKYQQ
Aqz/Dp PLVTAHSNSIASSTN.....QQ

Aqz/Dm SQQQRQSPQQQQGSSVGGGGFFANNRRNGGGRSPQAMQVRQSPATILGGGFSPGIV**G**
Aqz/Dsim SQQQRQSPQQQQGSSVGGGGFFANNR**K**NGGGRSPQAMQVRQSPATILGGGFSPGIV**G**
Aqz/Dp SQQQ**S**QS.QQQQ...GGGGFFANN**.K**RNGGRSPQ**G.M**VVRQSPATILGGGFSP.I.G

Aqz/Dm **GSARKQRKSPSLGGKISPOHQMQHPLIPTALTHFAGSKCFDAPAPTALPKPPQH**HWTLRSR
Aqz/Dsim GSARKQRK**SPSLGGKISPOHQMQHPLIPTALTHFAGSKCFDAPAPTALPKPPQH**HWTLRSR
Aqz/Dp GSARKQRK**SP**.....**SPQ**...**Q**HPLIPTALTHFAGSKCFDAPAPTALPK**PPQ**HWTLRS**K**

Aqz/Dm SEGKLPMMMPMPKQVPMQTRSKRNLLDDFDTHNLKLLLVQS **285 aa.**
Aqz/Dsim SEGKLPMMMPMPKQVPMQTRSKRNLLDDFDTHNLKLLLVQS
Aqz/Dp SE**E**KL.....SKRNLLDDFDTHNLKLLLVQS

C)

90-141	g-KENYAGAFSDPPSPVLPKPPSHWVGSTV- ----EN-.....SNQNRELMAV.....HLKTELLVQ.....	<i>H. sapiens</i> (Human), PNRC1
245-296	g-KENYAGAFSDPPSPVLPKPPSHWVGSTA- ----EN-.....PSQSRELMAV.....HLKTELLVQ.....	<i>M. musculus</i> (Mouse), MCG 12570
196-247	g-KENYAGAFSDPPSPVLPKPPSHWVGSTV- ----EN-.....SNQNRELMAV.....HLKTELLVQ.....	<i>H. sapiens</i> (Human), PROL2
84-133	a-SQNYAGAFSEPPSPVLPKPPSHWVWVSL- ----EN-.....NPSDKETWTF.....QLKTELLVQ.....	<i>R. norvegicus</i> (Rat), Pnrc2
245-296	g-KENYAGAFSDPPSPVLPKPPSHWVGSTA- ----EN-.....PSQSRELMAV.....HLKTELLVQ.....	<i>M. musculus</i> (Mouse), Pnrc1
275-326	g-KENYAGAFSDPPSPVLPKPPSHWVGSTV- ----EN-.....SNQNRELMAV.....HLKTELLVQ.....	<i>H. sapiens</i> (Human), B4-2
244-295	g-KENYAGAFSDPPSPVLPKPPSHWVGSTT- ----EN-.....PSQSRELMAV.....HLKTELLVQ.....	<i>R. norvegicus</i> (Rat), Pnrc1
211-284	a-LTHFAGSKCFDAPAPTALPKPPQHWT- ----LSRSEGLPmmmpsmPKQVPMQTRskrnllddfdthnlklllvq.....	<i>D. melanogaster</i> (Fruit fly), CG9821
90-139	a-SQNYAGAFSEPPSPVLPKPPSHWVWVSL- ----EN-.....NPSDKETWTF.....QLKTELLVQ.....	<i>M. musculus</i> (Mouse), Pnrc2
139-193	a-EKTYAGAFSEPPSPVLPKPPSHWVGDA- --PQHTH.....KHCSEOMSE.....HLKTELLVQ.....	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish), Pnrc1
89-138	.ANQNYAGAFSEPPSPVLPKPPSHWVWVVF- ----EN-.....NPSDKETWTF.....QLKTELLVQ.....	<i>H. sapiens</i> (Human), PNRC2
117-173	s-LTHFVSKCFLAPPPTALPNPPEHWTLRSKGMQ- ----G.....glskr.....	<i>D. melanogaster</i> (Fruit fly), CG32797
211-284	a-LTHFAGSKCFDAPAPTALPKPPQHWT- ----LSRSEGLPmmmpsmPKQVPMQTRskrnllddfdthnlklllvq.....	<i>D. simulans</i> (Fruit fly), CG9821
100-147	g--QNYAGAFSEPPSPVLPKPPSHWVWVSLP- ----G.....DHRLEMTF.....QLKTELLVQ.....	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish), Pnrc2

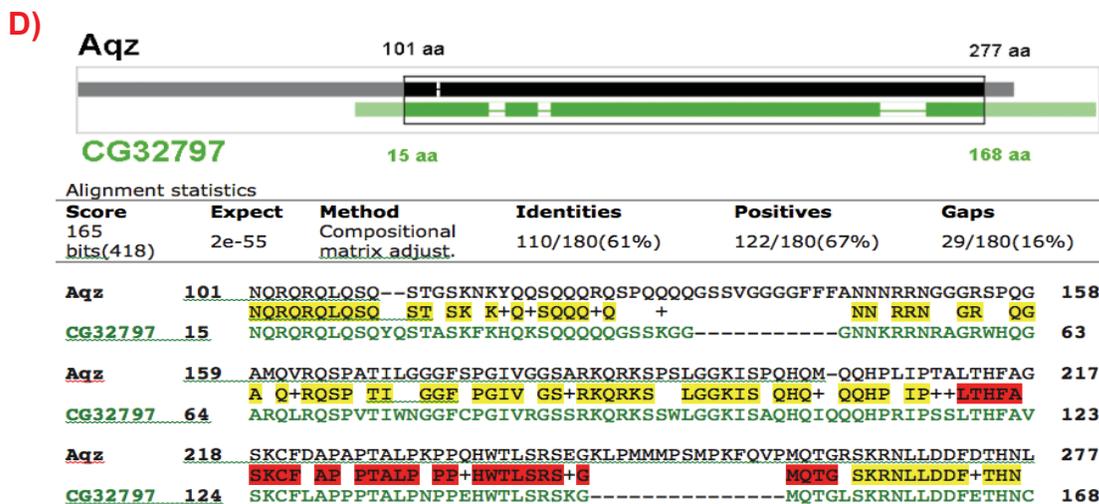


Figura 6. Análisis de la proteína Aqz según la base de datos FlyBase [23]. (A) Secuencia aminoacídica reportada para Aqz en *D. melanogaster*. En el recuadro azul se indican las

secuencias ricas en prolina conservadas en proteínas homólogas de *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. pseudoobscura*. Este dominio rico en prolina es característico de dominios de interacción proteína-proteína [27]. (B) Alineamiento de Aqz en distintas especies del género *Drosophila*. Las letras rojas indican aminoácidos en donde no hay identidad con respecto a Aqz de *D. melanogaster*. Aqz/Dm (Aqz en *D. melanogaster*), Aqz/Dsim (Aqz en *D. simulans*) y Aqz/Dp (Aqz en *D. pseudoobscura*). En azul se marcan las secuencias del dominio rico en prolina marcado en (A). En rojo sólido se marca la secuencia que se utilizó para generar anticuerpos policlonales en conejo (GGARKQRK). C) Aqz tiene un dominio rico en prolina (dominio PNRC) en el extremo carboxilo de la proteína que se presenta en proteínas receptoras nucleares coactivadoras de la transcripción. Este tipo de proteínas se presentan en invertebrados y vertebrados. Los números a la izquierda indican la posición del dominio dentro de las proteínas. D) Alineación de las secuencias de aminoácidos entre la proteína Aqz (negro) y CG32797 (verde) con el programa UniProt BLAST [28]. Parte superior, mapa de la alineación completa de las proteínas. Parte inferior, resumen de los resultados de la búsqueda de aminoácidos con mayor identidad, similitud y homología entre las dos proteínas. La identidad de ambas proteínas no solamente es alta en el dominio PNRC (aminoácidos en recuadro rojo), también presentan una alta identidad en diferentes posiciones de las secuencias (aminoácidos en recuadro amarillo).

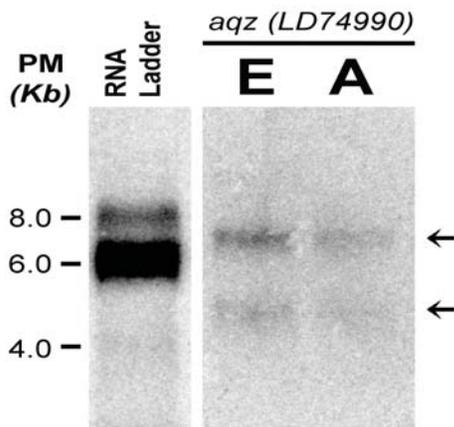


Figura 7. Expresión de *aqz* en el desarrollo de *D. melanogaster*. Transcritos de *aqz* en mRNA total de embriones (E) y adultos (A) silvestres detectados por análisis tipo Northern, utilizando como sonda el cDNA LD74990 de *aqz* (Fig. 5). Se observan dos transcritos de aproximadamente 5030 y 7530 nucleótidos, en ambas etapas (flechas negras). E: embriones y A: adultos. Imagen tomada de Mendoza-Ortiz, 2006 [26].

8. Mutantes de *aqz*.

Se reportaron dos alelos mutantes de *aqz* en el cepario de Indiana con la inserción de transposones (elementos P): las líneas *aqz*^{P1492} y *aqz*^{P14691}. Los fenotipos de embriones con estas mutaciones se muestran en la Fig. 7. En la línea *aqz*^{P1492} el elemento P se encuentra insertado en un intrón, mientras que en la línea *aqz*^{P14691} éste se encuentra interrumpiendo la zona reguladora (Fig.

14) [29]. En el laboratorio se generaron escisiones imprecisas a partir de estas dos inserciones y se generaron 27 nuevos alelos mutantes. Además, se cuenta con otra inserción de un elemento P que genera una proteína quimérica con GFP (GFP::Aqz): aqz^{GFP} (Fig. 14).

9. Clones de línea germinal de aqz^{P1492} .

De acuerdo con datos reportados anteriormente, clones de la línea germinal de aqz^{P1492} tienen un fenotipo de apertura dorsal y defectos en la involución de la cabeza [30]. Análisis en nuestro laboratorio han mostrado que mutantes cigóticos (con contribución materna) de los alelos aqz^{P1492} y aqz^{P14691} presentan los defectos embrionarios mencionados anteriormente para aqz^{P1492} pero adicionalmente también presentan defectos en la segmentación del embrión, como defectos de fusión y/o deleción de algunos segmentos abdominales (Fig. 8) [31].

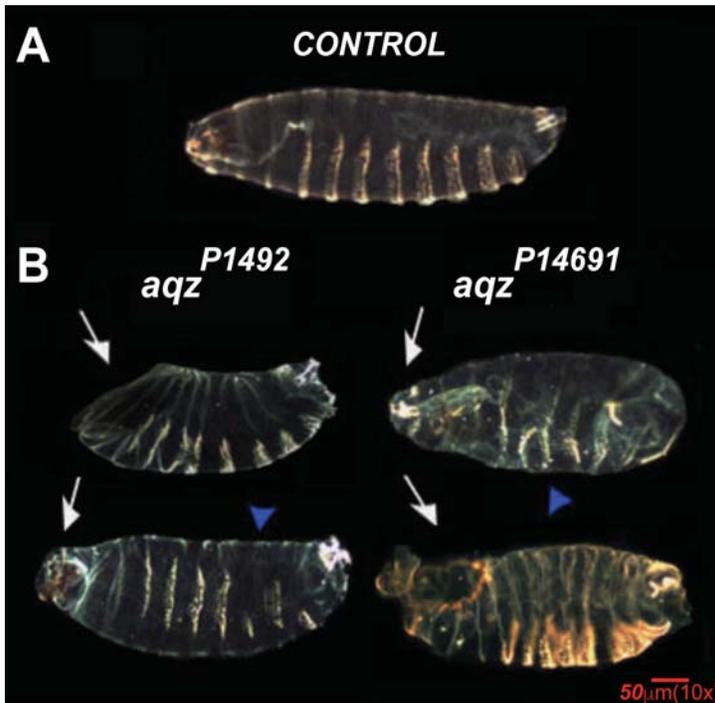


Figura 8. Fenotipos de embriones con alelos mutantes de aqz . (A) Cutícula de un embrión silvestre. Lado dorsal de los embriones hacia arriba y parte anterior hacia la izquierda. (B) Cutículas de embriones mutantes homocigotos para aqz^{P1492} (izquierda) y aqz^{P14691} (derecha). Se observan defectos en la involución de la cabeza (flecha) y fusión de segmentos abdominales (punta de flecha). Imagen tomada de Mendoza-Ortiz, 2004 [31].

10. Los embriones mutantes en *aqz* presentan defectos en la formación del SN.

En un estudio reciente se ha encontrado evidencia de que *aqz* interviene durante el desarrollo del SN (Fig. 9). En este trabajo se inyectaron embriones tempranos con un iRNA dirigido contra *aqz*. El fenotipo neural observado después de la inyección en embriones en etapas tempranas (blastodermo sincicial), consiste en es una deformación de las comisuras anteriores y posteriores, una distancia reducida entre las comisuras longitudinales de la cadena ganglionar ventral y una severa hipoplasia del SNP.

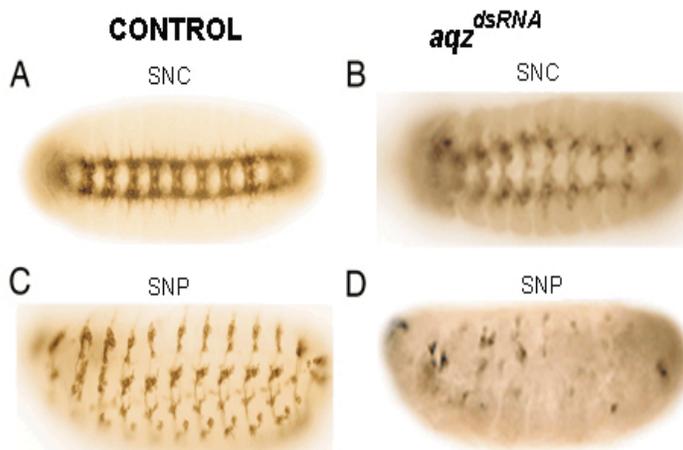


Figura 9. Evidencia de que *aqz* se requiere para el desarrollo del SN en *D. melanogaster*.

Patrón silvestre (A y C) y mutante (B y D) del SNC y SNP, en embriones silvestres y mutantes obtenidos por iRNA de *aqz*. Los embriones en A y B, fueron inmunoteñidos con el anticuerpo anti-BP102 (reconoce un epítipo carbohidratado perteneciente a

una proteína de membrana en el SNC). Vista ventral de A silvestre y B mutante. Los embriones en C y D fueron inmunoteñidos con el anticuerpo anti-22C10 (reconoce a la proteína de *Drosophila* llamada Futsch, es una proteína que se localiza en el citoesqueleto de las células del SNP), vista lateral de C silvestre y D mutante. SNC, sistema nervioso central y SNP, sistema nervioso periférico. Tomado de [25].

11. Investigación sobre el locus *aqz*.

Nosotros generamos nuevos alelos mutantes de *aqz* a partir de las líneas *aqz*^{P1492} y *aqz*^{P14691}. Estos alelos presentan fenotipos similares a los reportados, así como defectos adicionales de segmentación, hoyos ventrales en la cutícula (Fig. 10) y defectos más dramáticos en el SN (Fig. 11).

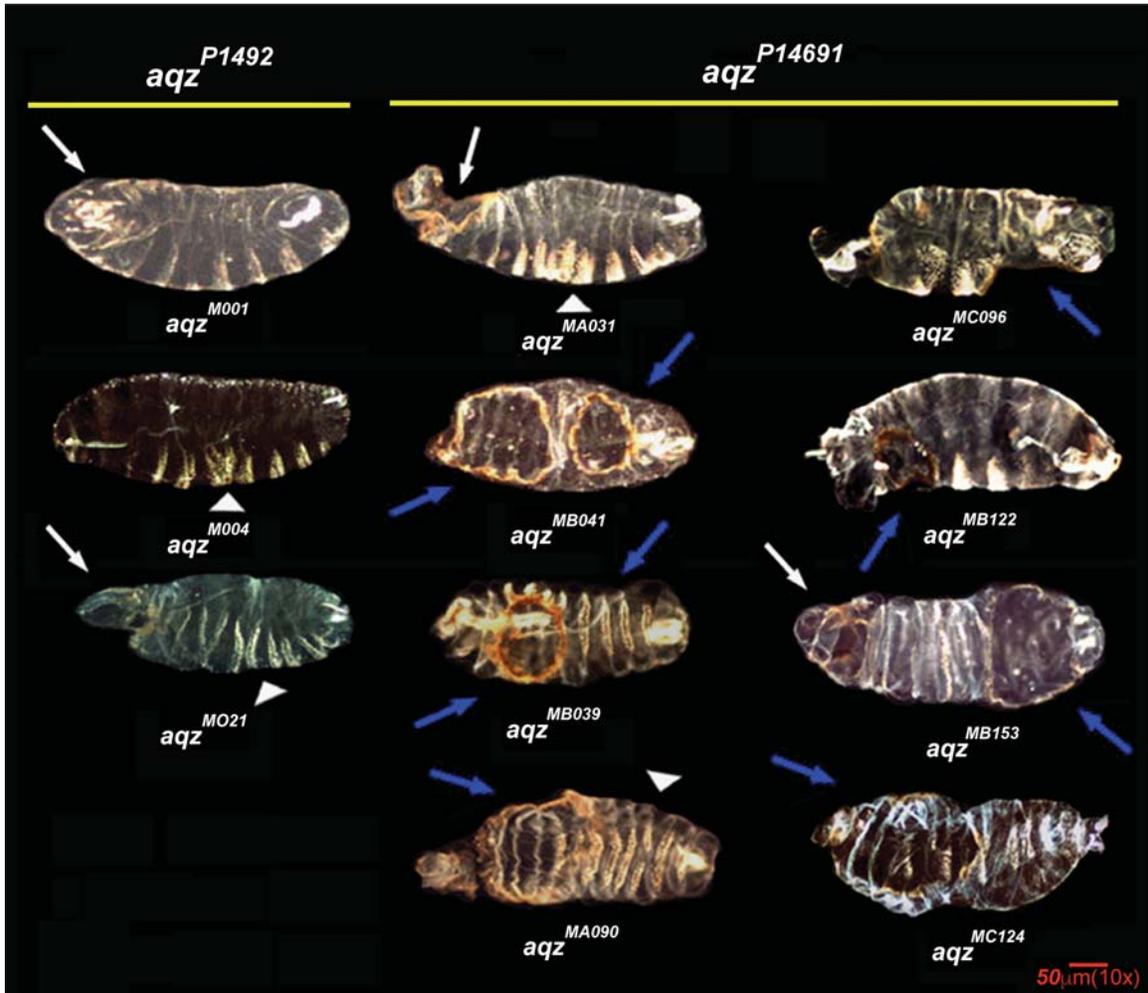


Figura 10. Los nuevos alelos mutantes de *aqz* presentan defectos en la cutícula. Estos embriones presentan el fenotipo esperado de apertura dorsal e involución de la cabeza (flecha blanca) pero también presentan defectos adicionales, como aperturas ventrales (flecha azul) y fusión de segmentos (punta de flecha). Las cutículas de los alelos mutantes *aqz*^{MB041}, *aqz*^{MB039}, *aqz*^{MA090}, *aqz*^{MB153} y *aqz*^{MC124} se encuentran orientadas en una vista ventral. Imagen tomada de Mendoza-Ortiz, 2006. [26]

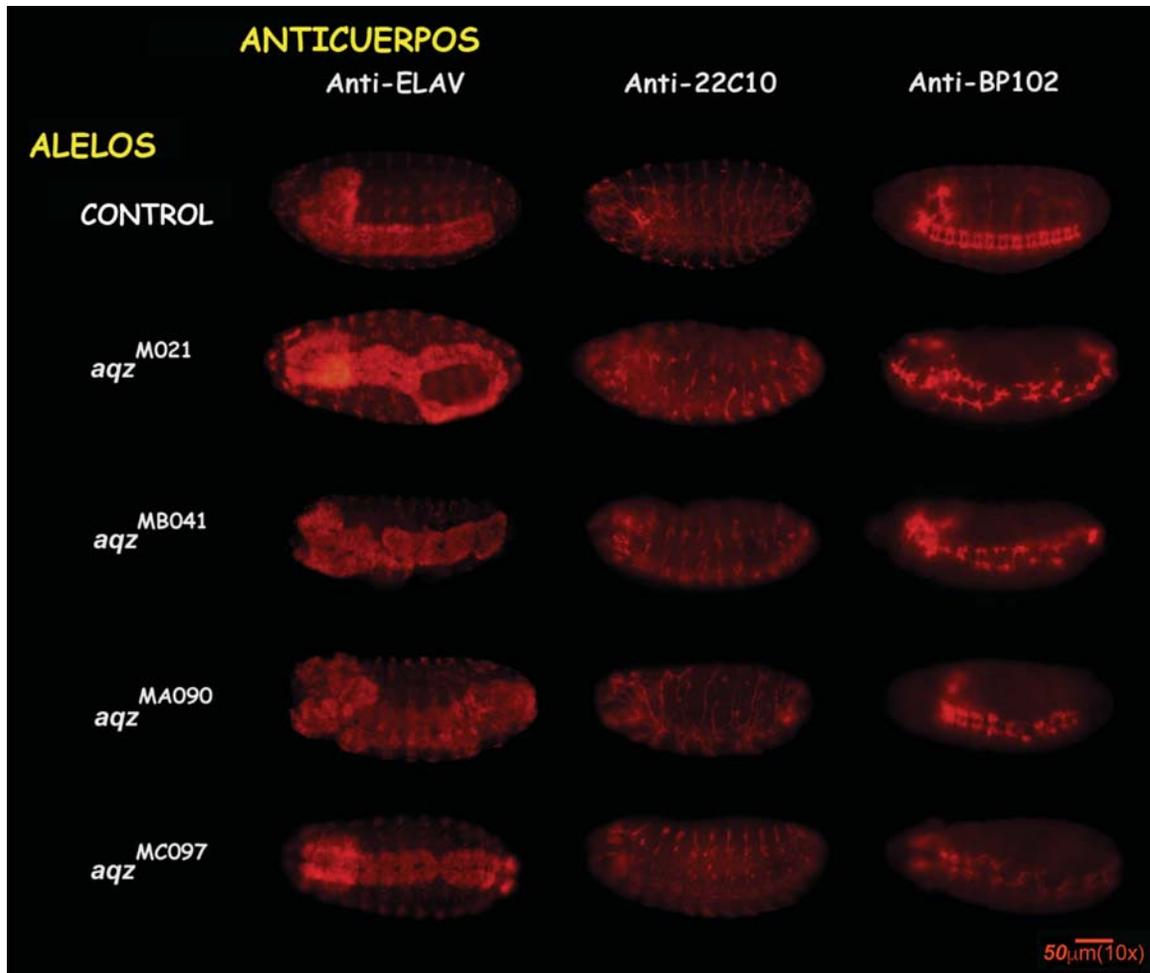


Figura 11. El desarrollo del SNC y SNP en embriones silvestres y mutantes para *aqz* de *D. melanogaster*. Estos embriones fueron inmunoteñidos con anti-Elav, anti-22C10, anti-BP102 (parte superior) que evidencian, respectivamente, el SN, el SNP y fibras y axones del SNC. Debajo de los controles se muestran embriones mutantes de *aqz* teñidos con los mismos anticuerpos. El fenotipo neural observado en estos embriones mutantes incluye defectos en la organización y desarrollo de las comisuras del SNC y una severa hipoplasia del SNP además de hiperplasias del SNC. Las imágenes muestran una vista ventral (anti-Elav) y lateral (anti-22C10 y anti-BP120) de los embriones, respectivamente.

12. La vía de señalización de Notch.

Durante la biosíntesis de Notch, esta proteína sufre un primer corte proteolítico por una furina en el aparato de Golgi. Ambas partes quedan unidas por puentes disulfuro. La proteína así procesada se transporta a la superficie celular para

formar un receptor maduro [32]. En la superficie celular, Notch se activa al interactuar con uno de sus ligandos que se expresan en células vecinas: Delta [3] ó bien Serrate/Jagged/LAG-2 [estos últimos corresponden a *Drosophila*, mamíferos y *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), respectivamente] [33].

La interacción Notch-Delta o Notch-ligando induce un corte en el dominio extracelular de Notch mediado por la proteína Kuzbanian (Kuz), una enzima metaloproteasa extracelular perteneciente a la familia ADAM/TACE (desintegrina y metalopeptidasa/factor de necrosis tumoral convertasa). Este segundo corte permite que el fragmento de Notch aún atado a la membrana, sufra otro corte en la parte intracelular por un complejo de proteasas llamado γ -secretasa. Este complejo contiene presenilinas como componente catalítico. La célula señalizadora endocita la parte extracelular de Notch unida a su ligando.

Así, el dominio intracelular de Notch (NICD) es finalmente liberado y se transloca al núcleo donde se asocia con el factor de transcripción CSL [nombrado por CF1 (mamíferos), Su(H) (*D. melanogaster*) y LAG-1 (*C. elegans*)] y con el coactivador Mastermind (Mam en *Drosophila* y mamíferos; LAG-3 en *C. elegans*). Juntos estos tres regulan la expresión de genes [34].

El complejo ternario NICD-CLS-Mam en el núcleo induce la acetilación de la cromatina y el incremento de la transcripción de los genes de respuesta a Notch (por ejemplo, los genes de la familia *Enhancer of split*) [33]; [35]. Cuando la vía no está activada y el dominio intracelular de Notch no está en el núcleo, CSL recluta co-represores y actúa como un represor de los genes de respuesta de la vía [33].

Cuando se bloquea la vía de Notch, el proceso de inhibición lateral no se lleva a cabo y se forman células precursoras en exceso (fenotipo neurogénico), lo que conlleva a una hiperplasia del tejido neural con una pérdida paralela de la epidermis [35]. Los fenotipos embrionarios de los mutantes de *aqz* se asemejan en mucho a los fenotipos neurogénicos de mutaciones en los elementos de la vía de señalización de Notch, durante la neurogénesis temprana.

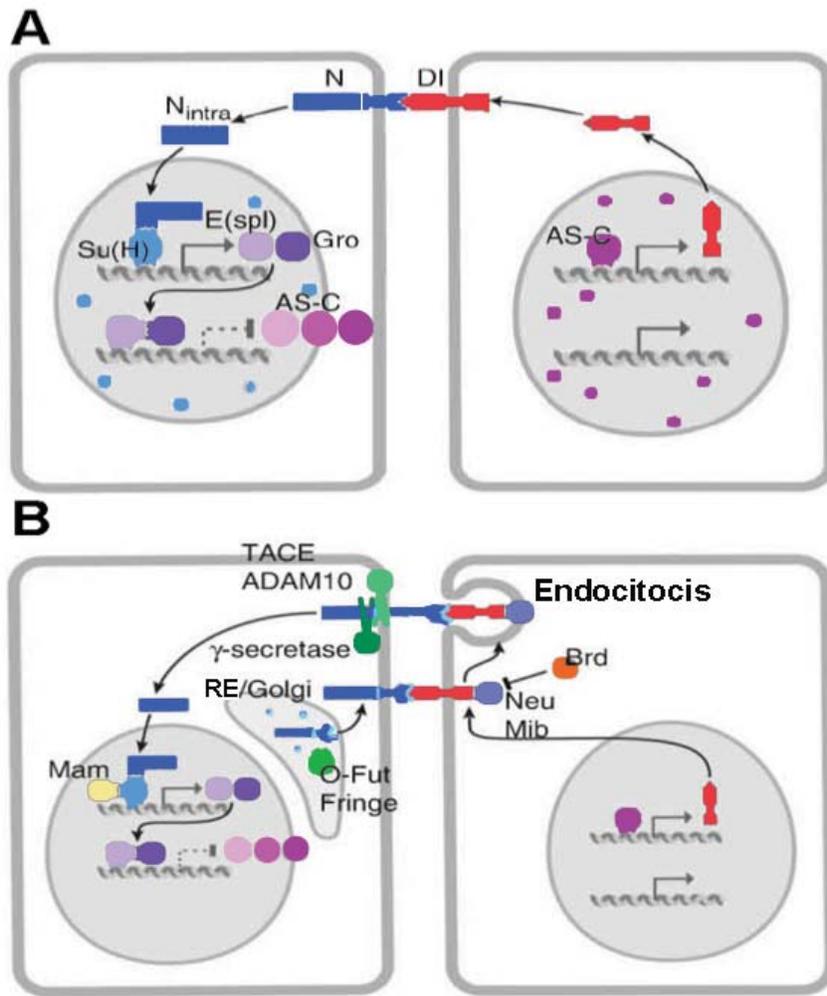


Figura 12. Vía de señalización de Notch. (A) Representación de los principales componentes de la vía durante el proceso de inhibición lateral. (B) Moduladores de la vía. N (Notch), N_{intra} (Notch intracelular), DI (Delta), Su(H) (Suppressor of hairless), E(spl) (Enhancer of split), Gro (Groucho), AS-C (Achaete-scute complex), TACE-ADAM10 (Metaloproteinasas), Mam (Mastermind), O-Fut (Fucusyltransferase-Dead), Brd (Bearded), Neu (Neuralized) y Mib (Mind bomb). RE: retículo endoplásmico y Golgi: Aparato de Golgi. Imagen modificada de Hartenstein, 2013 [36]

13. Función de la Ferritina en el desarrollo embrionario de *Drosophila*.

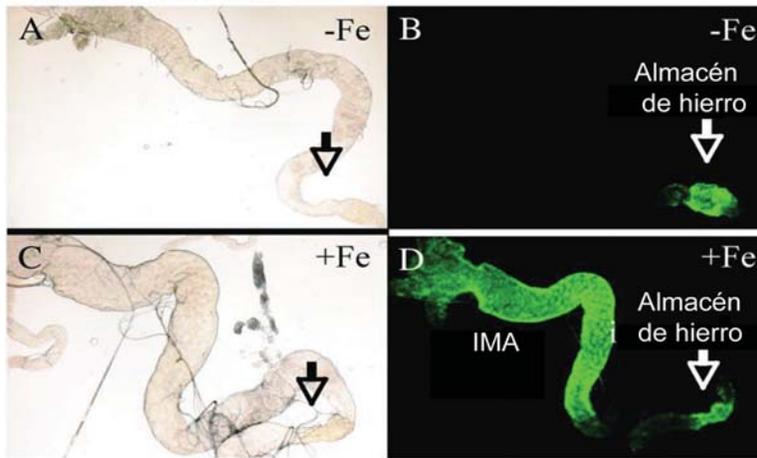
El hierro es el metal de transición más abundante en la tierra. A nivel celular y sistémico se encuentra comúnmente adjunto a los sitios activos de proteínas en la forma de grupo hemo- o en la agrupación hierro-azufre [37];[38]. Los niveles celulares y sistémicos de hierro son regulados de manera estricta para asegurar su biodisponibilidad y proteger a la célula u organismo de los peligros de la sobrecarga de este metal. Existen mecanismos que detectan los niveles de hierro libre, para reclutar y almacenar el número de moléculas en exceso [39]. La Ferritina es un complejo proteico compuesto por 24 subunidades. 12 de ellas conforman la cadena ligera (L-Chain, del inglés "Light Chain") y las otras 12 conforman la cadena pesada (H-Chain, del inglés "Heavy Chain"). Este complejo actúa como el primer mecanismo de almacenamiento de hierro [40]. La subunidad o cadena pesada H-Chain contiene un centro activo ferroxidasa, que permite al heteropolímero oxidar el hierro ferroso soluble, mientras que la cadena ligera L-Chain proporciona los centros de nucleación para la mineralización de hierro [41]. La ferritina está altamente conservada en la mayoría de los seres vivos, dado que se encuentra en bacterias, plantas, insectos y animales. Las mutaciones en la cadena ligera de la ferritina humana generan neurodegeneración, lo que provoca una condición descrita como neuroferritinopatía [42]. El descubrimiento en ratones de los receptores de ferritina Scara5 [43] y Tim2 [44] ha llevado a la idea de que la ferritina podría estar involucrada en el transporte de hierro [45], aunque esta idea sigue siendo causa de controversia [46]. El genoma de *Drosophila* contiene dos genes que codifican para las subunidades que componen la estructura principal de la ferritina: *ferritina 1* homólogo de cadena pesada (*Fer1HCH*) y *ferritina 2* homólogo de cadena ligera (*Fer2LCH*) [47]; [48]. Las dos subunidades se expresan predominantemente en el intestino medio y están también presentes en abundancia en la hemolinfa de la mosca, donde la ferritina puede transportar el hierro para las necesidades nutricionales de los tejidos de *Drosophila* [48]; [49]. La mutación de cualquiera de los genes que codifican para las dos subunidades (*Fer1HCH* o *Fer2LCH*), así como la interrupción de la ferroxidasa

de la *Fer1HCH*, da como resultado la detención del desarrollo y letalidad embrionaria en la mosca de la fruta. Los fenotipos específicos de los mutantes de ferritina, así como su expresión en esta etapa, no se han estudiado hasta la fecha.

Para caracterizar la función de la ferritina en el desarrollo embrionario, analizamos los fenotipos embrionarios que presentan organismos mutantes para los genes *Fer1HCH* y *Fer2LCH*. En especial, caracterizamos aquellos fenotipos que involucran defectos en el desarrollo y estabilidad del tejido nervioso y epidermis. Encontramos que las ferritinas tienen defectos mutantes en el sistema nervioso muy parecidos a los defectos mutantes de *aqz*.

Además, para establecer el patrón de expresión de la proteína y evaluar el tráfico de ferritina en el intestino medio del embrión (el órgano principal de almacenamiento de hierro en el insecto), se hizo uso de una nueva línea mutante *Fer1HCH^{G188}* (GFP::*Fer1HCH*). Esta línea expresa GFP en el patrón de la subunidad pesada. Estos alelos se han caracterizado anteriormente y se ha demostrado que la subunidad GFP::*Fer1HCH* se incorpora en la ferritina. Esta cepa se utilizó para estudiar el ensamblaje y el tráfico de la ferritina en el intestino medio de la larva, el órgano principal que sirve como almacén de hierro en el insecto [49].

1. GFP::Ferritina



2. Almacén intracelular del hierro

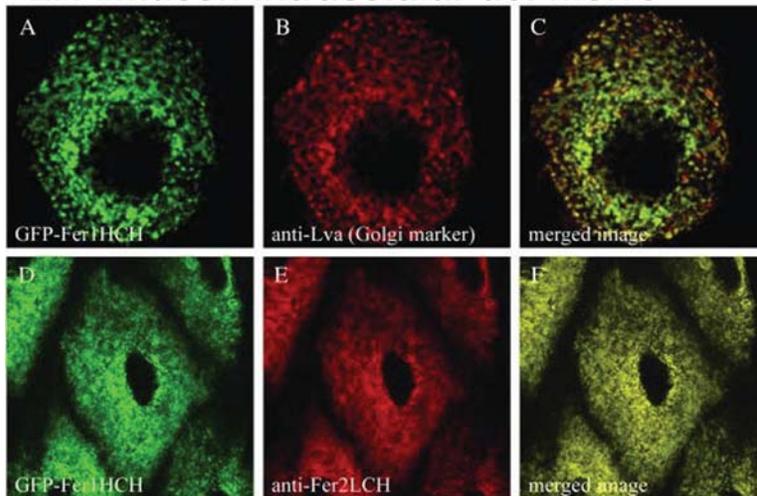


Figura 13. Expresión de la GFP::Ferritina en el intestino de las larvas.

Imágenes del intestino medio disecado de larvas del alelo *Fer1HCH^{G188}* (1A-1D). Se identificó la región en el intestino medio de la larva donde se ubica el almacén de hierro observando a la GFP::Ferritina mediante

microscopía de fluorescencia (1A-B, flechas). Intestino medio disecado de las larvas del mismo genotipo, cultivadas en un medio que contienen de 1 mM de citrato de amonio férrico (1C-D). La abundancia de hierro en el alimento generó acumulación de ferritina en el intestino medio anterior. La Ferritina se acumula en el aparato de

Golgi de las células del intestino medio (2A-2F). Imagen de microscopía confocal de una célula individual en el almacén intracelular de un intestino medio disecado de una larva heterocigota *Fer1HCH^{G188}* (2A). La misma célula se tiñó con anti-Lavalamp, una proteína asociada al aparato de Golgi (2B). En amarillo se observa que el aparato de Golgi es la ubicación principal de ferritina en las células (2C). La siguiente imagen muestra una sola célula que expresa GFP-Fer1HCH en el almacén intracelular de hierro (2D), teñida con anti-Fer2LCH (2E); se observa la colocalización de las cadenas de ferritina en el aparato de Golgi (2F). Imágenes tomadas de Missirlis, 2007 [49].

Hipótesis.

Los genes *aqz* y *ferritina* se requieren durante la embriogénesis para la diferenciación de tejidos derivados del ectodermo en *D. melanogaster* y la formación del SN.

Objetivos generales.

Establecer la estructura molecular del *locus* de *aqz*.

Estudiar la función de *aqz* en la diferenciación del ectodermo.

Establecer la función de la ferritina en el desarrollo del sistema nervioso embrionario.

Objetivos particulares.

- Establecer la estructura primaria de la proteína y buscar homologías con otras proteínas.
- Analizar el patrón de expresión de la proteína Aqz y GFP::*Aqz* en el desarrollo embrionario.
- Observar las interacciones genéticas de *aqz* con genes de la vía de Notch (dado que esta vía se requiere para la diferenciación del ectodermo).
- Observar la alteración de la polarización del epitelio en etapas tempranas de la embriogénesis con marcadores moleculares.
- Caracterizar los fenotipos embrionarios mutantes de la ferritina en la epidermis y sistema nervioso mediante inmunofluorescencia con marcadores específicos.
- Determinar la o las consecuencias que genera la falta de ferritina en las células que conforman el tejido nervioso durante la embriogénesis.

Material y Métodos.

1. Moscas.

Las moscas fueron cultivadas en condiciones estándar (25°C, 12:12 ciclos luz: oscuridad y 50% de humedad) en viales con comida estándar (levadura-agar-grenetina- azúcar sin refinar-agua). Las líneas *Oregon R* y *yw* fueron utilizadas como control. El alelo aqz^{P14691} ($y^1 w^{67c23}; P\{SUPor-P\}KG08159 ry^{506}$) es del cepario de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC); el alelo aqz^{GFP} ($P\{PTT-GB\}CG9821^{CB03335}$) es de la Colección de la Universidad de Yale, EE.UU. Este alelo fue generado por la técnica “fly trap” y tiene una inserción letal de un elemento P que genera proteínas quiméricas GFP::Aqz (La proteína GFP se fusiona con el extremo 5' de Aqz) [50]. Los nuevos alelos de *aqz* fueron generados por escisión del elemento P en aqz^{P14691} : aqz^{MB041} , aqz^{MA090} y aqz^{MB039} . Todos los alelos derivados de la escisión son letales. $aqz^{RESCATE}$ fue generado por transgénesis mediante el empleo del vector P[ACMAN] CH322-25015. El vector CH322-25015 tiene insertado un fragmento genómico de aproximadamente 19 Kb que corresponde a la región de la base 8805893 a 8825277 en el tercer cromosoma de la mosca de la fruta. Este fragmento incluye el *locus* completo de *aqz* (CG9821) y otros *loci*: CG9837 y *IscU* (CG9836, este último codifica para una proteína de unión a un grupo químico hierro-azufre de otras proteínas; todos los mutantes mueren al final de la etapa de pupa), CG8369 (codifica para una proteína que contiene un dominio aun no descrito, Kazal) y CR43130 (que expresa a un RNA no codificante). Todas estas secuencias están parcialmente superpuestas con CG9821, pero en la dirección opuesta. La construcción genómica del rescate se insertó en el brazo derecho del segundo cromosoma (2R) en la región 53B2. DI^{RF} ($DI^{RF}/TM6C, Sb^1 Tb^1$) es un alelo mutante de *Delta* (gen que codifica para el ligando de la vía de Notch) sensible a temperatura. Este alelo fue recombinado con el cromosoma de aqz^{GFP} mediante técnicas genéticas estándar. Kuz^{e29-4} (Kuz^{e29-4}/CyO) es un alelo mutante de *Kuzbanian* (gen que codifica para una proteína con actividad de metaloproteasa involucrada en la vía de Notch). DI^{RF} y Kuz^{e29-4} se utilizaron para pruebas de interacciones genéticas de *aqz* con la vía de señalización de Notch.

Para realizar ensayos de complementación, se utilizaron tres diferentes deficiencias que descubren el *locus aqz*: *Df(3R)Exel6150* (w^{1118} ; *Df(3R)Exel6150*, *P{XP-U}Exel6150/TM6B*, *Tb¹*); *Df(3R)BSC478* (w^{1118} ; *Df(3R)BSC478/TM6C*, *Sb¹*, *cu¹*), y *Df(3R)BSC506* (w^{1118} ; *Df(3R)BSC506/TM6C*, *Sb¹*, *cu¹*).

En el caso del proyecto de la ferritina, se utilizaron alelos con inserción de elemento P: *Fer1HCH⁴⁵¹* (ry^{506} *P{PZ}Fer1HCH⁰⁰⁴⁵¹/TM3*, ry^{RK} *Sb¹ Ser¹*) y *Fer2LCH³⁵* (ry^{506} *P{PZ}Fer2LCH⁰⁰⁰³⁵/TM3*, ry^{RK} *Sb¹ Ser¹*). Ambos se obtuvieron del cepario de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC). El alelo *Fer2LCH^{A17}* se generó a partir de una escisión imprecisa del elemento P en el alelo *Fer2LCH^{EP1059}* (ry^{506} *Fer2LCH^{EP1059}/TM3*, ry^{RK} *Sb¹ Ser¹*). La deficiencia *Df(3R)Fer* es una deleción de 2.2 Kb que interrumpe específicamente a las dos subunidades de la ferritina (Fe1HCH y Fer2LCH) y fue un regalo de Alexis Gambis, Bertrand Mollereau, y Hermann Steller [51]. Para generar los clones de la línea germinal, *Fer1HCH⁴⁵¹* y *Fer2LCH³⁵* se recombinaron bajo un cromosoma que contiene el sistema de recombinación *FRT82* descrita por Xu y Rubin, 1993 [52]. El alelo *Fer1HCH^{G188}* (*P{PTT-un1}Fer1HCH^{G00188}*) tiene una inserción letal de un elemento P que genera la proteína quimérica GFP::Fer1HCH [49]; [50]. *Sec23^{j13c8}* (w^{1118} ; *P{lacW}Sec23^{j13C8}*, *l(3)j13C8^{j13C8}/TM3*, *P{ftz/lacC}SC1*, ry^{RK} *Sb¹ Ser¹*) es un alelo mutante que presenta la inserción del elemento P dentro de la secuencia 5' UTR de *Sec23* [53]. El alelo *Cg-Gal4* (w^{1118} ; *P{Cg-GAL4.A}2*) se utilizó para dirigir la expresión en los hemocitos, *Drm-Gal4* (w^{1118} ; *P{drm-GAL4.7.1}1.1/TM3*, *Sb¹*) para dirigir la expresión en el intestino embrionario y células dispersas alrededor de la epidermis, *FB-Gal4* (*P{GAL4}fat*) para dirigir la expresión al cuerpo graso [54]; [55]; [56].

Para los dos *loci*, *aaquetzalli* y *ferritina*, los stocks de moscas recombinantes o dobles balanceadas se generaron siguiendo los esquemas de cruza convencionales.

2.Hibridación *in situ* en embriones.

La hibridación *in situ* de embriones se realizó siguiendo el protocolo de Tautz y Pfeife, 1989 [57], con algunas modificaciones para la detección de la fluorescencia. En pocas palabras, los embriones completos se fijaron con formaldehído y posteriormente se hibridaron en solución de hibridación, con sondas de RNA marcado con digoxigenina durante toda la noche a 55°C. Las sondas de RNA (generadas a partir del cDNA *LD47990*, *aqz* 5', que corresponde a la región 5' de *aqz* y a partir del cDNA *LD18978*, *aqz* 3' que corresponde a la región 3' de *aqz*) se sintetizaron utilizando el kit de ROCHE para etiquetado del RNA con digoxigenina siguiendo el protocolo del proveedor (Roche, Suiza). Los embriones fijados e hibridados se dividieron en dos grupos. En el primer grupo los embriones se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:2000 durante 1 h 45 min a temperatura ambiente (Anti-Dig AP), se lavaron y se incubaron con la solución de revelado que contiene NBT (nitro azul tetrazolio, Roche) y BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato, Roche Diagnostics). El segundo grupo de embriones se incubó con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con HRP en dilución 1: 2000 durante 1 h 45 min a temperatura ambiente, se lavó y se incubó con solución de Tiramidina con el fluoróforo Cy3 en dilución 1:10 durante 45 min. Para esto se utilizó el sistema de amplificación Tiramidina de Perkin Elmer (TSA, Perkin Elmer, EE.UU.), y los embriones se montaron en Vectashield (vector Laboratories, USA).

3.Evaluación del RNA total mediante la técnica Northern blot

El RNA total se aisló con Trizol, a partir de embriones de 8-12 h, larvas de 2do y 3er estadio, pupas y adultos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Gibco/BRL, EE.UU.). La transferencia del Northern se realizó de acuerdo a procedimientos estándar [58]. Las sondas de DNA fueron generadas a partir del cDNA *LD47990* [59];[60], que incluye la región 5' de *aqz* y a partir del cDNA *LD18978*, que incluye la región 3' de *aqz*. Ambas sondas fueron marcadas con α -³²P deoxicidina 5'-trifosfato, de acuerdo a Feinberg y Vogelstein, 1984

[61,62].

4. Generación de anticuerpos contra Aqz.

Un antisuero policlonal de conejo fue generado contra el péptido INT-Aqz (GGSARKQRK), que representa la parte intermedia de la proteína Aqz (entre el aminoácido 180 y el aminoácido 189, Fig. 6B). Las inmunoglobulinas G (IgG) se purificaron por cromatografía de afinidad a partir de suero inmune (New England péptido, MA, EE.UU.).

5. Evaluación de proteínas totales solubles mediante la técnica de Western blot

El homogenado de embriones y extracción de la proteína total soluble se realizó siguiendo el protocolo de Wodarz [63]. Las proteínas se separaron en geles desnaturizantes de acrilamida al 10 ó 15% (SDS-PAGE). Una vez separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos primarios de conejo anti-Aqz (1: 500), el anticuerpo de conejo anti-GFP (1:5000, SC-8334, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), o el anticuerpo de ratón anti- β -tubulina (E7-S, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, EE.UU.). Cuando se utilizaron los anticuerpos primarios anti-GFP y anti- β -tubulina, se realizó una pre-absorción antes de su uso mediante la incubación de anticuerpo primario diluido y embriones control, en la solución de incubación durante toda la noche. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina (AP) generados en cabra (anti-conejo 1: 1000 y anti-ratón 1: 5000 de Zymed). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Se utilizó solución de sustrato NBT/BCIP (Roche Diagnostics) para la detección de AP.

6. Inmunohistoquímica

Se utilizó el protocolo de tinción de embriones establecido por Karr y Alberts (1986) [64], excepto para los embriones aqz^{GFP} . Los embriones aqz^{GFP} se lavaron en metanol sólo una vez, y se rehidrataron inmediatamente (esto evita el

daño de la señal fluorescente de GFP). Para los anticuerpos primarios se utilizó un anticuerpo de rata anti-Deadpan (1: 2, donado por Cheng-Yu Lee), de conejo anti-Aqz (1:500 obtenido en este trabajo) y de conejo anti-GFP (1:100, SC-8334, Santa Cruz Biotechnology). Antes de su uso los anticuerpos se pre-absorbieron con embriones control en solución de incubación durante toda la noche. También se utilizaron los anticuerpos primarios elaborados por Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, EE.UU.: anticuerpo de rata anti-Elav (7E8A10, 1:250), de rata anti-DE-cadherina (DCAD2, 1:10), monoclonal de ratón anti-FASIII (7G10, 1:100), monoclonal de ratón anti-Achaete (1:10), monoclonal de ratón anti-EVE (3C10, 1:10), monoclonal de ratón anti-Coracle (C615.16, 1:250), monoclonal de ratón anti-22C10 (1: 200), monoclonal de ratón anti-BP102 (1:200), monoclonal de ratón anti-Repo (8D12, 1:200), monoclonal de ratón anti-DI (C594.9B, 1:100), monoclonal de ratón anti-Crumbs (CQ4, 1:100), monoclonal de ratón anti-Dlg (4F3, 1:3) y anti-activated Caspase 3 (1:100, Cell Signaling). Los anticuerpos primarios se incubaron con embriones fijados durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los embriones se lavaron 4 veces durante 20 min cada lavado, utilizando 0.3% de Tritón X-100 en PBS. Las señales para los marcadores anti-Deadpan, anti-Aqz, anti-EVE, anti-DE-Cadherina, anti-Delta y anti-GFP fueron amplificadas utilizando anticuerpos secundarios conjugados con biotina, en combinación con el sistema Vector Elite ABC (Vector Laboratories, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia (1:1000, ZYMED) y conjugados con biotina (1:500, Santa Cruz Biotechnology) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Para los embriones que se incubaron con anticuerpos conjugados con biotina, se utilizó el sistema de amplificación de la señal (dye-labeled tyramidine derivative system, TSA). Al final, después de lavar 4 veces con 0.3% Tritón X-100 en PBS, los embriones marcados con fluorescencia se montaron en Vectashield. Los embriones mutantes homocigotos fueron seleccionados por la falta del cromosoma balanceador *TM3*, *GFP* ó *TM3, LacZ*.

7. Preparación de cutículas

Para la visualización y análisis de cutículas se siguió el protocolo descrito por Nüsslein-Volhard [29]. Los embriones y larvas de 1er estadio se recolectaron 24 horas después de la puesta de huevos. Posteriormente se decorionaron en una solución de 50% hipoclorito de sodio durante 5 min, se enjuagaron en agua destilada y se colocan en un tubo Eppendorf que contenía 50% de heptano y 50% de metanol. Después este tubo se agitó vigorosamente durante 2 min. La fase superior se retiró y los dos, embriones y larvas, se lavaron 3 veces con metanol al 100%. Los embriones y larvas fueron rehidratados con PBT (PBS + 0,3% de Tritón X-100). Una vez rehidratados, se retiraron con cuidado del tubo y se pusieron sobre un portaobjetos de vidrio. Por último, se montaron con medio de montaje (Medio de Hoyer o PVA) y se cubrieron con un portaobjetos. Se incubaron un día en un plato caliente para que el medio de Hoyer digiriera los tejidos blandos. Las cutículas se visualizaron mediante microscopía de campo oscuro.

8. Secuenciación

La secuenciación automática se llevó a cabo utilizando un secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para la reconstrucción del locus *aqz*, se secuenciaron parcialmente los cDNA: *SD19655*, *RE74095*, y totalmente: *LD02060*. Todas estas cDNAs fueron obtenidos de la colección de cDNAs de Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI), BacPac Resources. Para el análisis de la lesión molecular en *aqz*^{MB041}, este alelo se balanceo con el cromosoma *TM3*, *Ser*, *Sb*, *GFP*, para seleccionar los embriones homocigotos mutantes por la falta de expresión de GFP. Se elaboró un homogenado con ellos, y se utilizó posteriormente para la amplificación por PCR. Para la amplificación, se utilizaron los siguientes primers o cebadores AqzA (TACACCACCGTCTATTGCG) y AqzB (CCCCATTGTGTCAGATTTCTT) que delimitan la región promotora *aqz*. Los productos amplificados resultantes se clonaron en el vector pGEMT (Promega, EE.UU.), y se secuenciaron completamente. Se secuenciaron tres clones mutantes independientes, y se

confirmó la mutación en la región promotora de aqz^{MB041} .

9. Análisis de los fenotipos neurogénicos e interacción de Aqz y la vía de señalización de Notch.

Se eligieron a aqz^{MB041} (“ganancia de función”) y aqz^{GFP} (“pérdida de función”) como los alelos mutantes de aqz para llevar a cabo estas interacciones genéticas, y a los alelos mutantes letales Dl^{RF} (alelo de *Delta*, receptor de la vía de Notch) y Kuz^{e29-4} (alelo de *Kuzbanian*, proteasa que corta el dominio extracelular de Notch) como componentes de la vía de señalización de Notch. Los alelos mutantes individuales o recombinados fueron balanceados en el tercer cromosoma, sobre un cromosoma balanceador que expresa GFP en el patrón de expresión de la Actina (*TM3, Sb, Ser, Act::GFP*). Esta técnica se utilizó para separar los embriones heterocigotos de los homocigotos en una puesta. *Act::GFP* y *GFP::Aqz* marcan de manera diferente, por lo que los patrones de expresión de las dos moléculas GFP se pueden diferenciar fácilmente. A las líneas originales y a las cruzas correspondientes para establecer fondos genéticos sensibilizados, con una o dos copias del alelo a evaluar, se les permitió ovopositar en placas de agar, para posteriormente recolectar los embriones. Para evaluar los fenotipos neurogénicos de manera rigurosa, se generaron dos grupos de acuerdo a la temperatura de incubación: 1) embriones incubados a 24-25°C y 2) embriones incubados a 28-29°C. Las incubaciones se sincronizaron temporalmente de tal manera que los embriones estuvieran en la etapa 14-15 (finales de la neurogénesis) para estudiar los fenotipos neurogénicos. Después de recolectar, clasificar y contar a los embriones, estos se fijaron y posteriormente se tiñeron para evaluar el número de embriones con fenotipos neurogénicos, usando anti-Elav (SN, para evaluar la hiperplasia del tejido) y anti-Coracle (epidermis, para evaluar la pérdida del tejido). El porcentaje de embriones control (WT, no hay defectos en el sistema nervioso y epidermis) o fenotipo "neurogénico" se calculó usando la siguiente fórmula: % de WT ó % embriones neurogénicos = WT ó embriones neurogénicos / (Total de embriones homocigotos contados * 100). Se utilizó la prueba estadística de Fisher para

evaluar la diferencias significativas indicadas. Para cada experimento de interacción, se registraron al menos 500 embriones, excepto embriones del alelo Dl^{RF} en 24-25°C, donde sólo se utilizaron 275 embriones.

10. Rescate del gen *aqz*

La construcción genómica utilizada para el experimento del rescate genómico, incluye la secuencia completa del gen *aqz* y se encuentra insertada en el segundo cromosoma en la línea $aqz^{RESCATE}$. Como *aqz* se encuentra en el 3er cromosoma, se establecieron líneas $aqz^{RESCATE};aqz^{MUTANTE}$ y controles, doblemente balanceadas con el balanceador que incluye el 2do y 3er cromosoma fusionados (T(2;3)CyO-TM3,Ser,Sb,P{UAS-GFP.Y}TR2.). Los homocigotos mutantes de *aqz*, se expusieron a una o dos copias de la construcción $aqz^{RESCATE}$. Para evaluar el grado de rescate, se establecieron dos criterios: 1) Número de embriones con fenotipo neurogénico, para esto se recurrió a la tinción de embriones para analizar fenotipos neurogénicos (anti-Elav, para evaluar SN y anti-Coracle, para evaluar epidermis), y 2) la viabilidad de adultos. Para la viabilidad de adultos, los embriones mutantes homocigotos y embriones control, con y sin la construcción del rescate, se recolectaron de la puesta de embriones correspondiente, se les permitió que se desarrollaran en condiciones estándar y se registró el número de los adultos eclosionados. Se utilizó la prueba estadística de Fisher para evaluar las diferencias significativas indicadas.

11. Dieta con hierro.

Las moscas se cultivaron durante 3 generaciones sucesivas en medio estándar como base (descrito anteriormente), y se le añadieron 200 μ M de la sal del ácido disulfónico batofenantrolina (SIGMA # B1375) denominada BPS en el texto o con 1 mM de citrato de amonio férrico (SIGMA # F5859), dieta que se denominada FAC en el texto.

12. Procesamiento y adquisición de imágenes.

Las imágenes de los embriones se obtuvieron utilizando microscopía de luz, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSM). Las imágenes de cutículas e inmunofluorescencia de embriones completos se obtuvieron con una cámara digital (CoolSnap, Photometrics, EE.UU.) acoplada a un microscopio Nikon E600 Eclipse con el objetivo Plan-Fluor 20X/0.50 NA y una lámpara de mercurio Nikon (Nikon Super High Pressure Mercury Lamp). Las secciones confocales de los embriones se hicieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta con los objetivos Plan-Neofluar 25x/0.8 NA y Plan-FLUAR 100X/1.45 NA (Carl Zeiss MicroImaging, Inc), o con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 con los objetivos Plan-APOCHROMAT 25X/0.8 NA y Plan-APOCHROMAT 63X/1.40 NA (Carl Zeiss MicroImaging, Inc) a 18°C. Para el procesamiento de las imágenes de cutículas y fluorescencia, se utilizó el programa de procesamiento de imágenes iVision 4.0.12 (BioVision Technologies, 2008). Para el procesamiento de secciones confocales utilizó el programa Image Browser Software (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Todas las imágenes capturadas se procesaron y se formatearon utilizando el programa Adobe Photoshop. La acumulación de GFP::Fer1HCH en los alelos mutantes de *Sec23* se evaluó utilizando la herramienta de medición de intensidad de señal o fluorescencia del programa ImageJ (fire LUT).

Resultados

1. Caracterización molecular del *locus aqz*.

1.1 Análisis de los cDNAs que abarcan la región genómica de *aqz* (CG9821).

El análisis de la información en Flybase de la región genómica *85B2* del tercer cromosoma de *D. melanogaster*, muestra que sobre de *aqz* se localizan fragmentos de DNA complementario (cDNAs) y Expressed Sequence Tag (ESTs ó fragmentos transcritos parcialmente secuenciados). Hay un gran número de ESTs que corresponden a la región de *aqz* y que nos dan una idea parcial de la extensión del *locus* (Fig. 14). En este trabajo se secuenciaron varios de estos ESTs (Tabla 1) y las secuencias completas se alinearon con las secuencias de los cDNA descritos en Flybase [65]. Esto último se realizó con el objetivo de obtener secuencias consenso de cDNA para examinar la exactitud de la predicción en tamaño de los transcritos *aqz* que están reportados.

Después del análisis de las secuencias y alineación de las mismas, los resultados arrojaron varios cDNA reconstruidos teóricamente similares en tamaño y estructura (número de intrones y exones) a los transcritos predichos para *aqz* en Flybase. Los cuatro transcritos predichos (*aqz-A*, *aqz-B*, *aqz-C* y *aqz-D*) se componen de dos exones que varían en tamaño, esto debido a la variación en la edición del primer exón y a diferentes extensiones en la parte 3' del segundo exón [23]. Dos de ellos son muy similares en tamaño, *aqz-RD* y *aqz-RB* (4950 y 4719 nucleótidos, respectivamente), pues varían solamente en el tamaño del primer exón. El más pequeño es *aqz-RA* (2357 nucleótidos). El transcrito de mayor tamaño *aqz-RC*, es de aproximadamente 6145 nucleótidos y sobrelapa parcialmente con al menos 89 nucleótidos del locus CG9827. La secuencia de CG9827 mide 5.9 Kb y se localiza al igual que *aqz* en el brazo derecho del tercer cromosoma entre los nucleótidos 8,807,679 y 8,813,579. Este gen codifica para un transcrito CG9827-RD de 1488 nucleótidos con dos exones y un intrón, el exón 5' sobrelapa 89 nucleótidos con la parte 3' de *aqz-RC* (Fig. 14).

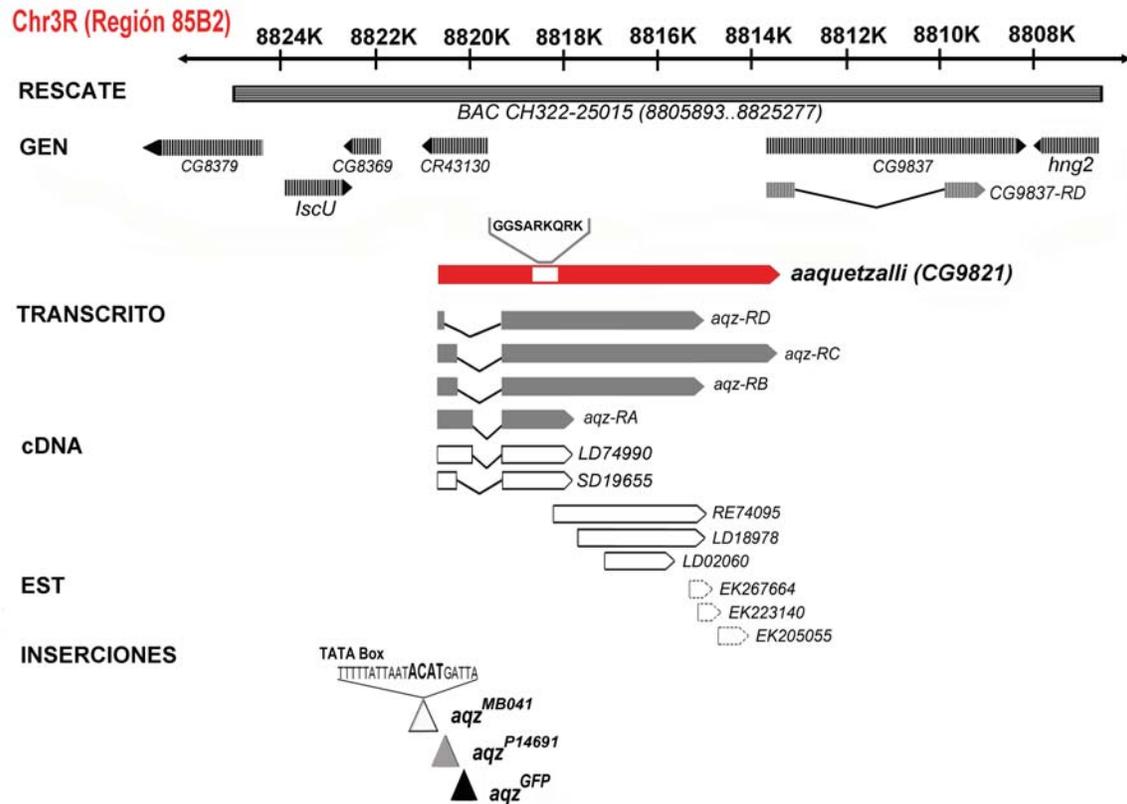


Figura 14. Secuencia de rescate, cDNAs e Inserciones genéticas alrededor de la región genómica de *aqz* de *Drosophila melanogaster*. Debajo de la línea del cromosoma (Chr3R), se muestra la extensión de la secuencia empleada para el rescate genómico (*BAC CH333-25015*, barra gris). Esta construcción está insertada en el segundo cromosoma en la región 53B2 (alelo *aqz*^{RESCATE}). La secuencia de *aqz* (flecha sólida roja). Se indica la localización de *aqz* (y otros genes que mapean en las regiones aledañas a *aqz* (flechas negras y grises con rayas verticales). De acuerdo a los programas de predicción molecular, *aqz* codifica para cuatro diferentes mRNA, cada uno con dos exones (flechas de color gris) y un intrón (línea de color negro). Los cuatro transcritos cuentan con una secuencia codificante del mismo tamaño (rectángulo blanco dentro de la secuencia de *aqz*). Se indican los cDNAs (flechas blancas con bordes negros continuos) y los ESTs del locus (flechas blancas con líneas negras punteadas). Se muestra la localización de las inserciones de transposones en la región promotora del alelo *aqz*^{P14691} (triángulo gris) y en el intrón del alelo *aqz*^{GFP} (triángulo negro). *aqz*^{MB041} tiene una inserción de cuatro pares de bases (negritas) en la región promotora, entre la caja TATA y el inicio de la transcripción (triángulo blanco).

Algunas de estas secuencias consenso (*aqz-RD* y *aqz-RB*) coinciden parcialmente en tamaño con el transcrito de 5030 nucleótidos observado anteriormente en el análisis tipo Northern (Fig. 7). Pero en el caso de transcrito de 7530 nucleótidos, observado en este mismo análisis, es de mayor peso molecular que *aqz-RC* (6145 nucleótidos).

En el análisis de alineación de los cDNAs y ESTs secuenciados en este trabajo y la información en Flybase de los transcritos de *aqz*, no se toma en consideración la cantidad de ESTs no caracterizados que abarcan la región 3' terminal de *aqz* y tampoco la existencia de ESTs que establecen el solapamiento parcial entre las secuencias de *aqz* y *CG9837*. Por tanto, se puede mencionar que la información del procesamiento de los transcritos generados a partir del locus *aqz* esta incompleta y la evidencia sugiere *aqz-RC* se extiende en dirección 3' del locus, coincidiendo en parte con el exón 5' de *CG9837-RD*. Si se considera que *aqz* y *CG9837* es el mismo gen, la fusión de *aqz-RC* (6145 nucleótidos) con *CG9837-RD* (1488 nucleótidos), generaría un transcrito teórico *aqz-RF* de 7633 nucleótidos (Fig. 15). El tamaño de *aqz-RF* coincide con el transcrito de 7530 nucleótidos observado en el Northern blot (Fig. 7).

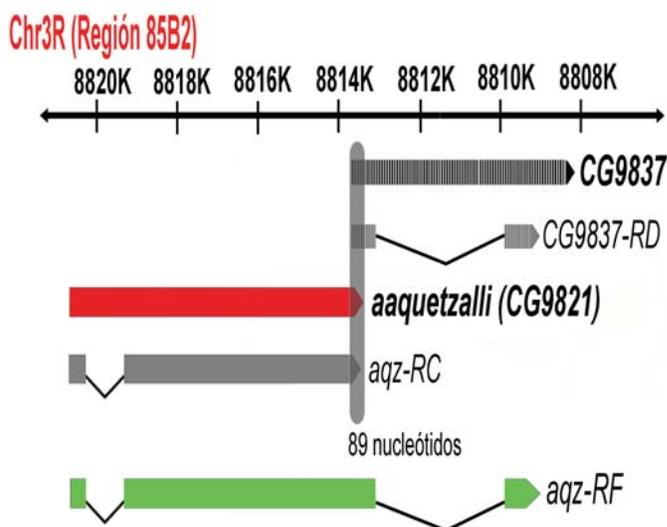


Figura 15. Alineación de las secuencias *aqz* y *CG9837*. La secuencia del transcrito *aqz-RC* solapla con una sección de 89 nucleótidos en la parte 3' de *CG9837* (línea vertical gris). La fusión de las secuencias de *aqz-RC* y *CG9837-RD* genera un transcrito teórico *aqz-RF* de un tamaño de 7633 nucleótidos (flecha sólida verde), tamaño similar al transcrito de 7530 nucleótidos detectado por análisis de Northern Blot.

No. de cDNA	cDNA	Tamaño de la secuencia	Tejido del cual fue aislado
1	SD19655	1736	Células Schneider L2
2	LD74990	2351	Embrión
3	RE74095	3498	Embrión
4	LD18978	2966	Embrión
5	LD02060	1556	Embrión
6	EK267664	Secuenciada parcialmente	Embrión, discos imagales y cabezas de adultos
7	EK205055	Secuenciada parcialmente	Embrión, discos imagales y cabezas de adultos

Tabla 1. Lista de los cDNAs que abarcan la región genómica de *aqz*, usados para reconstruir teóricamente cDNAs completos. La reconstrucción de los cDNAs teóricos completos está apoyada en parte en cDNAs parciales que se sobrelapan (Fig. 14), como el cDNA *RE74095* que incluye parte de la secuencia 5' de *aqz* presente en otros cDNAs, así como *LD74990* (*aqz* 5') y la secuencia más 3' de *aqz*, que incluye el cDNA *LD18978* (*aqz* 3').

1.2 Análisis de los productos moleculares de *aqz*.

1.2.1 Expresión de los transcritos.

Para el análisis de la expresión de *aqz* durante el desarrollo se utilizaron como sondas los cDNAs incompletos *LD74990* (*aqz* 5') y *LD18978* (*aqz* 3'). Este último cDNA se ubica más 3' en el cromosoma con respecto al cDNA *aqz* 5' (Figs. 14 y 16A)[26]. Los resultados con ambas sondas son muy similares en cuanto al número de transcritos evidenciados en varias etapas del desarrollo. Se observa en todas las etapas que ambas sondas reconocieron dos bandas de 5030 y 7530 nucleóticos. Como se había mencionado antes en este trabajo (Fig. 7), la primera correspondería a los transcritos teóricos de 4950 y 4719 nucleótidos (*aqz-RD* y *aqz-RB*, respectivamente). La segunda, correspondería al transcrito teórico más largo (*aqz-RF*, 7633 nucleótidos) que expande el locus de *aqz* y sobrelapa con *CG9837*. Además, se observó la presencia en adultos de una banda adicional de aproximadamente 3160 nucleótidos, detectada con la sonda *aqz* 5', pero no con la sonda *aqz* 3'. Esto demuestra que el transcrito pequeño

detectado por la sonda *aqz* 5' proviene de la región 5' del *locus*, que corresponde al transcrito teórico *aqz-RA* de 2357 nucleótidos. [65].

El tamaño de los transcritos observados en este análisis corresponden aproximadamente al tamaño de los transcritos teóricos, dos de los cuales se expresan en todo el ciclo de vida de la mosca (Fig. 16B). Esto último concuerda con los datos ya publicados de expresión de *aqz* durante las diferentes etapas del ciclo de vida y tejidos que incluyen el cerebro, los ovarios, los discos imagales y las glándulas salivales larvarias de la mosca de la fruta [65];[66].

Además del análisis de los transcritos de *aqz* en embriones, larvas, pupas y adultos, también se evaluó la expresión *in situ* de los mismos durante el desarrollo embrionario (Fig. 17) por medio de hibridación con las mismas sondas utilizadas en el análisis tipo Northern (*aqz* 5' y *aqz* 3', Fig. 16). El patrón de expresión obtenido con ambas sondas es dinámico y muy similar durante la etapa embrionaria. Los transcritos de *aqz* se empiezan a detectar en etapas tempranas, antes de la etapa 5 (etapa donde los depósitos maternos de mRNA y proteínas son significativos para el desarrollo del embrión, Fig. 17A)[67]. Estos resultados, junto con los estudios realizados en embriones de línea germinal demuestran que existe contribución materna del transcrito *aqz* [29]. En la etapa 8-9, a finales de la extensión de la banda germinal e inicios de la retracción, se detecta una expresión difusa en la región neurogénica (Fig. 17B). Para las etapas 11-12, durante la retracción de la banda germinal, la expresión se observa más definida en la región donde se formará la futura cadena ganglionar ventral y el cerebro de la larva (Fig. 17C). En la etapa 12-13, a inicios del cerrado dorsal, la expresión se concentra en la epidermis, y también en el SNC SNP (Fig.16D). No observamos expresión en el tejido extraembrionario llamado amnioserosa.

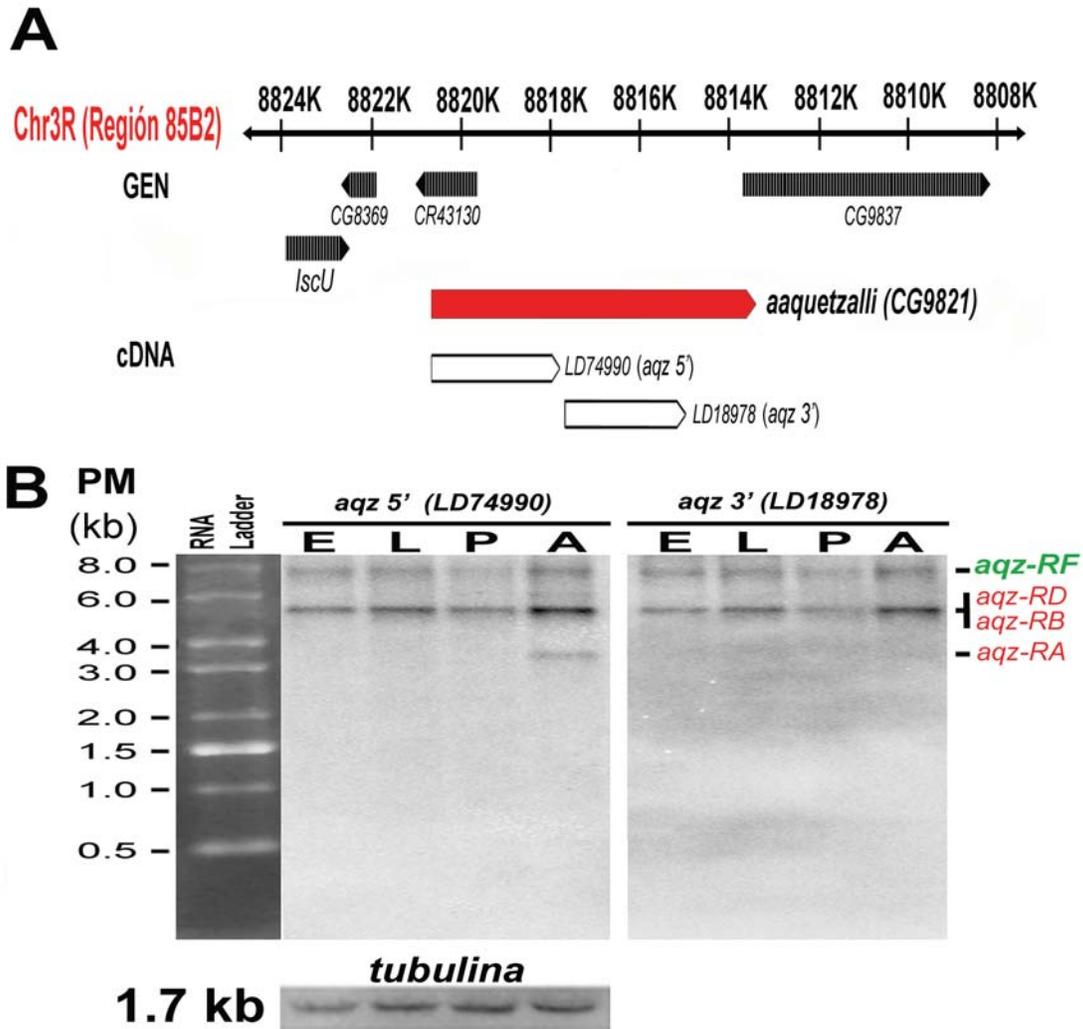


Figura 16. La expresión de los diferentes transcritos de *aqz* en *D. melanogaster*. (A) La región genómica de *aqz*. Los cDNAs que abarcan la región 5' (*aqz* 5', LD74990) y una más 3' (*aqz* 3', LD18978) de *aqz* se utilizaron como sondas en B. (B) Análisis tipo Northern de mRNA total de diferentes etapas del desarrollo de *Drosophila*. Al igual que en la Fig. 7, se observa la presencia de dos transcritos: uno 5030 nucleótidos (*aqz*-RD y *aqz*-RB) y otro de 7633 nucleótidos (*aqz*-RF) en todas las etapas, con las dos sondas utilizadas. Sólo en adultos se observa un transcrito más pequeño de 3160 nucleótidos (*aqz*-RA), con la sonda *aqz* 5'. E: embriones, L: larvas, P: pupas y A: adultos. Se utilizó como control de cargado una sonda derivada del cDNA del gen de la tubulina en *Drosophila* (1.7 kb); parte inferior. 1kb=1000 nucleótidos. Los tres análisis se realizaron en el mismo filtro.

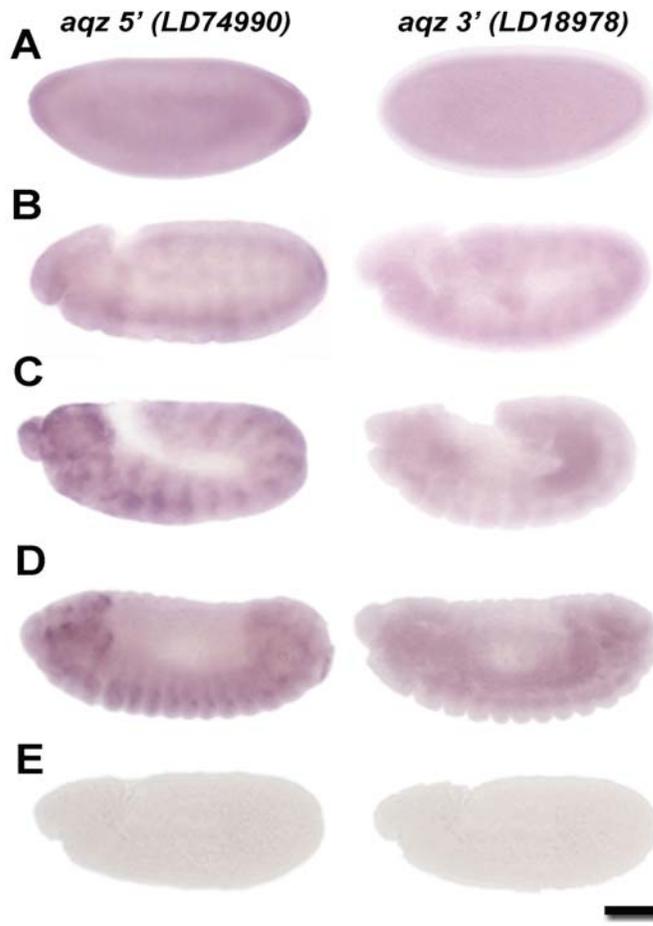


Figura 17. La expresión de *aqz* durante el desarrollo embrionario. Expresión de los transcritos detectados por Hibridación *in situ* de embriones silvestres con las sondas *aqz* 5' (LD74990, izquierda) y *aqz* 3' (LD18978, derecha). El patrón de expresión con ambas sondas es muy similar. Ambas sondas detectan la expresión de *aqz* en etapas tempranas evidenciando la contribución materna, en el ectodermo (banda germinal) y en los tejidos derivados del ectodermo (epidermis y SN). A) Etapa temprana de la embriogénesis, blastodermo celular. B) Etapa 8-9, final de la extensión e inicios de la retracción de la banda germinal. C) Etapa 11, retracción de la banda germinal. D) Etapa 12-13, inicio del cerrado dorsal. E)

Embriones control en la etapa 8-9 usando la sonda sentido. La barra negra de la escala es equivalente a 100 μ m.

1.2.2 Análisis molecular de la proteína Aqz.

Todos los transcritos derivados de *aqz* (*aqz-RA*, *aqz-RB*, *aqz-RC* y *aqz-RD*) tienen la misma secuencia codificante y sintetizan una proteína teórica Aqz de 285 aminoácidos [68] y un peso estimado de 30.1KDa, de acuerdo al análisis de predicción en Flybase [23].

Entonces como primer paso para confirmar los resultados del análisis predictivo y establecer un estudio funcional de las proteínas Aqz durante el desarrollo embrionario, se generó un anticuerpo contra el péptido INT-Aqz (GGSARKQRK)

que representa una sección intermedia de la proteína Aqz (Fig. 6B, rojo y Fig. 14, recuadro blanco dentro de la secuencia *aqz*). Por medio de un análisis tipo Western se evaluó el anticuerpo anti-Aqz contra extractos de proteínas totales solubles de embriones silvestres [63]. A diferencia de lo descrito en el análisis predictivo, este anticuerpo reconoce varias proteínas de diferente tamaño: dos de un peso molecular entre ~20-26 KDa y dos bandas adicionales de alto peso molecular (~65 KDa y ~70 KDa). La especificidad del anticuerpo se demostró con un ensayo de competencia, donde se usó como inmunógeno competidor un exceso del péptido N-Aqz. No se detectó ninguna de estas bandas usando el anticuerpo preabsorbido (Fig. 18).

1.2.3 Análisis molecular de la proteína GFP::*Aqz* expresada en el alelo *aqz*^{GFP}.

La descripción del alelo *aqz*^{GFP} se ubica en la sección 2.1 “Caracterización del alelo *aqz*^{GFP}” de los resultados de este trabajo.

Se realizó también un análisis tipo Western similar al anterior, con un extracto de embriones homocigotos *aqz*^{GFP} que es un alelo de falta de función que genera proteínas quiméricas GFP::*Aqz* no funcionales. El peso aproximado de la proteína GFP es de 27 KDa, por tanto, de acuerdo los pesos de las proteínas silvestres Aqz (~20, ~26, ~65 y ~70 KDa), los pesos esperados de las proteínas quiméricas GFP::*Aqz* son de ~47, ~53, ~92 y ~97 KDa, respectivamente.

El extracto de proteínas totales se incubó con el anticuerpo anti-Aqz y el anticuerpo anti-GFP por separado. En el primer ensayo, se observó que a diferencia del ensayo con embriones control, anti-Aqz no reconoce las proteínas quiméricas GFP::*Aqz* (Fig. 18A, carril derecho). Esto último quizá porque la estructura de las proteínas GFP::*Aqz* impide que el anticuerpo anti-Aqz reconozca el epítipo de Aqz contra el que fue seleccionado. En cambio, al incubar el mismo homogenado de proteínas con el anticuerpo anti-GFP se

obtuvieron tres bandas, una muy gruesa de bajo peso molecular ~34 KDa y dos más de alto peso molecular ~76 y ~80 KDa (Fig. 18B). Sin el peso de GFP (27 KDa) estas bandas serían de ~14, ~59 y ~63 KDa, respectivamente, y estarían en el rango esperado de las proteínas silvestres Aqz (~20, ~27, ~65 y ~70 KDa). Es probable que la banda de ~34 KDa pudiera ser un doblete que a las proteínas Aqz de ~20 y ~27 KDa.

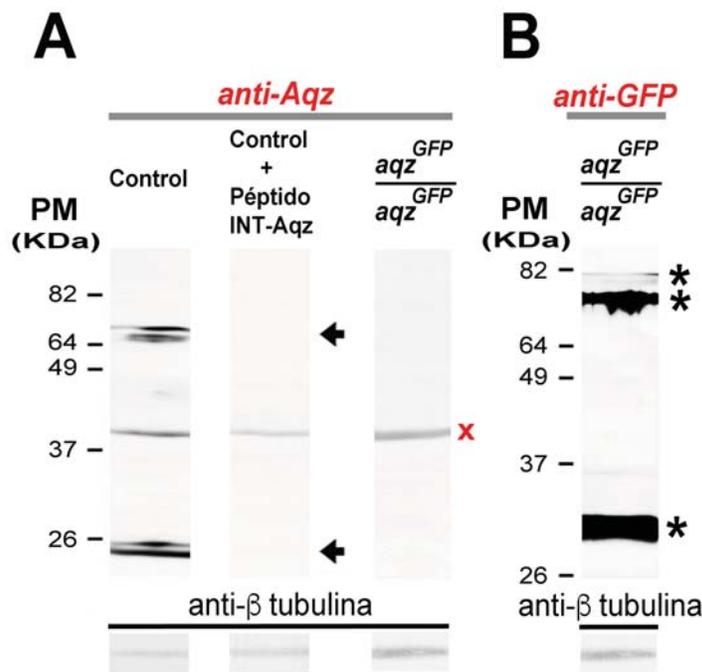


Figura 18. Detección de proteínas Aqz en embriones de *D. melanogaster* en la etapa de 6-8 hrs. Análisis tipo Western de extractos proteicos solubles de embriones silvestres utilizados como control (A, carril izquierdo y carril intermedio) y embriones homocigotos aqz^{GFP} (A, carril derecho y B) con anticuerpos policlonales anti-Aqz. (A, carril intermedio) Ensayo de competencia con el péptido INT-Aqz (GGSARKQRK, Fig. 14). El anticuerpo anti-Aqz reconoce un

dos bandas de alto peso molecular (~65 y ~70 KDa) y dos bandas de bajo peso molecular (~20 y ~26 KDa, puntas de flecha). Las cuatro bandas desaparecen al preincubar el anticuerpo con el péptido INT-Aqz. Esto indica que el anticuerpo detecta específicamente productos proteicos con esta secuencia. Se observa una banda inespecífica que aparece en los ensayos en A (X, roja). (A, carril izquierdo y B) Ensayo con extracto proteico de embriones homocigotos aqz^{GFP} . Incubando anti-Aqz contra el homogenado, no se observan las bandas correspondientes a Aqz (~20, ~26, ~65 y ~70 KDa) ó GFP::Aqz, en ninguna muestra. (B) Las proteínas quiméricas GFP::Aqz (~34, ~76 y ~80 KDa) se detectan con el anticuerpo anti-GFP (asteriscos).

1.2.4 Análisis del perfil de las huellas ribosomales.

Para clarificar la regulación del procesamiento del mRNA en el locus de *aqz* durante la traducción, se recurrió a la técnica de determinación de perfiles de huellas ribosomales (“Ribosome footprint profiling”). Esta técnica nos permite indagar en los perfiles de expresión génica de los organismos a través de la secuenciación masiva de fragmentos de mRNA protegidos por los ribosomas. Los resultados derivados de este análisis han ayudado a revelar saltos de codones de paro durante la elongación de la traducción. Este es un mecanismo importante para regular la extensión de las proteínas [70]. En este trabajo presentamos un análisis de la huella ribosomal del locus *aqz* utilizando los datos de abundancia y densidad ribosomal, generados y publicados por Dunn y col. (2013)[70]; disponibles en NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Para procesar esta información y generar los diagramas de análisis de ocupación ribosomal (Fig. 19), se utilizó el programa llamado Integrated Genome Browser 8.1 (IGB, <http://bioviz.org/igb/index.html>). Los resultados de dicho análisis revelan que el primer exón de los transcritos *aqz* (Fig. 14, el exón que es variable para todos) se traduce con alta frecuencia, así como con una alta probabilidad la extensión 3' del segundo exón, extendiéndose mas allá del codón de paro que se establece durante la traducción de la proteína predicha Aqz. Esta información es consistente con los resultados que hemos obtenido en este trabajo derivados del análisis de la extensión 3' de los transcritos *aqz* (*aqz-RF*, Fig. 15), los experimentos tipo Northern (transcritos de mayor tamaño a las secuencias predichas, Fig. 16B), Western (presencia de proteínas Aqz en mayor número y tamaño que las predichas, Fig. 18A).

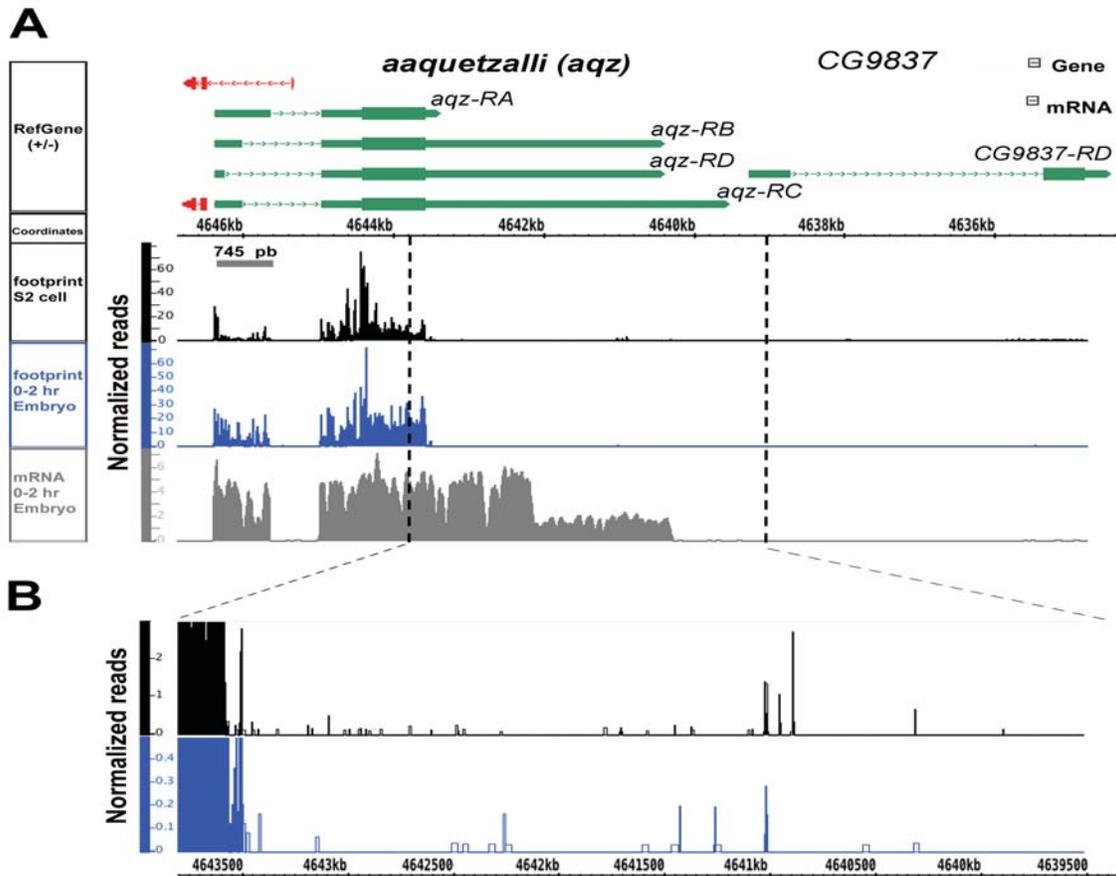


Figura 19. Análisis del perfil de las huellas ribosomales de la expresión del locus *aqz*. (A) Región genómica de *aqz* (CG9821) y los mRNA predichos en las bases de datos genómicos (exones, verde sólido e intrones, líneas verdes punteadas). Otros mRNA alrededor del locus *aqz* (líneas rojas punteadas). En la parte inferior de A, se observa el análisis de abundancia ribosomal en los fragmentos de mRNAs de *aqz* protegidos por los ribosomas. Estas muestras se obtuvieron de células S2 (negro) y de embriones de 0-2 h (azul). Además se incluye secuenciación del transcriptoma (RNA-seq, gris) en embriones de 0-2 h. La magnitud de la ocupación ribosomal se representa por el número de lecturas (ribosomas presentes) por cada millón de moléculas de mRNA. Notar que el primer exón del mRNA de *aqz* se traduce. Algunos mRNAs de *aqz* se saltan el codón de paro en el segundo exón lo que genera una extensión de la proteína Aqz durante la traducción. Para este análisis se utilizó la versión FB2014_03 de la escala del mapa genético de *Drosophila* en Flybase [65]. En (B), se muestra la amplificación de la región C-terminal de Aqz donde la extensión puede ocurrir por el salto del codón de paro. La señal de la ocupación ribosomal en la region 3' del segundo exón *aqz*, detectada en este análisis, es pequeña comparada con la señal de ocupación de la parte 5', por lo que sugiere que la extensión de la región C-terminal de Aqz y por tanto la presencia de proteínas Aqz de alto peso molecular (65 y 70 KDa) es poco frecuente en el desarrollo embrionario.

2. *aqz* desempeña un papel muy importante en la embriogénesis durante la diferenciación del ectodermo.

Algunos de los fenotipos mutantes de *aqz* durante la embriogénesis se han identificado derivados de dos análisis genéticos : 1) Los clones de línea germinal presentan embriones muertos con orificios en la cutícula en la parte anterior y dorsal, lo cual manifiesta una función importante de *aqz* durante la diferenciación de la epidermis [30]. 2) La inyección de iRNA en embriones silvestres, genera problemas de desarrollo de las comisuras que conforman la cadena ganglionar ventral, en el SNC y una severa hipoplasia del SNP [25]. En ambos casos, se muestran fenotipos mutantes al final de la embriogénesis pero no se han cuantificado. Aunque la evidencia publicada nos da una idea clave de la funcionalidad de *aqz* durante la embriogénesis, los fenotipos mutantes resultantes nos sugieren que *aqz* se necesita en varias ocasiones para el desarrollo de tejidos derivados del ectodermo.

Antes de dar inicio a una investigación más profunda de la función de *aqz* en el desarrollo embrionario, primero se identificaron y caracterizaron los alelos a utilizar en este trabajo:

2.1 Caracterización del alelo *aqz*^{GFP}.

Se identificó otro alelo letal de *aqz*, *aqz*^{GFP}. Este alelo pertenece a una colección de mutantes proveniente del Yale Gene Trap Stock Center [50]. *aqz*^{GFP} tiene una inserción de un transposón en el primer intrón/primer exón del locus *aqz* (Fig. 14, parte inferior). Este transposón codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) con señales de reconocimiento de exón/intrón, de tal suerte que se generan varias proteínas quiméricas GFP::*Aqz* (Fig. 14, Fig. 18B y Fig. 20).

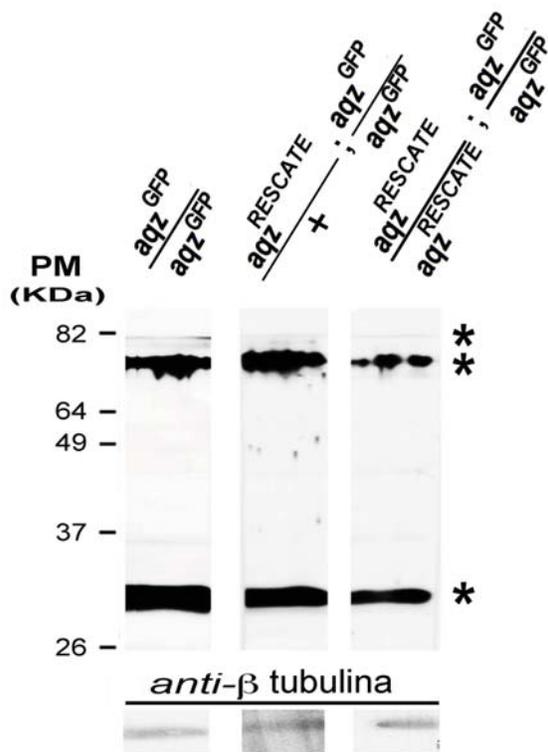


Figura 20. Análisis tipo Western de extractos proteicos solubles de embriones homocigotos aqz^{GFP} y embriones homocigotos aqz^{GFP} con una y dos copias del rescate ($aqz^{RESCATE}$, véase Materiales y Métodos). Como se observó anteriormente, incubando Anti-Aqz contra el homogenado de embriones homocigotos aqz^{GFP} , no se observan las bandas correspondientes a Aqz (~20, ~26, ~65 y ~70 KDa) ó GFP::Aqz (Fig. 18A, carril derecho). Las proteínas quiméricas GFP::Aqz (~34, ~76 y ~80 Kda) se detectan con el anticuerpo anti-GFP (asteriscos). No hay cambios significativos en la presencia de las proteínas quiméricas en los embriones homocigotos aqz^{GFP} con una (carril intermedio) o dos copias del rescate (carril derecho).

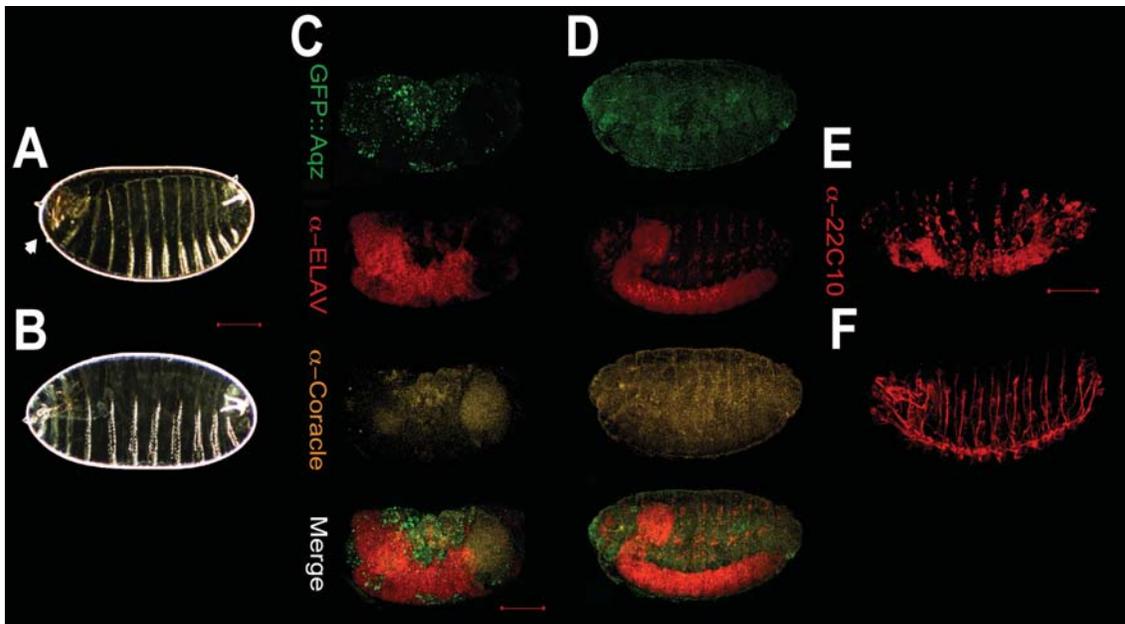


Figura 21. Caracterización de los fenotipos mutantes del alelo aqz^{GFP} . (A-F) Resultados del análisis de los fenotipos mutantes en embriones heterocigotos (B, D y F) y mutantes homocigotos aqz^{GFP} (A, C y E). En el análisis de cutículas los embriones homocigotos mutantes presentan orificios en la parte anterior y defectos de involución de cabeza. (C-F) Tinciones de

embriones con marcadores del sistema nervioso y epidermis: En C y D, se muestran una doble tinción de neuronas (anti-Elav) y epidermis (anti-Coracle). En E y F, se muestra una tinción simple para axones y algunos cuerpos neuronales (anti-22C10). En la tinción del sistema nervioso y epidermis, se observa que los embriones homocigotos presentan defectos severos en la formación de ambos tejidos, hiperplasia del SNC e hipoplasia del SNP, así como ausencia de tinción en la epidermis ventral. La barra roja de escala equivale a 100 μ m.

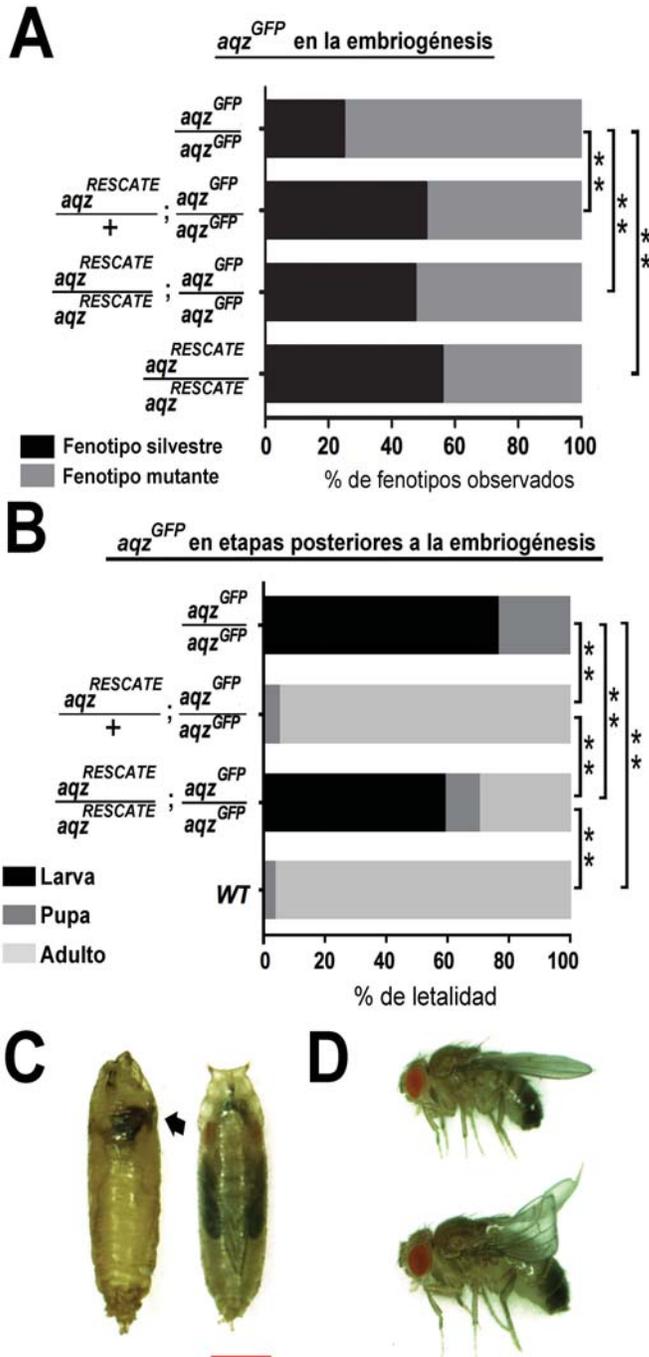


Figura 22. Porcentaje de fenotipos mutantes en aqz^{GFP} y rescate con la construcción genómica del aqz ($aqz^{RESCATE}$). (A) Porcentajes de embriones homocigotos aqz^{GFP} con fenotipos mutantes (defectos en el sistema nervioso y epidermis), con una ó dos copias de la construcción con el rescate genómico de aqz ($aqz^{RESCATE}$). Con una sola copia de la construcción se rescata significativamente el fenotipo mutante (el incremento de embriones que sobreviven aumenta aproximadamente un 20%), mientras que dos copias del rescate también tiene efectos significativos, pero en menor grado (solo hay un aumento aproximado del 15% de embriones sobrevivientes). No hay diferencia significativa entre una y dos copias para el rescate. Se utilizaron 500 embriones por cada experimento. (B) Periodo fenocrítico extendido de embriones mutantes homocigotos aqz^{GFP} . Los embriones mutantes aqz^{GFP} supervivientes, mueren principalmente como larvas y solo un 20% de las larvas que sobreviven alcanzan la etapa de pupa. No se

observan adultos. La letalidad de la mutación en aqz^{GFP} se rescató hasta adultos a niveles de las moscas silvestres, con una copia de la construcción de rescate genómico. Sin embargo, como se muestra en B, el doble homocigoto $aqz^{RESCATE}; aqz^{GFP}$, en lugar de tener un efecto significativo de rescate, se observaron efectos consistentes con una ganancia de función. (C) Las pupas homocigotas mutantes aqz^{GFP} (lado izquierdo) mueren pronto, con necrosis (flecha negra), en comparación con pupas silvestres (lado derecho). La barra de escala equivale a 1 mm. (D) Características físicas (menor tamaño) de los individuos sobrevivientes homocigotos mutantes $aqz^{RESCATE}/+; aqz^{GFP}/aqz^{GFP}$ (arriba) comparado con hermanos heterocigotos $aqz^{RESCATE}/+; aqz^{GFP}/+$ (abajo, marcador de alas curvas). En (A) y (B), * denota diferencias significativas ($p < 0.5$) entre las comparaciones señaladas.

Los embriones mutantes homocigotos aqz^{GFP}/aqz^{GFP} presentan defectos en la epidermis, como fusión de segmentos y hoyos en la parte ventral, y defectos de organización y desarrollo del SN (Fig. 21A, C y 22A). El análisis de la expresión de GFP::Aqz en embriones heterocigotos aqz^{GFP} indica que aqz se expresa en la epidermis y el SN (Fig. 29), y se encuentra en el citoplasma con una distribución homogénea, con algunas acumulaciones anormales en el citoplasma y en ocasiones en el núcleo (Fig. 23A-E, flecha blanca). En el caso de los embriones homocigotos aqz^{GFP} , éstos presentan mayor número de acúmulos anormales de la proteína GFP::Aqz en el citoplasma y en el núcleo (Fig. 23F, flecha blanca). Esta expresión alterada también sirve como un marcador para diferenciar los embriones homocigotos mutantes.

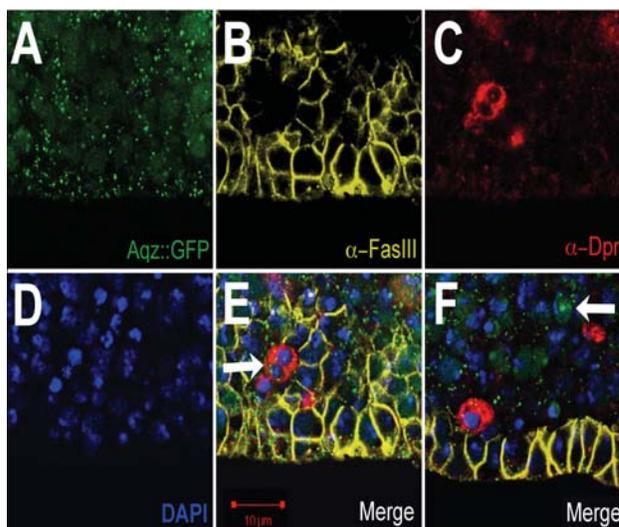


Figura 23. Expresión de GFP::Aqz en embriones aqz^{GFP} . (A-E) Expresión de la proteína GFP::Aqz VERDE) en embriones heterocigotos aqz^{GFP} . La expresión de la proteína se encuentra de manera general homogénea en el citoplasma, con algunas acumulaciones citoplasmáticas e inclusive nucleares (DAPI, azul). La epidermis se marcó utilizando anti-FasIII (B, amarillo). (F), la expresión de la proteína GFP::Aqz en UN Embrión homocigoto aqz^{GFP} parece

acumularse en el citoplasma, y de manera anormal en el núcleo. Los neuroblastos se tiñeron utilizando el marcador anti-Deadpan (C, en rojo). Las imágenes en E y F, muestran el empalme con las diferentes tinciones.

2.2 Caracterización del alelo aqz^{MB041} .

Los nuevos alelos generados por escisiones imprecisas de los elementos P en el mutante aqz^{P14691} son letales. En este trabajo nos enfocamos a la caracterización molecular de uno de ellos, el alelo aqz^{MB041} (Fig. 10 y 11). El análisis molecular de aqz^{MB041} reveló una inserción de 4 pares de bases (**ACAT**) a 189 pb 5' del sitio de inicio de transcripción de aqz (CG9821), y A 171 pb 5' de la inserción del elemento P parental), debido al evento de escisión imprecisa del elemento P (Fig. 14, parte inferior). Esta inserción no está presente en las cepas en otros mutantes de aqz , o en revertantes del mismo experimento de escisión del elemento P. Los embriones homocigotos aqz^{MB041} , no presentan ninguna de las cuatro proteínas Aqz identificadas en la línea silvestre (Fig. 24). Este alelo tiene fenotipos mutantes que afectan principalmente al SN y la epidermis (Fig. 25 y 26A).

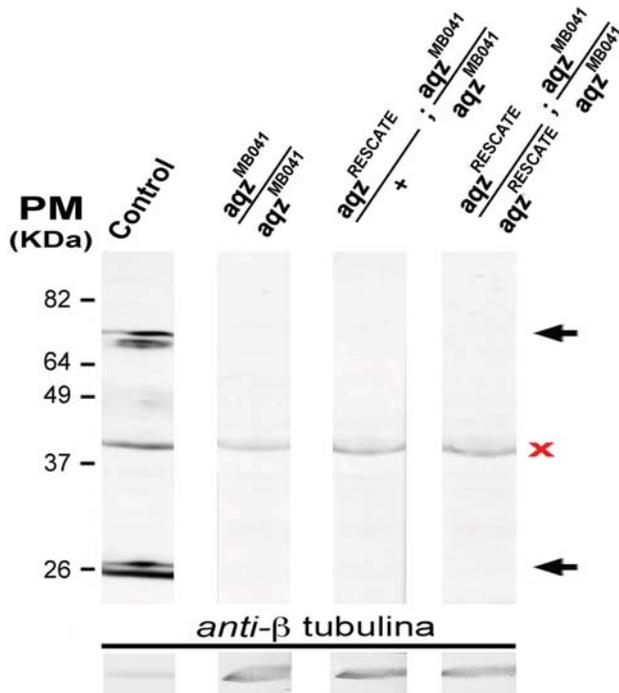


Figura 24. Análisis tipo Western de extractos proteicos solubles de embriones silvestres utilizados como control (primer carril), embriones homocigotos aqz^{MB041} (segundo carril) y embriones homocigotos aqz^{MB041} con una (tercer carril) y dos copias del rescate (cuarto carril). $aqz^{RESCATE}$, véase Materiales y Métodos. Se observa que el anticuerpo anti-Aqz reconoce un par de bandas de alto peso molecular (~65 y ~70 KDa) y dos bandas de bajo peso molecular (~20 y ~26 KDa). Utilizando Anti-Aqz contra el homogenado de embriones

homocigotos aqz^{MB041} , no se observan las bandas correspondientes a Aqz (~20, ~26, ~65 y ~70 KDa, segundo carril). Al igual que el embrión homocigoto aqz^{MB041} , el rescate con una (tercer carril) o dos copias (cuarto carril) del rescate en un fondo homocigoto aqz^{MB041} tampoco se observan las bandas correspondientes a las proteínas Aqz. Se observa una banda inespecífica que aparece en los ensayos (X, roja).

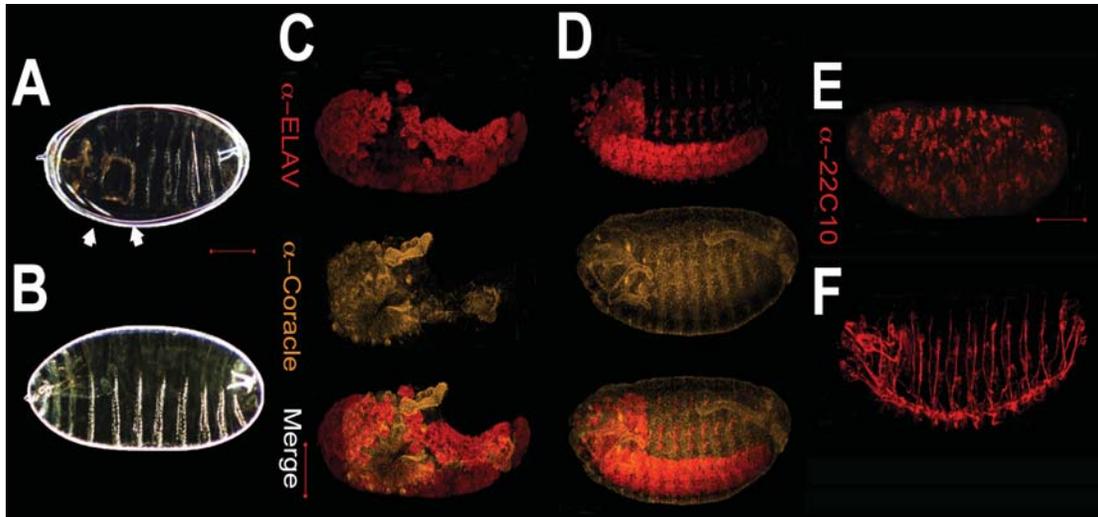


Figura 25. Caracterización de los fenotipos mutantes del alelo aqz^{MB041} . (A) Cutículas de embriones homocigotos mutantes aqz^{MB041} que presentan orificios en la parte anterior y ventral (flechas blancas), en comparación con una cutícula control que se muestra en B. (C) Doble tinción de embriones homocigotos aqz^{MB041} para el SN (anti-Elav) y para el tejido epitelial (anti-Coracle). Estos embriones mutantes presentan un SN desorganizado y deformado, también muestran el tejido epitelial anormal. El panel inferior muestra una imagen con el empalme de ambas tinciones. (D) Embrión silvestre utilizado como control teñido de manera similar. (E) Embrión homocigoto mutante aqz^{MB041} que presentan un SNP anormal, como se evidencia por la tinción de anti-22C10, en comparación con F, un embrión de silvestre. En todas las imágenes, los embriones se muestran orientados con la parte dorsal hacia arriba y anterior izquierda. La barra de escala equivale a 100 μ m.

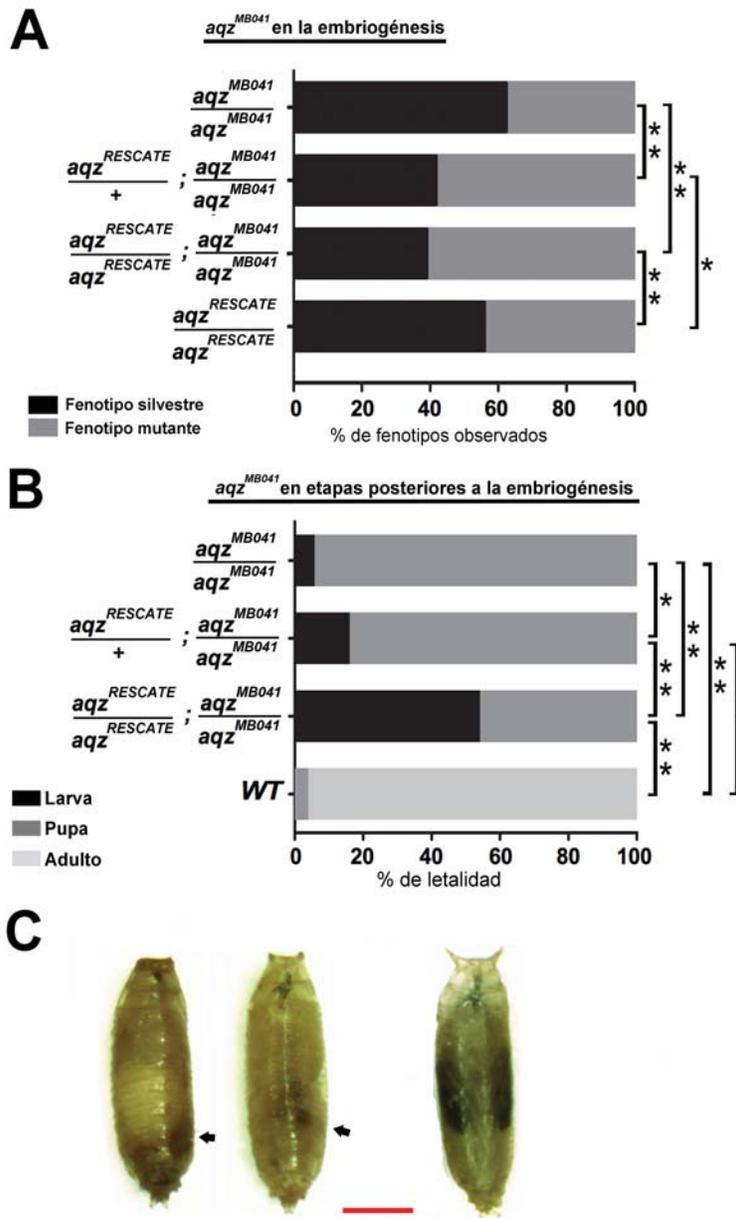


Figura 26. Porcentaje de fenotipos mutantes en *aqz*^{MB041} y rescate con la construcción genómica del *aqz* (*aqz*^{RESCATE}). En A, se muestra la cuantificación de los fenotipos mutantes en el sistema nervioso de alelos homocigotos mutantes *aqz*^{MB041}. Aproximadamente un tercio de los embriones mutantes presentan un fenotipo neurogénico. Con una y también con dos copias de la construcción del rescate genómico (*aqz*^{RESCATE}) aumentan significativamente este porcentaje: 60% más de embriones homocigotos mutantes con el rescate exhiben un fenotipo neurogénico. En B, la mayoría de los embriones homocigotos mutantes *aqz*^{MB041} que sobreviven la embriogénesis mueren como pupas, solo unos pocos (menos de 10%) mueren como larvas. La

adición de dos copias del rescate, aumenta significativamente el número de larvas (más del 50%) que no llegan hasta la fase de pupa. En A y B, al añadir copias del rescate genómico, aumenta la aparición de fenotipos mutantes, efecto similar a lo que ocurre al agregar dos copias del rescate en *aqz*^{GFP}. En C, se muestran dos pupas mutantes homocigotas *aqz*^{MB041} con manchas necróticas (flechas negras, pupas izquierda e intermedia), en comparación con una pupa silvestre (derecha). La barra de escala equivale a 1 mm. En (A) y (B), * denota diferencias significativas ($p < 0,5$) entre las comparaciones señaladas.

2.3 Análisis de complementación.

aqz se localiza en la región 85B ubicada en el brazo derecho del tercer cromosoma, y contamos con tres deficiencias que descubren esta región (Fig. 27). En esta misma región se localizan los sitios de inserción del elemento P en *aqz*^{GFP} y los sitios de inserción de alelos restantes. Se llevaron a cabo ensayos de complementación entre los diferentes alelos mutantes letales. Por ejemplo, como es de esperarse *aqz*^{GFP} no complementa con las tres deficiencias. Algunas líneas derivadas de las escisiones, complementan entre sí, mientras que otras no lo hacen: los alelos derivados de las escisiones, incluyendo *aqz*^{MB041} y *aqz*^{MA090}, complementan con las tres diferentes deficiencias que abarcan el locus *aqz*. Además algunas líneas derivadas de las escisiones, complementan entre sí, mientras que otras no lo hacen (Tabla 2).

Todas las líneas con elemento P y los nuevos alelos derivados de la escisiones, complementan con *aqz*^{GFP}. Por el contrario, *aqz*^{GFP} no complementa con las tres deficiencias que abarcan el locus, mapeando *aqz*^{GFP} en la región 85B2 ubicada en el brazo derecho del tercer cromosoma, región que abarcan en común las tres deficiencias (Tabla 2).

En esta región se ubica el locus *aqz*, los sitios de inserción del elemento P en *aqz*^{GFP} y los sitios de inserción de alelos restantes. (Por ejemplo, *aqz*^{MB041} y *aqz*^{GFP} se encuentran entre el promotor y el primer exón/intron, separados únicamente por 322 pb y aun así complementan, Fig. 27 y Tabla 2). Todos los mutantes de *aqz*, independientemente de su origen, presentan los mismos fenotipos mutantes. Cada alelo mutante presenta una fracción de embriones con defectos del SNC y hoyos en la cutícula. El alelo *aqz*^{GFP} se comporta genéticamente como un alelo de pérdida de función (no complementa con las deficiencias).

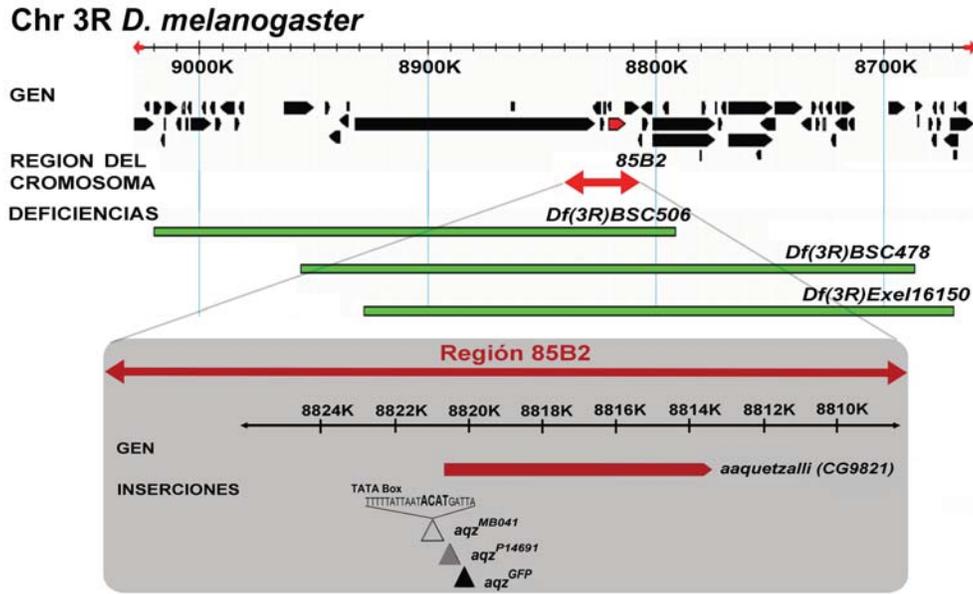


Figura 27. Mapa físico de las deficiencias en el 3er cromosoma que incluyen la región 85B2 donde se ubica *aqz*. En la parte superior, debajo de la línea del cromosoma (Chr3R), se muestran las secuencias de los genes que incluyen las deficiencias (Flechas solidas negras), la región 85B2 (Línea solida roja con flechas en ambos extremos) y las deficiencias utilizadas para el análisis de complementación (líneas solidas verdes). En la parte inferior, se muestra una ampliación de la región 85B2 (recuadro gris) que incluye la localización de la secuencia de *aqz* (flecha solida roja) y las inserciones de transposones en la región promotora del alelo *aqz*^{P14691} (triángulo gris) y en el intrón del alelo *aqz*^{GFP} (triángulo negro).

	WT	<i>aqz</i> ^{MB041}	<i>aqz</i> ^{MA090}	<i>aqz</i> ^{MB039}	<i>aqz</i> ^{P14691}	<i>aqz</i> ^{GFP}	<i>Df(3R)Exel6150</i>	<i>Df(3R)BSC478</i>	<i>Df(3R)BSC506</i>
WT	HV								
<i>aqz</i> ^{MB041}	+	HL							
<i>aqz</i> ^{MA090}	+	L	HL						
<i>aqz</i> ^{MB039}	+	L	L	HL					
<i>aqz</i> ^{P14691}	+	+	+	+	HV				
<i>aqz</i> ^{GFP}	+	+	+	+	+	HL			
<i>Df(3R)Exel6150</i>	+	+	+	+	+	L	HL		
<i>Df(3R)BSC478</i>	+	+	+	+	+	L	L	HL	
<i>Df(3R)BSC506</i>	+	+	+	+	+	L	L	L	HL

Tabla 2. Tabla de complementación de los alelos de *aqz*. El alelo *aqz*^{Inserción} (*aqz*^{P14691}) es homocigoto viable y complementa con los alelos derivados de las escisiones (*aqz*^{Escisiones}, *aqz*^{MB041}, *aqz*^{MA090} y *aqz*^{MB039}). Estos últimos alelos y *aqz*^{GFP} son letales en homocigosis, además los alelos *aqz*^{Escisiones}, complementan con *aqz*^{GFP} y las tres deficiencias de *aqz* (*Df(3R)Exel6150*, *Df(3R)BSC478*, y *Df(3R)BSC506*) mientras que *aqz*^{GFP} no complementa con estas deficiencias. (+) Indica complementación, (L) indica no complementación (letalidad), (HV) indica homocigoto viable, y (HL) indica homocigoto letal.

2.4 Rescate genómico.

Para continuar con la caracterización de los alelos mutantes de *aqz*, se utilizó una construcción genómica que abarca el locus *aqz* (Fig. 14) y realizamos experimentos de rescate para *aqz*^{GFP} y *aqz*^{MB041} (Fig. 22 y 26, respectivamente).

Los experimentos de rescate genómico en *aqz*^{GFP}, muestran que este alelo se comporta como un alelo de pérdida de función, ya que una proporción significativa de los embriones homocigotos mutantes con una copia del rescate, sobreviven a las etapas de embriogénesis y larva y siguen adelante hasta eclosionar en adultos viables (machos fértiles y hembras infértiles). La presencia de dos copias de la construcción de rescate no aumentó la proporción de embriones sobrevivientes, y demostró ser perjudicial para las larvas, pues muchas murieron, y un número significativamente menor de animales alcanzaron la etapa de pupa y la edad adulta (Fig. 22C-D). Esto sugiere que la abundancia y proporciones de las isoformas de Aqz son críticas para sus funciones.

Los mutantes *aqz*^{MB041} no muestran rescate genómico con la construcción en *aqz*^{RESCATE}. Al establecer una o dos copias del rescate en un fondo homocigoto *aqz*^{MB041}, los resultados muestran un incremento significativo en la frecuencia de los fenotipos mutantes. Esto es consistente con un carácter parcial de ganancia de función para *aqz*^{MB041} (Fig. 26).

3. Análisis de la expresión de Aqz y GFP::Aqz en el desarrollo embrionario.

El patrón de expresión espacial y temporal de *aqz*, tanto del mRNA como de la proteína, es dinámico durante la embriogénesis (Fig. 17 y 28). De acuerdo con el análisis de expresión de los mRNAs *aqz* en el embrión silvestre utilizando la sonda *aqz* 5', la expresión de GFP::Aqz en embriones heterocigotos *aqz*^{GFP} y la expresión de las proteínas silvestres Aqz detectadas con el anticuerpo anti-Aqz, se observa que el patrón de expresión es coincidente, lo que significa que la

transcripción y la traducción no están reguladas o desacoplados diferencialmente.

La detección de la expresión coincidente entre GFP::Aqz y las proteínas silvestres Aqz en los embriones heterocigotos aqz^{GFP} , aportó la idea de que la expresión de la proteína GFP::Aqz puede ser útil como un marcador para la expresión Aqz.

Se ha mostrado la existencia de varios transcritos y proteínas derivadas del *aqz*, pero para simplicidad en las secciones que a continuación se muestran nos referiremos a ellas genéricamente como Aqz. Aqz se expresa en las etapas tempranas 3-5; cuando el embrión todavía es un blastodermo sincicial y la contribución materna es importante para el desarrollo del embrión (Fig. 17A y 28, parte superior). En la etapa 6, Aqz se observa en la banda germinal cuando esta aparece. Posteriormente, al final de la etapa 8 e inicio de la etapa 9, cuando inicia la delaminación de los neuroblastos a partir del neuroectodermo (Fig. 2), Aqz desaparece de los neuroblastos que se están delaminando (Fig. 23B). En esta etapa, se mantiene presente en el mesodermo y en las células del neuroectodermo y ectodermo lateral (Fig. 28). Durante la etapa 14, la presencia de Aqz es más dinámica y se observa una reducción de la cantidad de proteína en la región neurogénica ventral. En esta etapa, se mantiene la falta de expresión en los neuroblastos y en las células madre ganglionares (Fig. 29B) pero se empieza a observar expresión en el tejido nervioso ya diferenciado (Fig. 28 y Fig. 30). En las siguientes etapas, Aqz se presenta en los tejidos de origen ectodérmico ya diferenciados: Epidermis y SN (Fig. 30).

Además de las neuronas, también evaluamos la expresión de Aqz en células gliales del SN. Los resultados fueron negativos utilizando el marcador de células gliales, Repo (Fig. 30D). En la etapa 17, al final de la embriogénesis, Aqz parece estar predominantemente localizada en los cuerpos celulares del SN y Epidermis (Fig. 28 y 30). El patrón de expresión observado es consistente con la mayoría

de los requerimientos de Aqz durante la formación del ectodermo y la diferenciación de los tejidos derivados del mismo, durante la embriogénesis.

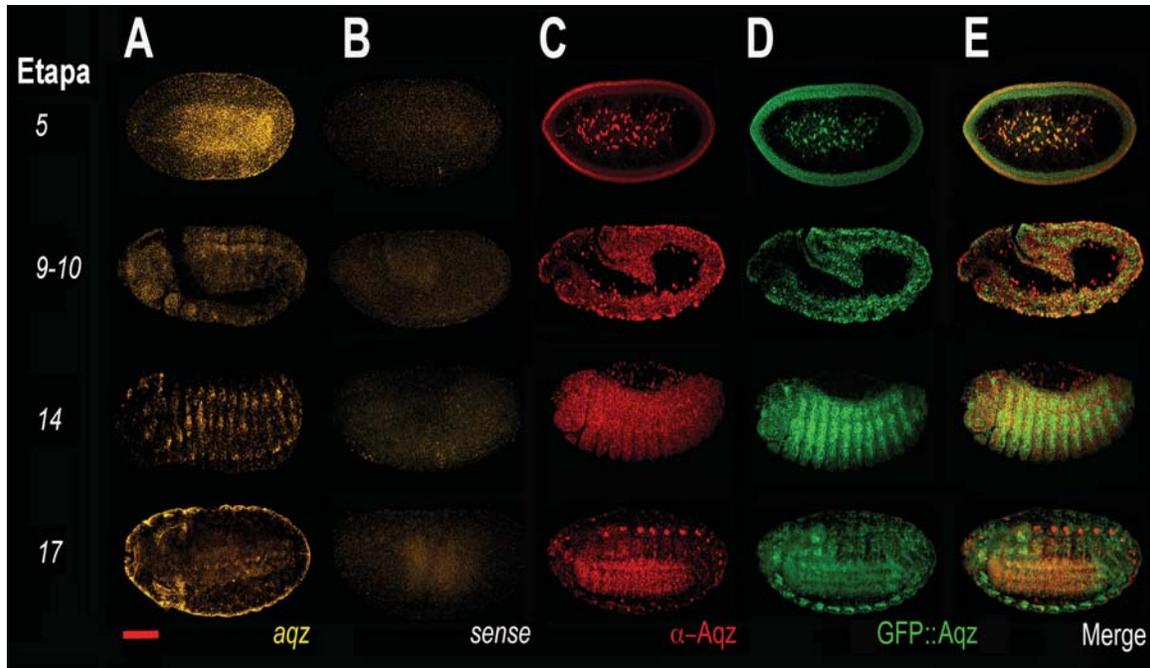


Figura 28. Patrón de expresión de Aqz y GFP::Aqz durante el desarrollo embrionario comparado con la expresión de los transcritos aqz. Los transcritos *aqz* y las proteínas Aqz que este gen codifica se expresan al inicio de la embriogénesis (contribución materna) y durante la formación de los tejidos germinales, en especial el ectodermo y tejidos derivados del ectodermo. (A) Expresión de los transcritos *aqz* detectados por hibridación *in situ* con la sonda antisentido *aqz* 5' en embriones de diferentes etapas. (B) Resultados del control negativo con la sonda sentido *aqz* 5' (ambas sondas se generaron a partir del cDNA LD47990 ó *aqz* 3'). En las imágenes, se observa una vista lateral de los embriones con la parte anterior orientada hacia la izquierda y la parte dorsal hacia arriba. En la última línea de embriones, se muestra una orientación ventrolateral para evidenciar el SNC. La proteína Aqz detectada con el anticuerpo anti-Aqz (C), o con anti-GFP (D) para observar la proteína quimérica GFP::Aqz en los mismos embriones. Ambas tinciones son coincidentes (E), excepto las células del sistema nervioso periférico y algunas células de la amnioserosa, las cuales solamente se tiñen con el anticuerpo anti-Aqz. Las etapas 5 representan un embrión una etapa del blastodermo celular. En la etapa 9, se representa la extensión de la banda germinal. La etapa 14 representan la retracción de la banda germinal e inicio del cerrado dorsal. La etapa 17 es el fin de la embriogénesis. La barra roja de la escala equivale a 100 μm .

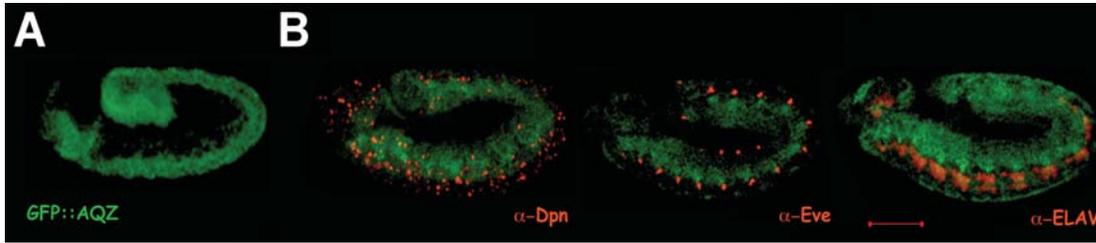


Figura 29. GFP::Aqz no se expresa en las células precursoras, pero sí en el tejido nervioso diferenciado. Imágenes de microscopía confocal de inmunohistoquímica en embriones heterocigotos aqz^{GFP} , donde se observa la expresión de GFP::Aqz (en verde). (A) Embrión durante la elongación de la banda germinal y (B) embriones durante la retracción de la banda germinal. Los embriones en (B) fueron inmunoteñidos con α -Dpn (neuroblastos) y α -Eve (células madre ganglionares) para marcar las células precursoras y con α -ELAV para marcar tejido nervioso diferenciado (en rojo). Se logra observar una presencia leve de GFP::Aqz al inicio de la diferenciación del SN (en amarillo). Todas las imágenes se presentan en una vista lateral. La barra roja de la escala equivale a 100 μ m.

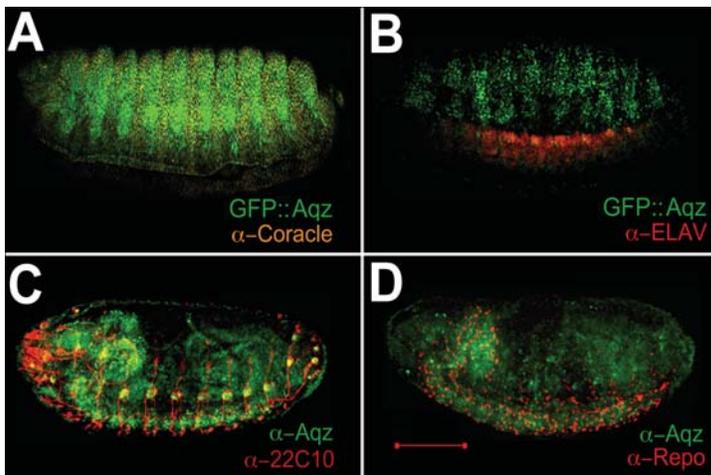


Figura 30. Expresión de GFP::Aqz en la epidermis y en el sistema nervioso. GFP::Aqz y Aqz se expresan en el tejido nervioso. (A y B) Dobles tinciones en embriones heterocigotos aqz^{GFP} durante la etapa 15-16. En ambas tinciones se utilizó anti-GFP para observar la expresión de GFP::Aqz. (A) Patrón de expresión de GFP::Aqz (verde)

coincidente con la expresión del marcador de epidermis (anti-Coracle, amarillo). (B) Patrón de expresión de GFP::Aqz (verde), junto con la expresión del marcador de neuronas del SNC (anti-Elav, rojo). Al igual que la doble tinción anterior, se observa la coincidencia en ambos patrones de expresión en los cuerpos celulares de las neuronas (amarillo), demostrando la expresión de GFP::Aqz en el SNC. En C y D, se muestran dobles tinciones en embriones silvestres. En ambas tinciones se utilizó anti-Aqz para observar la expresión de Aqz. (C) Tinción de Aqz (verde), en donde se utilizó el anticuerpo monoclonal 22C10 (rojo) para marcar algunos cuerpos celulares y axones del SNC y SNP. Se observa un patrón coincidente entre ambas tinciones, demostrando la expresión de Aqz en células del SNC y SNP (amarillo). En contraste, en (D), se observa que sólo algunas células gliales (marcadas con anti-Repo, rojo) muestran un patrón de expresión

coincidente con anti-Aqz. Esto demuestra que posiblemente sólo algunas células gliales expresan Aqz. La barra roja de la escala es equivalente a 100 μ m.

4. *aqz* tiene una función importante en el desarrollo del sistema nervioso durante la embriogénesis.

Debido a los fenotipos mutantes de *aqz*, presentados anteriormente en este trabajo, se tomó la decisión de estudiar primordialmente la aparición de los defectos en el desarrollo del SN en la etapa embrionaria. Para realizar esto, se tiñeron embriones mutantes en diferentes etapas y con diferentes marcadores de células precursoras del SN (grupo de equivalencia neural o células proneurales, neuroblastos y células madre ganglionares, Fig. 1, Tabla 3, Fig. 31). Como marcador del grupo de células proneurales, se utilizó un anticuerpo contra el factor de transcripción Achaete (Ac), como marcador de neuroblastos se utilizó un anticuerpo contra un factor de transcripción Deadpan (Dpn), presente en todos los neuroblastos [71], y como marcador de células madre ganglionares un anticuerpo contra Even-skipped (Eve), un factor de transcripción presente en las células madre ganglionares [11].

Anticuerpo	Antígeno	Tejido marcado
Anti-Ac	Factor de transcripción Achaete (Ac)	Células proneurales del neuroectodermo
Anti-Dpn	Factor de transcripción Deadpan (Dpn)	Neuroblastos
Anti-Eve	Factor de transcripción Even-skipped (Eve)	Células madre ganglionares

Tabla 3. Lista de anticuerpos marcadores utilizados para evaluar el desarrollo del SN en los mutantes de *aqz*.

Los embriones mutantes *aqz*^{MB041} tienen un incremento anormal en el número de células dentro del grupo de células proneurales en el tejido neuroectodérmico. En los mutantes, se observa que cada grupo de células proneurales contiene muchas células Ac⁺ adicionales comparado con el silvestre (Fig. 31A). Este resultado indica que *aqz* es necesario para la inhibición lateral. Esta definición irregular de un mayor número de células proneurales, puede derivar en la generación de un mayor número de neuroblastos, característica de

un fenotipo neurogénico. Los embriones mutantes aqz^{GFP} , teñidos con anti-Deadpan, para marcar los neuroblastos que se están delaminando durante la diferenciación del neuroectodermo, presentaron una tinción irregular. Algunas zonas en la parte anterior y ventral de los embriones muestran un aumento de la densidad de neuroblastos, mientras que otras zonas del embrión muestran una escasez de células marcadas (Fig. 31C-C''). Además, se observa que las células positivas para Deadpan (neuroblastos) presentan una distribución espacial irregular y en algunas zonas del embrión aparecen células ectópicas (Fig. 31C'). Para complementar estos resultados, en el mutante aqz^{GFP} , se observa una acumulación irregular de proteínas Aqz (en este ejemplo, la proteína quimérica GFP::Aqz). Esto se produce cuando hay poca o ninguna tinción de Deadpan (Fig. 31C). Un fenotipo similar se observa en aqz^{MB041} : células positivas para Deadpan (neuroblastos) se observan espaciadas de manera irregular y en mayor número, comparadas con la distribución en embriones control (Fig. 31E-I). La expresión de aqz aumenta en una etapa previa a la delaminación de los neuroblastos, cuando se establecen los grupos de células proneurales en el neuroectodermo, y disminuye cuando los neuroblastos se delaminan y empiezan a dividirse (divisiones asimétricas) para generar células madre ganglionares (Fig. 29). En aqz^{MB041} , se reduce la cantidad de células madre ganglionares y las pocas células que aparecen, presentan una distribución irregular a lo largo de la región ventral. Todo esto se observa utilizando el marcador anti-Eve (Fig. 31I y J). Derivado de estos últimos resultados, podemos proponer que la reducción de las células madre ganglionares en el tejido se debe a que los neuroblastos (células precursoras) no se transforman a células madre ganglionares, lo que explica el aumento de neuroblastos.

Los embriones mutantes aqz^{GFP}/aqz^{GFP} presentan un problema de diferenciación del ectodermo. El resultado es un incremento local de neuroblastos y la consecuente pérdida de la epidermis en algunos sitios de la región ventral (Fig. 32). Estos resultados coinciden con los defectos en el aumento de tejido neural ya diferenciado (neuronas), observado anteriormente. Al parecer la formación

de mayor cantidad de tejido neural en estos mutantes viene acompañada de una pérdida paralela de epitelio, manifestada por la pérdida de cutícula en la región ventral y en ocasiones en la región cefálica (Fig. 32). Estos defectos son la descripción de un fenotipo clásico neurogénico, fenotipo común a mutaciones de los genes que forman parte de la vía de señalización de Notch. La hiperplasia de células precursoras observada en los embriones mutantes de aqz^{GFP} , oscila desde la acumulación de pequeños grupos (Fig. 32), hasta un aumento considerable de neuroblastos en la parte anterior y ventral en el SNC del embrión (Fig. 31). El incremento en el número de neuroblastos en un 23% (n=15), es mas notable en embriones con defectos severos (Fig. 31C) comparados con embriones con defectos leves (Fig. 32A).

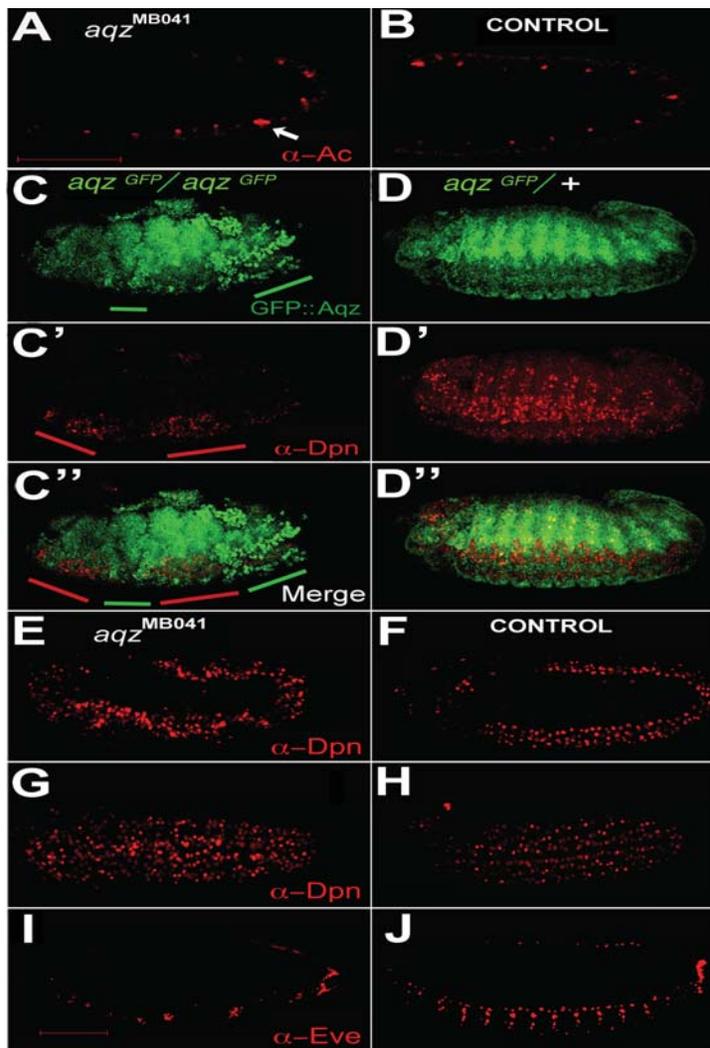


Figura 31. Defectos en el SN desde etapas tempranas de la formación de este tejido en individuos mutantes de aqz . Embriones homocigotos (columna izquierda) y heterocigotos (controles, columna derecha) del alelo de aqz indicado. Los embriones fueron teñidos con marcadores para células precursoras del SN. Identificación del grupo proneural marcados con anti-Achaete en embriones aqz^{MB041} (A) y su control (B). En el embrión homocigoto, las poblaciones de células proneurales muestran patrones de coloración irregular en algunos grupos de células. Se observan mayor número de células positivas para este marcador en algunos grupos (flecha blanca). (C) Expresión de Aqz evaluada

con GFP en embriones GFP::Aqz. Las líneas verdes marcan partes del embrión con expresión anormal de GFP::Aqz, en comparación con un embrión heterocigoto (D), donde la señal de GFP::Aqz se distribuye de forma homogénea. En C', se identifican los neuroblastos (Dpn⁺) que presentan una distribución agrupada e irregular a lo largo del neuroectodermo (comparada con su control en D', que muestra una disposición regular de los neuroblastos). Las líneas rojas marcan el territorio con abundantes neuroblastos. C'' y D'' muestran el empalme de las imágenes. (E-H) Identificación de los neuroblastos en embriones *aqz*^{MB041} durante extensión / retracción de la banda germinal (E-F) y la condensación del SN (G-H). En ambas etapas, se observa un número y distribución irregular de neuroblastos, (I y J) Identificación de las células madre ganglionares (Eve⁺), en embriones *aqz*^{MB041} durante la etapa 16. Se observa una disminución de células madre ganglionares en el embrión homocigoto mutante (compárese I con J). La barra de escala equivale a 100µm.

5. Interacciones genéticas de *aqz* con los genes de la vía de Notch (genes neurogénicos).

La vía de señalización de Notch se usa reiterativamente en muchos eventos durante el desarrollo animal. La señalización a través de Notch, mecanismo descrito en la introducción de esta tesis, es esencial para el desarrollo del embrión e indispensable para la regeneración del tejido en el adulto. Además, desempeña un papel crucial en varias enfermedades en humanos [35].

Una de las funciones de Notch mejor caracterizadas es su intervención en la diferenciación del neuroectodermo en moscas y vertebrados. Esta es una función permisiva en la cual contribuye a la toma de decisión entre dos destinos celulares alternativos. Esto suele pasar dentro de un conjunto grande de células en un epitelio (inhibición lateral) o entre dos células hermanas (divisiones asimétricas celulares) [33].

Cuando se bloquea la vía de Notch, el proceso de inhibición lateral no se lleva a cabo y se forman células precursoras en exceso (fenotipo neurogénico), lo que conlleva a una hiperplasia del tejido neural con una pérdida paralela de la epidermis [35]. Los fenotipos embrionarios de los mutantes de *aqz* se asemejan

en mucho a los fenotipos neurogénicos de mutaciones en los elementos de la vía de señalización de Notch, durante la neurogénesis temprana.

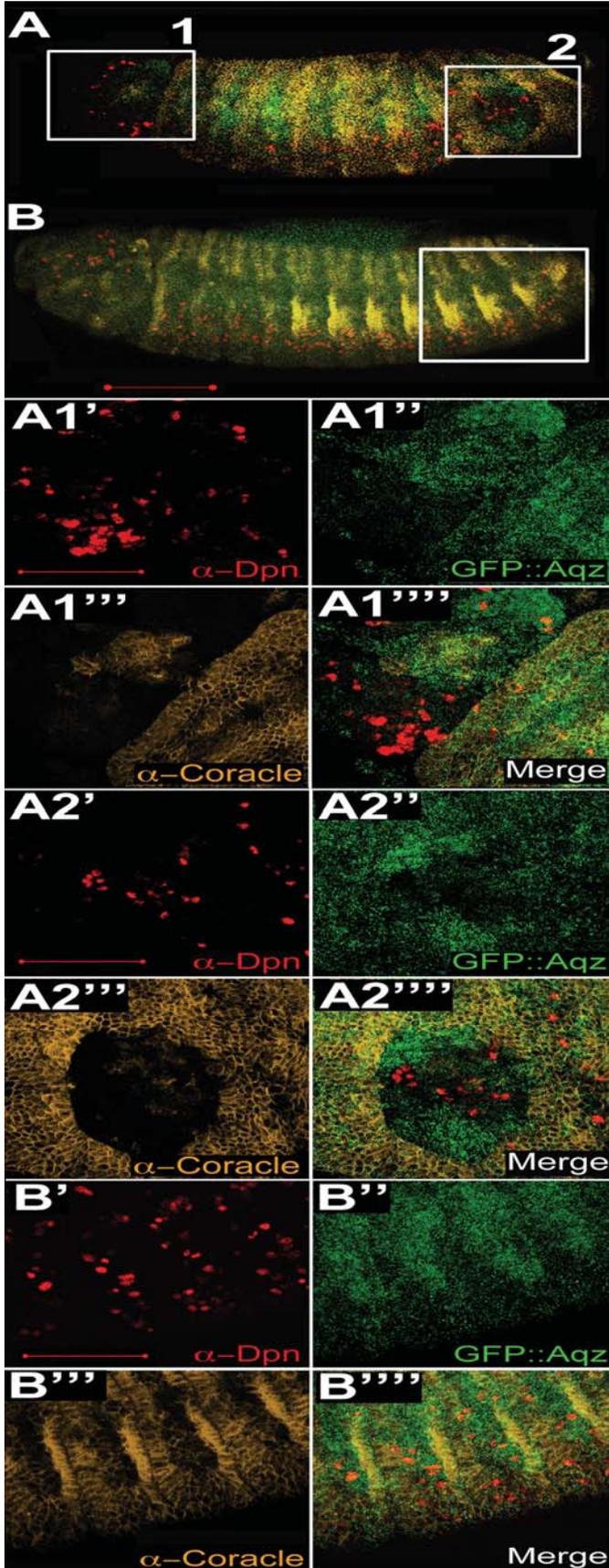


Figura 32. Los embriones homocigotos mutantes aqz^{GFP} presentan fenotipos neurogénicos. (A y B) Vistas laterales de embriones homocigotos aqz^{GFP} (parte superior) y heterocigotos aqz^{GFP} (parte inferior) teñidos con anti-Deadpan para marcar los neuroblastos (en rojo), anti-Coracle para marcar epitelios (amarillo), además se observa la expresión de GFP de la proteína GFP::Aqz (verde). La barra de escala equivale a 100 μm (A) Recuadros, dos regiones distintas que muestran la distribución irregular de los marcadores: A1 y A2, estas regiones irregulares están encerradas en rectángulos blancos y ampliadas en la parte inferior. Para comparación, un área similar de un embrión heterocigoto se muestra en B como control. A1', A2' y B' muestran la tinción anti-Deadpan ampliada (rojo); A1'', A2'' y B'' muestran la imagen ampliada de la expresión de la proteína GFP::Aqz, A1''', A2''' y B''' muestran la imagen ampliada de la tinción anti-Coracle, mientras que A1'''', A2'''' y B'''' muestran las imágenes empalmadas de las ampliaciones. La barra de escala equivale a 50 μm .

Los individuos mutantes para los genes de la vía de Notch elegidos para estudiar estas interacciones presentan defectos similares a los mutantes en *aqz*, en la epidermis y en el tejido nervioso (Tabla 4). Se analizaron individuos transheterocigos con mutaciones en *aqz* y en genes de la vía de Notch, así como experimentos en embriones con un genotipo sensibilizado donde la vía de Notch o la función de *aqz* están reducidas como efecto del genotipo probado (un gen es homocigoto mutante, y el otro heterocigoto).

Alelos de <i>aqz</i>	Alelos de la vía de Notch	Referencia	Proteína afectada
<i>aqz^{GFP}</i>	<i>DI^{RF}</i>	de Celis y col., 1996 [72]	Delta. Ligando de N.
<i>aqz^{MB041}</i>	<i>Kuz^{e29-4}</i>	Rooke y col., 1996 [73]	Kuzbanian. Proteasa que corta el dominio extracelular de N

Tabla 4. Alelos mutantes de *aqz* y alelos mutantes de los genes pertenecientes a la vía de Notch para evaluar las interacciones genéticas entre *aqz* y la vía de Notch. *DI^{RF}* (alelo de Delta), es un alelo con pérdida de función sensible a temperatura (25°C), y *kuz^{e29-4}* (alelo de *kuzbanian*), es un alelo amorfo.

Los alelos mutantes de *aqz* presentan los procesos de neurogénesis y epidermogénesis perturbados, con fenotipos similares a los mutantes de Notch, es decir fenotipos neurogénicos (Fig. 31 y 32) Con el fin de evaluar si *aqz* interacciona con la vía de Notch y determinar los vínculos con defectos neurogénicos, se realizaron experimentos de interacción genética con mutantes de la vía de Notch (Fig. 33 y 34). Las interacciones genéticas realizadas en un fondo genético sensibilizado, muestran que la versión heterocigota de *aqz^{GFP}* rescata significativamente la función de Delta [3]. Se utilizó un alelo de *DI* sensible a temperatura (*DI^{RF}*). Este alelo mostró una interacción genética con *aqz^{GFP}* a dos temperaturas diferentes: una a 25°C, donde todavía hay una

función significativa de Delta (Fig. 33A) y a 29°C, donde hay muy poca o nula función Delta (Fig. 33B). La versión heterocigota u homocigota de aqz^{GFP} , bajo un fondo homocigoto de DI^{RF} , reduce el número de embriones con fenotipo neurogénico. Por el contrario, una copia de DI^{RF} no altera el número de embriones con los fenotipos neurogénicos en homocigotos aqz^{GFP} . Derivado de estos resultados se puede establecer que la función de aqz se encuentra antes (“aguas arriba” o “upstream”) o en paralelo con respecto a la función de DI^{RF} .

Consistentemente con la identidad como alelo de ganancia de función de aqz^{MB041} , las interacciones genéticas entre aqz^{MB041} y DI^{RF} , muestran el efecto opuesto: la versión heterocigota de aqz^{MB041} aumenta el número de embriones con los fenotipos mutantes neurogénicos en un fondo homocigoto de DI^{RF} , a ambas temperaturas (Fig. 33C-D). En este caso, al igual que en el anterior, aqz^{MB041} actúa aguas arriba o en paralelo a DI^{RF} . Se obtuvieron resultados similares para las interacciones con Kuzbanian (Kuz), la metaloendopeptidasa ADAM que procesa el receptor Notch, y aqz^{MB041} . aqz^{MB041} reduce los fenotipos mutantes de *Kuz* (Fig. 34). En conjunto, estos resultados son consistentes con que aqz interacciona con la vía de Notch.

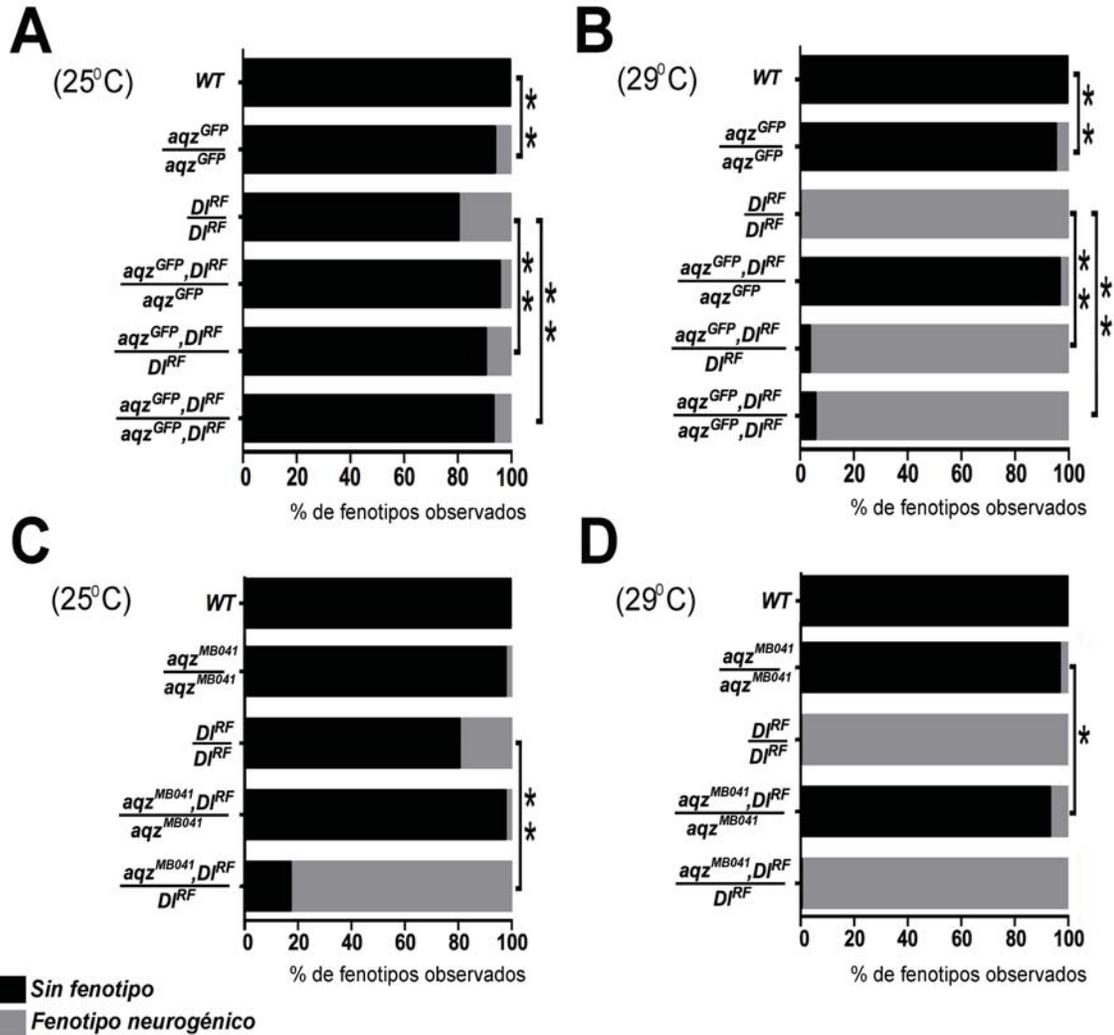


Figura 33. Los alelos aqz^{GFP} y aqz^{MB041} interactúan genéticamente con genes neurogénicos. (A y B) Interacciones genéticas entre aqz^{GFP} y Δ^{RF} (DI^{RF}) a 25°C y 29°C, respectivamente. DI^{RF} es un alelo sensible a la temperatura. (A y C) Alelo homocigoto DI^{RF} a 25°C presenta un 80% de embriones sin fenotipos neurogénicos. (A) Este porcentaje se reduce de manera cuando se agregan copias mutantes de aqz^{GFP} . A los 29°C (B y D), todos los embriones homocigotos DI^{RF} tienen fenotipos neurogénicos. (A) Al agregar copias mutantes de aqz^{GFP} en el fondo genético sensibilizado para DI , conducen a un rescate parcial pero significativo. Por el contrario, una copia de DI^{RF} no altera el porcentaje de embriones homocigotos mutantes aqz^{GFP} con fenotipo neurogénico. En el fondo genético de aqz^{GFP} solamente se ve en 6-8% de los embriones mutantes con fenotipo neurogénico. En (A y B), * denota diferencias significativas ($p < 0,5$) entre las comparaciones señaladas. (C y D) Interacciones genéticas entre aqz^{MB041} y Δ^{RF} (DI^{RF}) a 25°C y 29°C, respectivamente. El mutante aqz^{MB041} aumenta de manera significativa el fenotipo neurogénico que presenta el alelo DI^{RF} . (C) A 25°C, sólo el 20% de los embriones mutantes DI^{RF} tienen un fenotipo neurogénico, y

esto se aumenta en un 80% cuando se agrega una copia mutante de aqz^{MB041} . Por el contrario, la copia mutante de DI^{RF} no altera el bajo porcentaje de fenotipos neurogénicos en aqz^{MB041} . (D) A 29°C el fenotipo neurogénico presentado por el alelo aqz^{MB041} se ve aumentado significativamente por una copia mutante de DI^{RF} . Dado que a 29°C todos los mutantes homocigotos DI^{RF} tienen un fenotipo neurogénico, no se observa ninguna mejora añadiendo una copia mutante de aqz^{MB041} . En (C) y (D) * denota diferencias significativas ($p < 0,5$) entre las comparaciones señaladas.

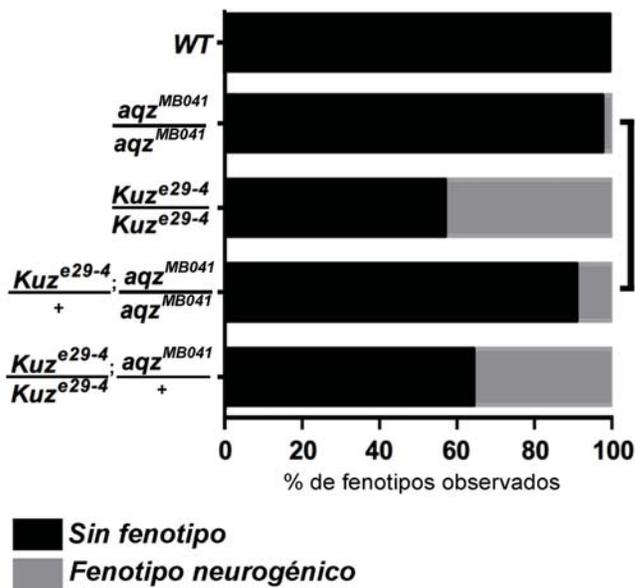


Figura 34. aqz^{MB041} interacciona genéticamente con genes neurogénicos. Las mutaciones en *Kuzbanian* (*Kuz*) mejoran significativamente el fenotipo neurogénico en aqz^{MB041} , pero aqz^{MB041} no mejora el fenotipo mutante neurogénico presentado por los alelos de *Kuz*. En la figura * denota diferencias significativas ($p < 0,5$) entre las comparaciones señaladas.

6. Aqz y el control de la polaridad del epitelio.

¿Cómo puede afectar Aqz a la señalización de Notch durante el desarrollo del sistema nervioso? Una de las posibilidades es que Aqz esté alterando la polaridad de las células epiteliales durante el proceso de inhibición lateral o divisiones asimétricas, que se sabe afecta a la localización apical de DI y, en consecuencia, su interacción con el receptor Notch [22]; [18]. Con el fin de estudiar la polaridad epitelial y la posible función de aqz en este proceso, hemos utilizado anticuerpos contra diferentes marcadores de polaridad epitelial para observar su expresión en embriones mutantes aqz^{GFP} . Se utilizaron anticuerpos anti-Crumbs (anti-Crb) como un marcador de la región apical del epitelio, y

anticuerpos anti-Discs large (anti-Dlg) como un marcador de la región basolateral (Fig. 35). Los resultados de las inmunotinciones muestran que la región apical del epitelio se ve comprometida, ya que se muestra una señal reducida de Crb (Fig. 35A), mientras que la región basolateral se expande, esto debido a que la señal con Dlg se ve aumentada (Fig. 35C). Una vez que se corroboró que la polaridad epitelial está comprometida en los mutantes *aqz^{GFP}*, el siguiente paso a analizar era la estabilidad de las uniones adherentes y también la regularidad de la expresión de DI en el embrión mutante (Fig. 36). Se utilizaron anticuerpos anti-DEcadherina como un marcador de uniones celulares adherentes. Las uniones celulares adherentes también se ven alteradas, ya que la tinción de DEcadherina muestra una reducción significativa y un patrón irregular en los embriones homocigotos *aqz^{GFP}*. Algo muy similar ocurre con la expresión de DI, que también se reduce y es irregular (Fig. 36A-D).

Tomando en cuenta los últimos resultados (los efectos sobre la polaridad del epitelio y la consiguiente alteración de la expresión de DI, además de las interacciones genéticas entre *aqz* y la vía de señalización de Notch), se puede sugerir que el origen de los fenotipos neurogénicos, así como los fenotipos tempranos en el desarrollo del ectodermo, en mutantes de *aqz* se deben a alteraciones en la polaridad celular. Esto implica que los defectos de polarización de células precursoras (neuroblastos) puede ser la causa última de los defectos mutantes de *aqz* y la posterior letalidad, y además proporcionar una explicación para la participación temprana de *aqz* en el desarrollo de los tejidos derivados del ectodermo.

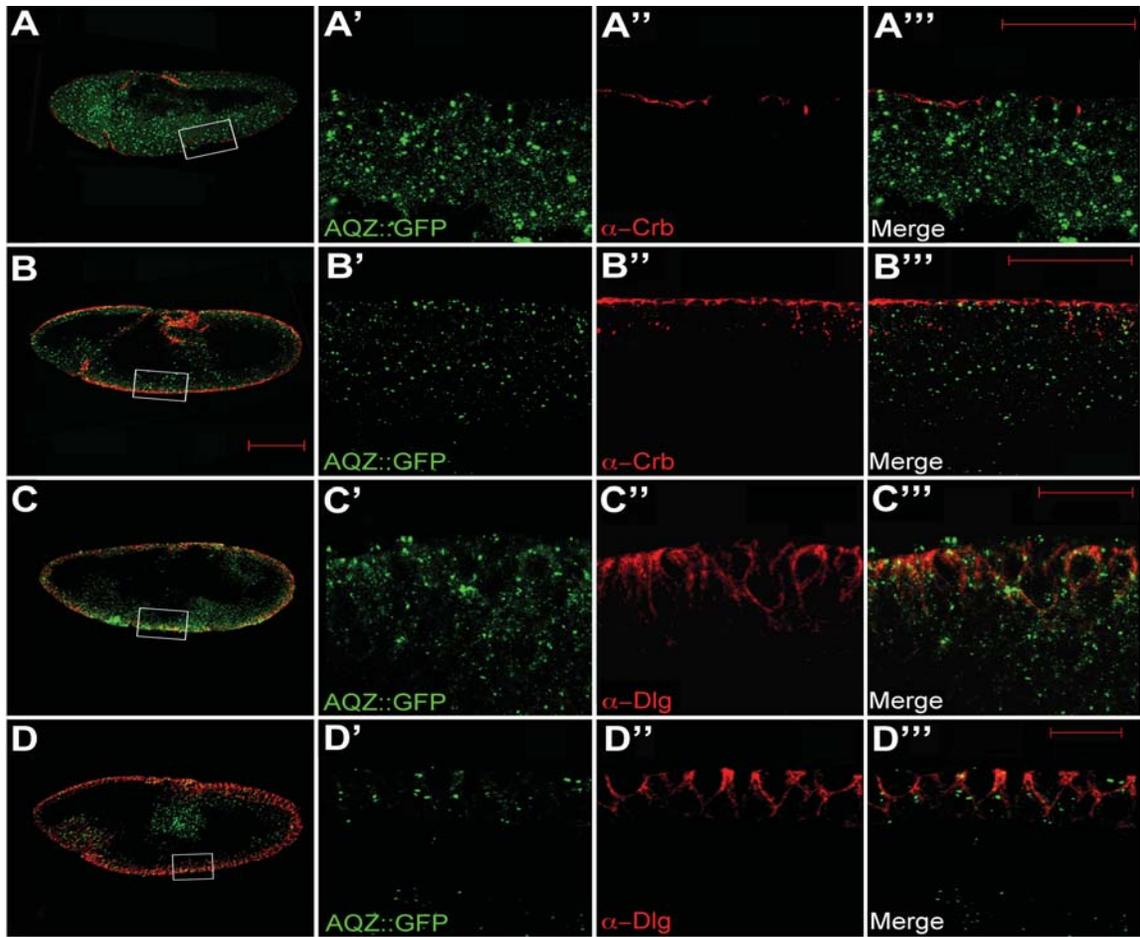


Figura 35. Los embriones mutantes de *aqz* presentan un neuroepitelio con defectos de polaridad. Embriones homocigotos (A y C), y heterocigotos (B y D) de *aqz*^{GFP}. Las barras de escala equivalen a 100 μ m. Expresión de la proteína GFP::Aqz (A'-D'), anti-Crums (A"-B", rojo), anti-Dlg (C"-D", rojo), y empalme (A'''-D'''). La barra de escala equivale a 50 μ m. Crumbs [72] y Dlg (C-D) se expresan de una manera irregular en los mutantes, en comparación con los controles, lo que evidencia los defectos de polaridad.

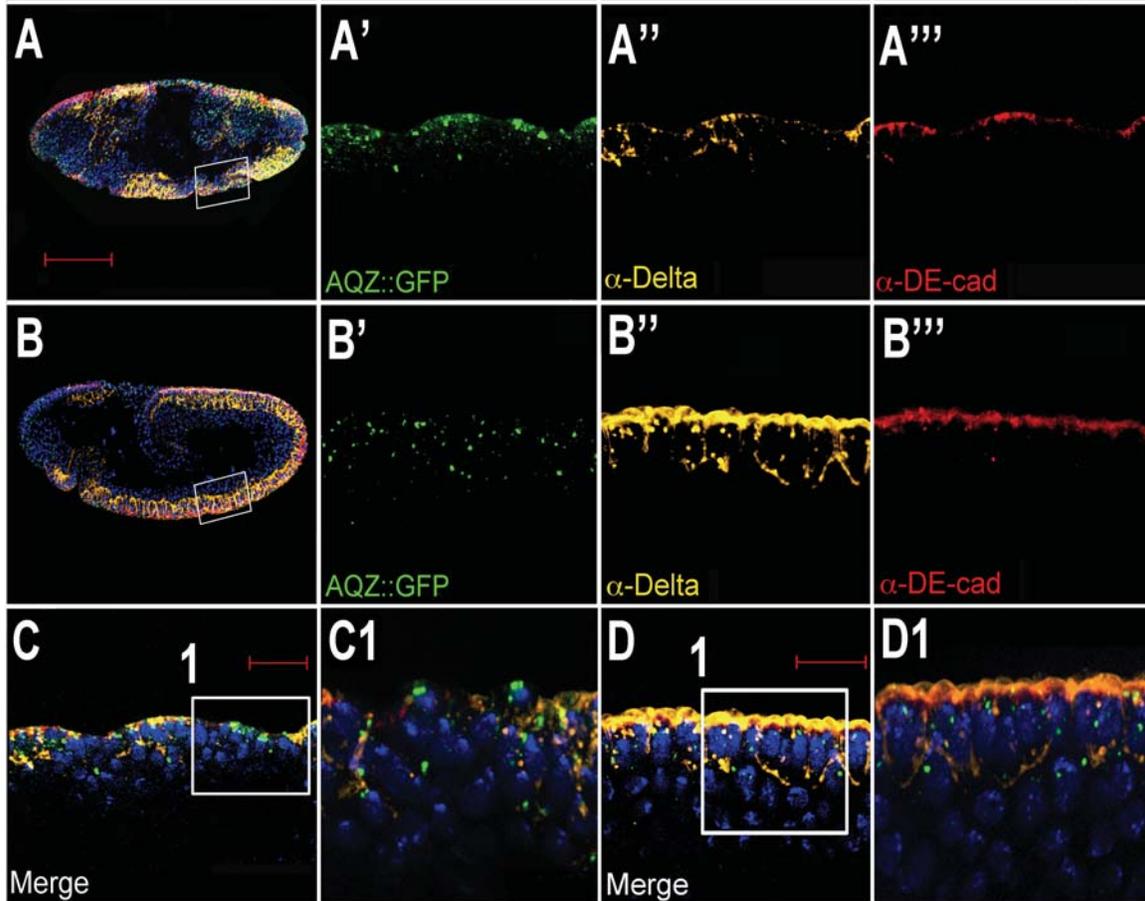


Figura 36. Los embriones mutantes de presentan un neuroepitelio con defectos en la uniones adherentes e irregularidad de la expresión de DI. Embrión homocigoto (A) y heterocigoto (B) de *aqz^{GFP}*. Vista lateral de embriones en etapas posteriores al cerrado dorsal, con la parte anterior a la izquierda y dorsal hacia arriba. Las barras de escala equivalen a 100 μm . Expresión de la proteína GFP::Aqz (A'-B' verde), anti-Delta (A"- B" amarillo) y anti-DE-cadherina (A'''- B''' rojo). La barra de escala equivale a 50 μm . Delta (A"-B" amarillo) y DE-cadherina (A'''-B''' rojo) se expresan de una manera irregular en los mutantes, en comparación con los controles, lo que evidencia los defectos de polaridad. Empalme de imágenes ampliadas de todos los marcadores utilizados en los experimentos anteriores, embrión homocigoto (C) y embrión heterocigoto (D). C1 y D1, muestran ampliaciones de C y D, respectivamente (cuadro blanco).

7. Análisis de la expresión y caracterización de los fenotipos mutantes de la ferritina durante la etapa embrionaria.

7.1 Los mutantes de los genes que codifican para la ferritina presentan defectos en la formación de cutículas embrionarias.

Para caracterizar el fenotipo letal embrionario de los mutantes de ferritina se analizaron las cutículas de los alelos de pérdida de función *Fer1HCH*⁴⁵¹ y *Fer2LCH*³⁵ [49]; [74], una mutación nula para ambos genes de ferritina *Df(3R)Fer* [51], una línea de *Fer1HCH*^{G188} (GFP::*Fer1HCH*) [49] y también un nuevo alelo que se describe por primera vez: *Fer2LCH*^{Δ17}. Este último alelo, al evaluarlo en cruces genéticas, no complementa con *Fer1HCH*⁴⁵¹, *Fer1HCH*^{G188} y *Fer2LCH*³⁵. Los resultados de este análisis revelaron una gran variedad de defectos cuticulares a lo largo del desarrollo embrionario, desde pequeños orificios en la parte anterior y dorsal del embrión, a la pérdida gradual de la cutícula, hasta la presencia de embriones con una total ausencia de la cutícula. Estos fenotipos sugieren que la ferritina es necesaria en varias ocasiones durante el desarrollo embrionario (Fig. 34).

7.2 La contribución materna de la ferritina influye en el desarrollo embrionario.

La ferritina presenta contribución materna [49]. Para desenmascarar la presencia de fenotipos cuticulares tempranos en los mutantes cigóticos, se decidió alterar la contribución materna en estos embriones. Para esto, se recurrió a dos estrategias: 1) Restringir la disponibilidad de hierro en las madres y 2) La generación de clones de la línea germinal sin ferritina en moscas hembras. Una forma de reducir la expresión de ferritina en los adultos es añadir un quelante específico para hierro en la dieta de la mosca [51]; [54]. Los embriones homocigotos mutantes, derivados de las cruces de adultos heterocigotos que fueron cultivados con alimento que contenía 200 μM de ácido disulfónico batofenantrolina (BPS, véase Materiales y Métodos), mostraron un aumento de la incidencia del fenotipo de ausencia total de cutícula (de ~15% a ~30%; Fig. 34F con BPS). La ausencia de la cutícula en estos embriones se debe

probablemente a una muerte embrionaria temprana antes de la diferenciación epidérmica, lo que sugiere una función temprana para la ferritina en la diferenciación de la epidermis.

Los fenotipos embrionarios en las etapas finales de este proceso también se hicieron más frecuentes: una cantidad mayor de embriones en forma de U, aumentada del ~2% al ~4%, y los embriones que no completaron el cierre dorsal aumentaron del ~1% al ~4% (Fig. 37). Al mismo tiempo, se redujo el porcentaje de cutículas control. Estos resultados muestran que el grado de contribución materna de la ferritina está regulada por la disponibilidad de hierro en la mosca. El cambio de porcentaje de fenotipos cuticulares se observó de manera similar en los alelos *Fer1HCH*⁴⁵¹, *Fer2LCH*³⁵, y *Df(3R)Fer*. Cuando aumentan los niveles de hierro en el alimento de los adultos, esto no da lugar a un rescate del fenotipo de la progenie mutante (Fig. 37). A pesar de que los niveles totales de ferritina en las madres se incrementaron, no fue suficiente para el rescate total de la embriogénesis.

Para explorar a fondo si la ferritina materna está rescatando parcialmente los fenotipos mutantes cigóticos, especialmente durante el desarrollo temprano del embrión, generamos clones de línea germinal. La mayoría de los clones de línea germinal no presentaron cutícula y en el resto, las cutículas tienen hoyos en la parte anterior y dorsal, en diferente grado de severidad. El fenotipo de ausencia total de cutícula aumentó significativamente desde un ~15% a un 80% (Fig. 37). Esto se rescató parcialmente con BPS. Se postula que este rescate con BPS se dio debido a que los genes cigóticos de la ferritina están sobreexpresados en respuesta a la falta de ferritina materna y que el hierro en estos embriones fue distribuido al ovocito en desarrollo por otros medios.

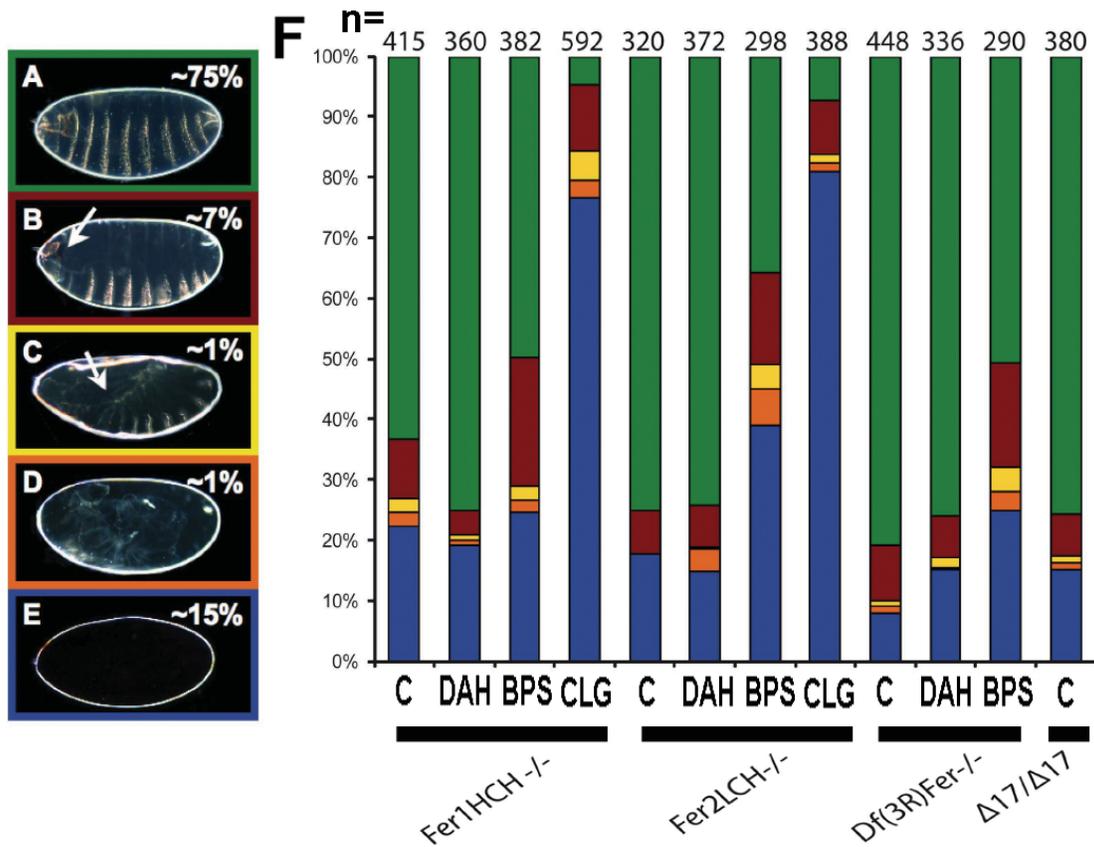


Figura 37. Los alelos mutantes de la ferritina presentan una gran variedad de fenotipos embrionarios. (A) Cutícula de un embrión control (verde). (B-E) Defectos que presentan las cutículas de embriones homocigotos mutantes para la ferritina durante el desarrollo embrionario. (B) en la involución de la cabeza (rojo), (C) en el cerrado dorsal (amarillo), (D) en la retracción de la banda germinal (naranja) y (E) en etapa temprana donde no hay formación de cutícula. Los embriones mutantes presentan orificios de diferente magnitud en la parte anterior y ventral (flechas blancas), así como ausencia de la cutícula. (F) Porcentajes de fenotipos mutantes cuticulares de la ferritina. Se observó un aumento en el porcentaje de fenotipos mutantes de ausencia de cutícula en los embriones mutantes cuyas madres fueron alimentadas con BPS. El 80% de los embriones mutantes generados a partir de clones de la línea germinal no desarrollaron cutícula. C: Dieta normal, DAH: Dieta con alto contenido de hierro, BPS: Dieta baja en hierro, CLG: clones de la línea germinal, n: número de cutículas.

7.3 Los mutantes de la ferritina presentan defectos en el SNC.

Un porcentaje de los embriones mutantes de la ferritina mueren en las etapas finales de la embriogénesis con una cutícula aparentemente normal. Con la intención de ubicar más defectos en estos mutantes y caracterizar ampliamente la función de la ferritina, se tomó la decisión de estudiar los tejidos internos del embrión que podrían verse afectados por la falta de esta proteína. Dado que la ferritina en larvas de primer estadio se concentra en el intestino y el SNC [75], se optó por evaluar si el SNC se desarrolla normalmente en los mutantes de ferritina. Se hicieron experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos contra marcadores neuronales para evaluar las posibles alteraciones en este tejido. Anti-Elav, que marca todos los núcleos neuronales, muestra que los mutantes de ferritina presentan secciones con ausencia de la señal de este marcador, en los segmentos abdominales del SNC (Fig. 38). Adicionalmente, se observaron fenotipos más severos, aunque en un menor número de embriones: una condensación aberrante del SNC, una cadena ganglionar doblada, y la ausencia de tejido de algunas regiones del cerebro y SNP.

Para observar a mayor detalle si había alguna alteración en las proyecciones neuronales en el SNC, se utilizó el marcador anti-BP102, que tiñe los axones. Esta tinción muestra que los axones del SNC presentan proyecciones irregulares y desorganizadas en estos embriones mutantes (Fig. 39I-J).

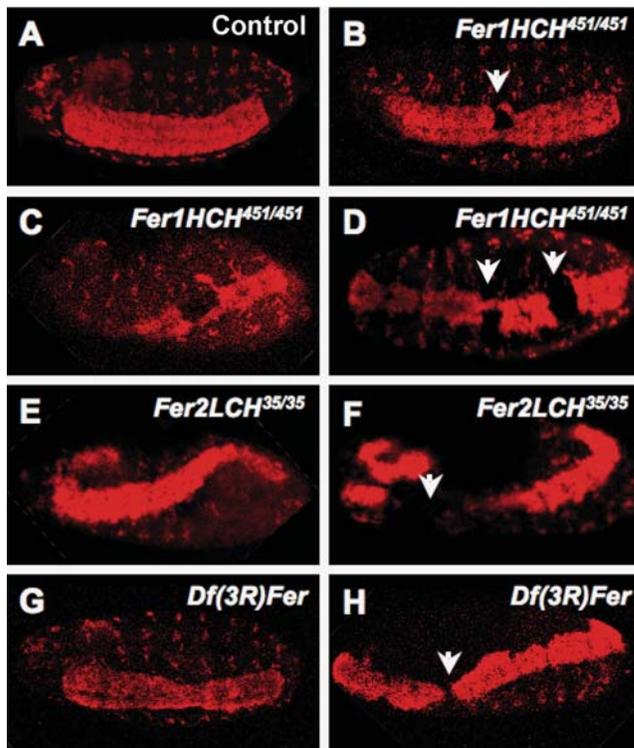
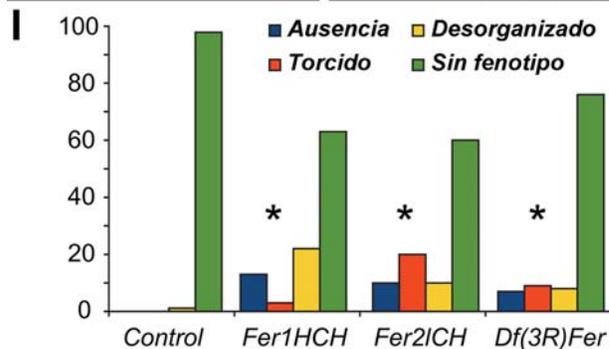


Figura 38. Los alelos mutantes de la ferritina presentan fenotipos mutantes en el SNC. Comparación del SNC de un embrión de control (A) con embriones homocigotos mutantes de la ferritina *Fer1HCH⁴⁵¹* (B, C y D), *Fer1HCH³⁵* (E y F) y *Df(3R)Fer* (G y H). El SNC de algunos embriones mutantes de la ferritina, comparados con el embrión control (A), presentan la cadena ganglionar ventral torcida y con un alto grado de desorganización estructural (C y E). Otros embriones presentan ausencia del tejido nervioso en la parte ventral y en el cerebro (flechas blancas, B, D, F, H). Todos los embriones están orientados con una vista ventrolateral y con la parte anterior a la izquierda. (I) Cuantificación de los defectos en el sistema nervioso embrionario que presentan los diferentes alelos mutantes de la ferritina. * denota las diferencias estadísticas de los embriones mutantes y el control ($p < 0.0001$, $n = 32, 10$ y 132 embriones, respectivamente)



Como lo mencionamos anteriormente durante la caracterización *aqz*, los defectos en los tejidos del SNC y SNP en etapas finales de la embriogénesis, pueden ser consecuencia de irregularidades en el desarrollo y diferenciación de las células precursoras (neuroblastos y células madre ganglionares). Con el fin de comprobar si el desarrollo del SN de los embriones mutantes de la ferritina se encuentra alterado en etapas tempranas, se recurrió a la tinción de las células precursoras neurales, los neuroblastos (anti-Deadpan) y las células madre ganglionares (anti-Eve) [76]; [77]. Las tinciones con anti-Deadpan, que marca todos los neuroblastos, indican que los defectos del SNC ya están presentes en

etapas tempranas, ya que hay una distribución irregular y en algunos embriones ausencia de neuroblastos en la parte ventral del embrión (Fig. 39A-D). Como era de esperar, también en la tinción con anti-Eve, se observa que las células madre ganglionares presentan defectos en organización y distribución en la cadena ganglionar ventral (Fig. 39E-H).

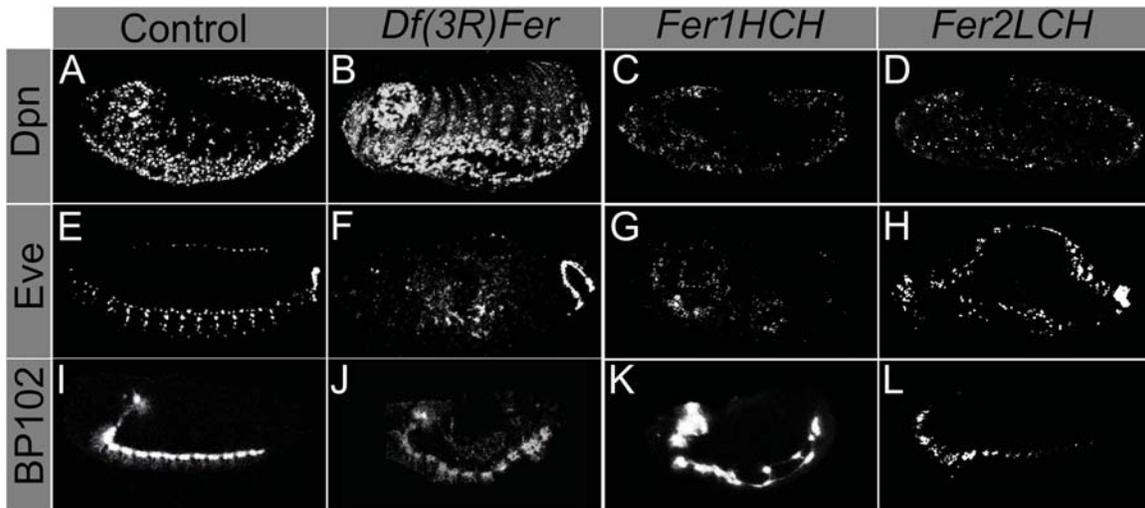


Figura 39. Alteraciones en el desarrollo del SN en mutantes de la ferritina. (I) Embrión control con un patrón de distribución regular de los axones. (J-L) Embriones homocigotos mutantes *Df(3R)Fer*, *Fer1HCH* y *Fer2LCH* presentan la cadena ganglionar ventral retorcida y con espacios vacíos entre cada segmento ventral. Los axones del cerebro y de la cadena ganglionar ventral tienen un patrón irregular. (A-H) Distribución de dos poblaciones diferentes de células precursoras neuronales (neuroblastos y células madre ganglionares), marcada por anti-Dpn y anti-Eve, respectivamente, en donde se observa una organización espacial característica en los embriones control (A y E). En los embriones homocigóticos mutantes *Df(3R)Fer* (B y F), *Fer1HCH* (C y G) y *Fer2LCH* (D y H), las poblaciones de neuroblastos están fuera de lugar y la distribución de las células madre ganglionares presentan una severa desorganización.

7.4 Los mutantes de la ferritina presentan activación de una apoptosis ectópica.

Varios estudios recientes han establecido una conexión entre el metabolismo del hierro y el proceso de apoptosis [78-80]. En relación con la anterior información, la aparición de los defectos en el SN de los embriones mutantes de la ferritina

podría estar dada por la muerte celular del tejido, mediante un mecanismo de apoptosis. Para probar esta hipótesis se utilizó un anticuerpo que reconoce exclusivamente las caspasas activas, anti-Caspasa3 activada (anti-CSP3act). Este marcador ya se ha utilizado en las moscas para marcar las células apoptóticas [81]. No se detectó señal apoptótica en embriones control en etapa 12 (Fig. 40). En contraste, apareció apoptosis ectópica en la región del neuroectodermo en embriones mutantes (Fig. 40). El tejido nervioso de los embriones control en etapas tardías presentan una actividad reducida de apoptosis. En los embriones control en etapa 15, se observa una señal apoptótica débil y restringida, mientras que en los embriones mutantes se observa una señal intensa, que cubre la mayor parte del embrión.

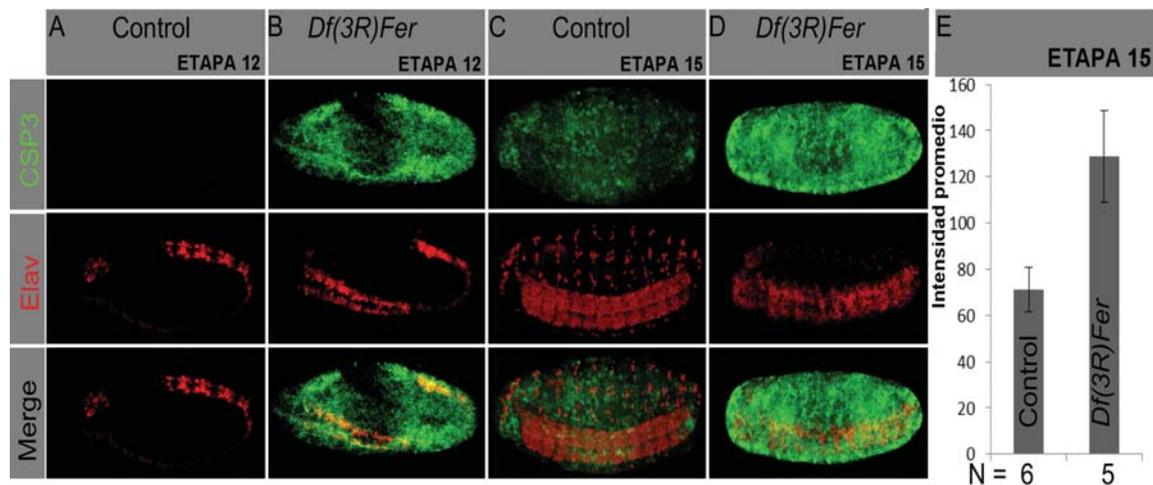


Figura 40. Los mutantes de ferritina presentan apoptosis en el SNC. Los embriones se tiñeron con un marcador de células apoptóticas: anti-CSP3act (verde), y con el marcador de neuronas anti-Elav (rojo). (A) muestra la ausencia de tinción para apoptosis en embriones control de etapa 12, mientras que en (B), la expresión del marcador apoptótico aparece en embriones homocigotos *Df(3R)Fer*. Se observa un notable aumento de expresión del marcador apoptótico en la región neurogénica. (C) Embriones control en la etapa 15. Estos embriones presentan una ligera apoptosis generalizada. (D) Embriones mutantes homocigotos *Df(3R)Fer* en la etapa 15. En estos embriones se observa una señal positiva intensa de apoptosis en todos los tejidos embrionarios comparando con el control. (E) Cuantificación de la intensidad media de la señal apoptótica (CSP3act) en la tinción del embrión control en comparación con el embrión mutante de ferritina en la etapa 15 de la embriogénesis (n=6 y 5 embriones, respectivamente; T de student, p=0.0113).

7.5 Localización y distribución de la ferritina durante el desarrollo embrionario.

El alelo mutante *Fer1HCH^{G188}* expresa una proteína quimérica GFP::*Fer1HCH* que en condiciones heterocigotas imita la expresión de la proteína endógena *Fer1HCH* [51]; [75]; [49]; [82]. La etiqueta GFP añadida a la subunidad *Fer1HCH* bloquea la función normal del complejo ferritina, ya que una copia mutante en heterocigotos *Fer1HCH^{G188}* es viable, pero en homocigosis son letales embrionarios [49]. Algunas moscas heterocigotas del alelo *Fer1HCH^{G188}* presentan una ligera reducción en la acumulación de hierro en la ferritina [51]. La expresión de la proteína GFP::*Fer1HCH* en un embrión homocigoto mutante *Fer1HCH^{G188}*, está drásticamente reducida de manera general, en comparación con la expresión de la proteína en embriones heterocigotos (Fig. 40). La presencia disminuida y restringida de la ferritina en los embriones homocigotos se observa principalmente acumulada en la región intestinal, sugiriendo la degradación de esta versión quimérica o la generación y acumulación de heteropolímeros no funcionales. El intestino del embrión podría ser una fuente transportadora de ferritina, ya que en esta región se acumula hierro de la dieta y ambos, mRNA y proteínas de la ferritina, están presentes [49]. Para observar la distribución de la ferritina en estos embriones mutantes, marcamos a los hemocitos. Estas son células grandes que circulan suspendidas en la hemolinfa o se encuentran asociadas a tejidos y desempeñan una función fagocítica e inmunológica [80]. Para confirmar que los hemocitos acumulan ferritina, se utilizó la línea *Cg-Gal4* para dirigir la expresión en los hemocitos de una proteína RFP-nuclear en el alelo *Fer1HCH^{G188}*. Se observó que la proteína GFP::*Fer1HCH* está presente en las mismas células positivas para *Cg-nRFP* (Fig. 41A). Adicional a este experimento, también se evaluó si la ferritina se localiza en el cuerpo graso del embrión. Para este ensayo se utilizó una línea *FB-Gal4* que dirige la expresión de nRFP al cuerpo graso del embrión. La expresión de GFP::*Fer1HCH* y *FB-nRFP* no son coincidentes, por tanto la GFP::*Fer1HCH* no está presente en el cuerpo graso (Fig. 41B).

Por otra parte, se observó que la morfología intestinal de los embriones homocigotos *Fer1HCH*^{G188} se vio afectada (Fig. 41C-F). Para probar si el transporte de la ferritina está afectado, bloqueamos la vía secretora intracelular por medio de una mutación letal en *Sec23*, *sec23*^{j13C8}. Esta mutación contiene la inserción de un elemento P en la región 5' no traducida ó UTR 5' (Untranslated Region '5) de *sec23* [53]. Si la ferritina es, en efecto transportada durante la embriogénesis, el bloqueo de la vía secretora impedirá en un principio su salida de la célula en la que se produce. La ferritina no se detectó en hemocitos en homocigoto *sec23*^{j13C8}; en lugar de ello, se detectaron agregados GFP::*Fer1HCH* principalmente en el intestino medio (Fig. 41H) en un patrón de expresión similar al observado en homocigotos mutantes *Fer1HCH*^{G188}. Por lo tanto, en los embriones con deficiencias en la vía secretora, los hemocitos dejan de acumular la ferritina. Esto último sugiere que en un embrión control, la fuente principal de ferritina puede ser la hemolinfa a partir del intestino.

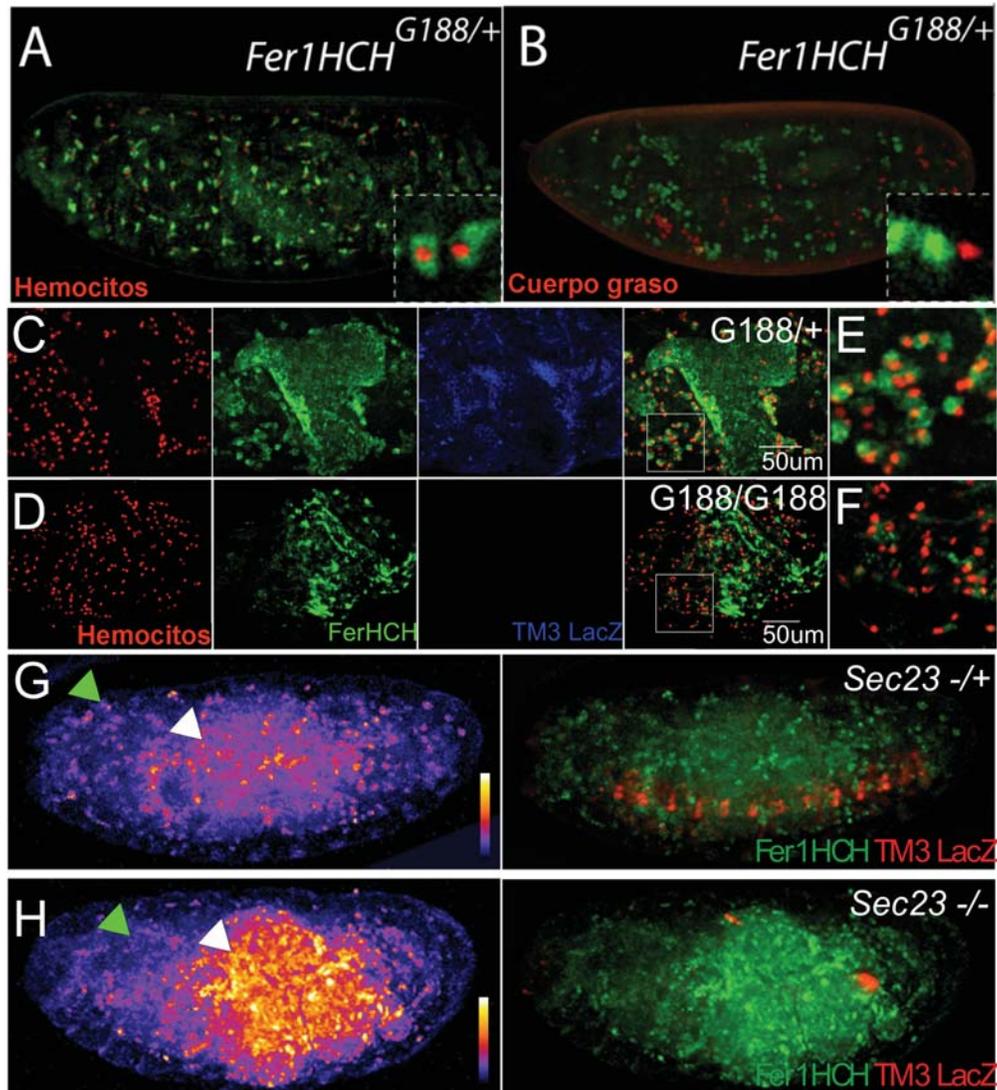


Figura 41. Acumulación de ferritina marcada en embriones con diferentes fondos genéticos. La cadena pesada de la ferritina (Fer1HCH) se visualizó en todos los embriones utilizando la línea *Fer1HCH^{G188}* (GFP::Fer1HCH, verde). En la etapa 17, los embriones heterocigotos *Fer1HCH^{G188}*, presentan la acumulación de ferritina principalmente en el intestino medio y hemocitos. (A) En esta etapa, la proteína GFP::Fer1HCH se encuentra en hemocitos teñidos con el marcador nuclear Cg-Gal4-RFP, pero no (B) en los cuerpos grasos marcados con FB-Gal4-RFP. (C-F) Los embriones homocigotos *Fer1HCH^{G188}*, al igual que otros mutantes letales de ferritina, muestran una acumulación intestinal ectópica de la proteína ferritina (D) y mucho menor acumulación en los hemocitos (F), en comparación con los controles heterocigóticos (C, E). (G, H) El bloqueo de la secreción de ferritina usando un fondo homocigoto mutante *sec23^{j13C8}* conduce a una disminución de los niveles de ferritina en los hemocitos (puntas de flecha verde) y la acumulación ectópica en el intestino (puntas de flecha blanca). La

intensidad de fluorescencia proveniente de la proteína GFP::*Fer1HCH* se muestra en el lado izquierdo de los paneles G y H utilizando una escala de intensidad de fluorescencia. Las escalas de fluorescencia se muestran en la parte inferior derecha de cada uno, con colores cálidos (rojo-naranja-amarillo-blanco) que denotan una mayor intensidad de la fluorescencia y colores fríos (azul-púrpura) que denotan los niveles más bajos de fluorescencia para el canal verde. Se observan niveles de fluorescencia más altos en el embrión mutante homocigoto *sec23* (H).

Discusión y conclusión.

En el caso de gen *aqz*:

aqz es un gen esencial durante el desarrollo embrionario, puesto que la pérdida de su función resulta en letalidad. Embriones mutantes para *aqz* presentan defectos en el sistema nervioso, como hiperplasias locales y defectos en axogénesis y conectividad neural, aunado a la pérdida de las estructuras epidérmicas. *aqz* se requiere en etapas tempranas del desarrollo embrionario y es posible que *aqz* regule eventos durante la diferenciación del ectodermo en conjunto con los genes que controlan la polaridad del epitelio y los genes neurogénicos de la vía de Notch.

aqz es un locus complejo que exhibe empalme ("splicing") alternativo y genera al menos cuatro diferentes mRNAs. Estos transcritos codifican para al menos tres diferentes productos proteicos que tienen en común el dominio PNRC (rico en prolina "Proline Rich Nuclear Receptor Co-activator") que es característico de receptores nucleares co-activadores de la transcripción. El genoma de *D. melanogaster*, además de *aqz*, alberga otro gen de función aun no caracterizada que codifica para proteínas con dominio PNRC, CG32797 (Fig. 6C, letras rojas). Tener un segundo gen con el mismo dominio conservado podría significar que son redundantes, o parcialmente redundantes y que algunas de las funciones pueden estar enmascaradas por la actividad del otro, incluso si han divergido y adquirido nuevas funciones

Tal es el caso de Legless (Lgs) y Pygopus (Pygo), aunque ambas proteínas son muy grandes solo una sección de ambos es importante para su función (30 y 50 aminoácidos, respectivamente). Tan es así que la versión humana de cada proteína, aunque tienen un bajo porcentaje de homología, expresadas de manera independiente en células de *Drosophila melanogaster* bajo un fondo mutantes para *Leg* y *Pygo*, respectivamente, rescatan el fenotipo [83]. Por esto último, es razonable sugerir que otra proteína con el dominio conservado PNRC

de Aqz puede también ser parcialmente redundante. En vertebrados, este dominio se ubica en proteínas que desempeñan una función de degradación de proteínas mediada por RNA anti-sentido [84] y además, este dominio se encuentra en proteínas que interaccionan con receptores nucleares con funciones variadas. Ratones "knock-out" o inactivos para proteínas con dominio PNRC2, son viables y fértiles, pero los machos exhiben un fenotipo delgado debido a un mayor gasto de energía [85]. En la mosca, no está completamente clara la función biológica de las proteínas que contienen este dominio. Queda por ver si alguno de los mutantes de *aqz* tiene mayor gasto de energía, o fenotipos similares a los encontrados en los ratones PNRC2 "knock-out".

Los transcritos *aqz* se depositan maternamente y tienen una expresión cigótica temprana característica en la región neurogénica. En etapas posteriores, *aqz* no se expresa en las células precursoras que formarán la cadena ganglionar ventral y los ganglios supraesofágicos, equivalentes al SNC en vertebrados. Sin embargo, sí se expresa en las células precursoras del SNP, al igual que en células ya maduras del SN tanto el SNC como SNP, en la glía y en las células epidermales. En general la expresión dinámica de *aqz* durante la formación del sistema nervioso puede significar que *aqz* es un gen con múltiples funciones en la diferenciación del ectodermo, además de otras funciones en el organismo maduro, ya que se expresa en todas las etapas del desarrollo.

En este trabajo se contó con un amplio repertorio de alelos para el estudio de la función de *aqz*. Cuando un gen codifica para múltiples proteínas, significa que al menos que se muten todas las formas proteicas presentes (como en *aqz*^{GFP}), no se podría obtener un fenotipo "puro" de pérdida de función, o por el contrario, un fenotipo "puro" de ganancia de función (como se propone para *aqz*^{MB041}). Las características contrastantes de ambos alelos, además de dar información valiosa para este proyecto, también condujeron a una complementación compleja y observación de fenotipos variados durante todo el ciclo de vida de la mosca de la fruta. A pesar de todo esto, se observa una consistencia en la

mayor parte de los fenotipos mutantes en los embriones, afectándose principalmente el ectodermo y los tejidos derivados del mismo.

¿Por qué el fenotipo parcial en los embriones mutantes de *aqz*? Se sabe que la penetrancia en estos alelos no es del 100% (no todos los embriones mutantes mueren). Se piensa que la sobrevivencia de estos embriones podría deberse a dos posibles causas. Una de ellas es la función del segundo gen que contiene el dominio PNRC, mencionado anteriormente; o también a la contribución materna que puede oscurecer y rescatar los primeros fenotipos mutantes. Si seguimos el desarrollo de aquellos embriones sobrevivientes, éstos no son viables. La muerte de estos mutantes ocurre durante un periodo fenocrítico prolongado que va desde la etapa embrionaria hasta la etapa de pupa. A partir del análisis de los datos fenotípicos observados en los alelos mutantes de *aqz* durante la etapa embrionaria, se tomó la decisión de enfocar el estudio de la función de *aqz* en los primeros defectos observados (fenotipos neurogénicos).

Por el evidente defecto en el sistema nervioso que se manifestó en los embriones mutantes del gen *aqz*, se decidió iniciar con interacciones genéticas entre *aqz* y los componentes de la vía de señalización de Notch. Los embriones homocigotos mutantes de *aqz* muestran una letalidad embrionaria menos penetrante que las mutaciones en los alelos mutantes de la vía de Notch (*DI* y *kuz*), así como una pérdida de cutícula ventral menos severa. Este último defecto (fenotipo neurogénico), se ve reflejado por el grado de hiperplasia del sistema nervioso generado en los mutantes. En este trabajo, los resultados de las interacciones genéticas entre *aqz* y la vía de señalización de Notch durante el desarrollo embrionario mostraron que los fenotipos neurogénicos presentes en los embriones homocigotos mutantes para *DI* disminuyen en su interacción con *aqz*^{GFP} (pérdida de función) o aumentan en su interacción con *aqz*^{MB041} (probable ganancia de función), tanto en severidad como en número de embriones. Por el contrario, no hubo ningún efecto al tener una copia mutante de *DI* en un fondo homocigoto mutante de *aqz*^{GFP} o *aqz*^{MB041}. Estos resultados, aunque se

observaron efectos opuestos, nos llevan a postular una interacción entre *aqz* y la vía de Notch, ubicando la función de *aqz* antes (“aguas arriba”) o en paralelo con el receptor DI, en los procesos de división asimétrica o inhibición lateral durante el desarrollo del sistema nervioso.

Derivado de un análisis más profundo de expresión y funcionalidad de *aqz*, se encontró que la expresión de *aqz* y los fenotipos mutantes empiezan a aparecer muy temprano en el desarrollo embrionario una vez que se produce la celularización y polarización del epitelio. Estas etapas se llevan a cabo antes de los procesos decisivos para la diferenciación del SN, como son la inhibición lateral y las divisiones asimétricas. Los resultados observados establecen una función importante de *aqz* en la polaridad del epitelio al comienzo del desarrollo, preparando el escenario para la diferenciación de órganos en los tejidos derivados del ectodermo, como la epidermis y el sistema nervioso. En la búsqueda de un posible mecanismo de la función gen, se encontró que el origen de los defectos neurogénicos en *aqz* pueden deberse a la pérdida o reducción del dominio celular apical durante la etapa temprana de la polarización celular. Los defectos neurogénicos, aunque son muy tempranos en el desarrollo, se presentan como una derivación de problemas en la polaridad celular. La alteración del dominio apical, conduce a una presencia comprometida de DI, además de defectos en la localización y abundancia de las uniones adherentes (AJ). Además de la vía de Notch, también hay otros genes que presentan fenotipos neurogénicos. Algunos ejemplos incluyen los genes que codifican para las proteínas que regulan la polaridad celular o CPRPs, como las proteínas Cdc42 y Par. Estas moléculas promueven la distribución de los componentes celulares (como la E-cadherina; un componente de las uniones AJ, y DI, el receptor de la vía de Notch) en patrones asimétricos, lo que resulta en la formación de células polarizadas. Las mutaciones de estos genes establecen condiciones anormales en la distribución de los componentes celulares, afectando por ejemplo la forma en que Notch y Delta interaccionan durante la

diferenciación del SN. Ello conduce a la generación de fenotipos neurogénicos. El mecanismo por el cual se producen estos defectos es desconocido en la actualidad, pero sería interesante ver si los genes de polaridad celular interaccionan con Aqz en las moscas, u observar el comportamiento de una proteína parecida a Aqz en vertebrados.

En el caso de la ferritina:

Los embriones de insectos se desarrollan con cantidades limitadas de hierro que son proporcionadas durante la ovogénesis por la madre, en parte a través de la ferritina. Parece razonable suponer que los tejidos que se desarrollan a ritmos diferentes, presentan diferentes necesidades de hierro, y por lo tanto el transporte de hierro debe ser de vital importancia para el desarrollo normal del tejido. Esto también puede significar que la ferritina como vehículo transportador se utiliza para el tráfico del hierro de los sitios de almacenamiento como el intestino en la mosca, a los tejidos y las células donde se requiera, conforme avanza el desarrollo.

En este trabajo se muestra que los mutantes de ferritina mueren durante la embriogénesis presentando una amplia gama de fenotipos. Los mutantes muestran defectos cuticulares después de la gastrulación, durante la extensión-retracción de la banda germinal y la formación del sistema nervioso, si clasificamos la falta de formación de la cutícula sólo como un defecto que ocurre tardiamente. Alrededor de la etapa 12, aproximadamente al inicio del cerrado dorsal, ya se observa apoptosis ectópica en los mutantes, y ésta se vuelve más frecuente e intensa conforme el desarrollo embrionario continua en los mutantes. A juzgar por la generalización de la apoptosis, no todas las partes del embrión se ven afectadas de manera similar. La señal apoptótica ectópica se observa de inicio en la región neurogénica, antes de ser generalizada. La mayoría de los embriones mutantes presentan cutícula, lo que implica que incluso durante la etapa donde es frecuente o intensa la apoptosis, algunas células sobreviven (diferenciación de células de la epidermis) lo suficiente para secretar la cutícula

al final de la embriogénesis. Por el contrario, el SNC se ve afectado desde el principio.

También se generaron bases para un posible mecanismo de transporte de la ferritina desde el almacén principal que es el intestino medio hacia los diferentes tejidos periféricos. El bloqueo de la vía secretora durante el desarrollo hace que la distribución de la ferritina hacia sus tejidos blancos sea anormal, lo que sugiere un papel adicional de la ferritina en la distribución del hierro en organismo.

Bibliografia.

1. Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1997) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin ; New York: Springer. xvii, 405 p. p.
2. Harden N (2002) Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation* 70: 181-203.
3. Buszczak M, Paterno S, Lighthouse D, Bachman J, Planck J, et al. (2007) The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* 175: 1505-1531.
4. Gomez-Skarmeta JL, Campuzano S, Modolell J (2003) Half a century of neural pre patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci* 4: 587-598.
5. Egger B, Chell JM, Brand AH (2008) Insights into neural stem cell biology from flies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 39-56.
6. Gonzalez-Morales N, Geminard C, Lebreton G, Cerezo D, Coutelis JB, et al. (2015) The Atypical Cadherin Dachsous Controls Left-Right Asymmetry in *Drosophila*. *Dev Cell* 33: 675-689.
7. Gilbert SF (2003) The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *Int J Dev Biol* 47: 467-477.
8. Weigmann K, Klapper R, Strasser T, Rickert C, Technau G, et al. (2003) FlyMove--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* 19: 310-311.
9. Wolpert L (1998) Pattern formation in epithelial development: the vertebrate limb and feather bud spacing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 871-875.
10. Gilbert SF (2006) *Developmental biology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. Publishers. xviii, 817 p. p.
11. Patel NH, Snow PM, Goodman CS (1987) Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48: 975-988.
12. Apidianakis Y, Nagel AC, Chalkiadaki A, Preiss A, Delidakis C (1999) Overexpression of the m4 and malpha genes of the E(spl)-complex antagonizes notch mediated lateral inhibition. *Mech Dev* 86: 39-50.
13. Koushika SP, Lisbin MJ, White K (1996) ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. *Curr Biol* 6: 1634-1641.
14. Fujita SC, Zipursky SL, Benzer S, Ferrus A, Shotwell SL (1982) Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7929-7933.
15. Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klambt C (2000) *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26: 357-370.
16. Carney GE, Wade AA, Sapra R, Goldstein ES, Bender M (1997) DHR3, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12024-12029.

17. Technau GM, Berger C, Urbach R (2006) Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn* 235: 861-869.
18. Ossipova O, Sokol SY (2010) Cell polarity, Notch signaling and neurogenesis. *Cell Cycle* 9: 1-2.
19. Tepass U (2012) The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 655-685.
20. Hartenstein V, Wodarz A (2013) Initial neurogenesis in *Drosophila*. *WIREs Dev Biol*
21. Harris TJ (2012) An introduction to adherens junctions: from molecular mechanisms to tissue development and disease. *Subcell Biochem* 60: 1-5.
22. Krahn MP, Wodarz A (2009) Notch signaling: linking delta endocytosis and cell polarity. *Dev Cell* 17: 153-154.
23. Attrill H, Falls K, Goodman JL, Millburn GH, Antonazzo G, et al. (2016) FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 44: D786-792.
24. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
25. Ivanov AI, Rovescalli AC, Pozzi P, Yoo S, Mozer B, et al. (2004) Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16216-16221.
26. Mendoza-Ortiz M (2006) Caracterización de los alelos mutantes de *aaquetzalli* (*aqz*), un gen requerido para el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. [Tesis de Maestría]: Universidad Nacional Autónoma de México.
27. Li SS (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* 390: 641-653.
28. UniProt C (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 43: D204-212.
29. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
30. Perrimon N, Lanjuin A, Arnold C, Noll E (1996) Zygotic lethal mutations with maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II. Loci on the second and third chromosomes identified by P-element-induced mutations. *Genetics* 144: 1681-1692.
31. Mendoza-Ortiz M (2004) Generación y caracterización de alelos Mutantes de la línea P1492 en *Drosophila melanogaster*. [Tesis de Licenciatura]: Universidad Autónoma de Querétaro.
32. Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, et al. (2008) Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta* 1782: 489-497.

33. Fiuza UM, Arias AM (2007) Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* 194: 459-474.
34. Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 678-689.
35. Alberts B (2008) *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
36. Hartenstein V, Wodarz A (2013) Initial neurogenesis in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 701-721.
37. Ponka P (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89: 1-25.
38. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P (2012) The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1820: 161-187.
39. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285-297.
40. Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275: 161-203.
41. Santambrogio P, Levi S, Cozzi A, Rovida E, Albertini A, et al. (1993) Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J Biol Chem* 268: 12744-12748.
42. Levi S, Cozzi A, Arosio P (2005) Neuroferritinopathy: a neurodegenerative disorder associated with L-ferritin mutation. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 265-276.
43. Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, et al. (2009) Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell* 16: 35-46.
44. Todorich B, Zhang X, Slagle-Webb B, Seaman WE, Connor JR (2008) Tim-2 is the receptor for H-ferritin on oligodendrocytes. *J Neurochem* 107: 1495-1505.
45. Meyron-Holtz EG, Moshe-Belizowski S, Cohen LA (2011) A possible role for secreted ferritin in tissue iron distribution. *J Neural Transm (Vienna)* 118: 337-347.
46. Kell DB, Pretorius E (2014) Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics* 6: 748-773.
47. Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH (1999) Iron availability dramatically alters the distribution of ferritin subunit messages in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2716-2721.
48. Georgieva T, Dunkov BC, Dimov S, Ralchev K, Law JH (2002) *Drosophila melanogaster* ferritin: cDNA encoding a light chain homologue, temporal and tissue specific expression of both subunit types. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 295-302.
49. Missirlis F, Kosmidis S, Brody T, Mavrikakis M, Holmberg S, et al. (2007) Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. *Genetics* 177: 89-100.
50. Kelso RJ, Buszczak M, Quinones AT, Castiblanco C, Mazzalupo S, et al. (2004) Flytrap, a database documenting a GFP protein-trap insertion screen in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 32: D418-420.

51. Gutierrez L, Zubow K, Nield J, Gambis A, Mollereau B, et al. (2013) Biophysical and genetic analysis of iron partitioning and ferritin function in *Drosophila melanogaster*. *Metallomics* 5: 997-1005.
52. Xu T, Rubin GM (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223-1237.
53. Abrams EW, Andrew DJ (2005) CrebA regulates secretory activity in the *Drosophila* salivary gland and epidermis. *Development* 132: 2743-2758.
54. Missirlis F, Holmberg S, Georgieva T, Dunkov BC, Rouault TA, et al. (2006) Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5893-5898.
55. Missirlis F, Rahlfs S, Dimopoulos N, Bauer H, Becker K, et al. (2003) A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol Chem* 384: 463-472.
56. dos Santos G, Schroeder AJ, Goodman JL, Strelets VB, Crosby MA, et al. (2015) FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations. *Nucleic Acids Res* 43: D690-697.
57. Tautz D, Pfeifle C (1989) A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98: 81-85.
58. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v. (various pagings) p.
59. Stapleton M, Carlson J, Brokstein P, Yu C, Champe M, et al. (2002) A *Drosophila* full-length cDNA resource. *Genome Biol* 3: RESEARCH0080.
60. Stapleton M, Liao G, Brokstein P, Hong L, Carninci P, et al. (2002) The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res* 12: 1294-1300.
61. Feinberg AP, Vogelstein B (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* 137: 266-267.
62. Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
63. Wodarz A (2008) Extraction and immunoblotting of proteins from embryos. *Methods Mol Biol* 420: 335-345.
64. Karr TL, Alberts BM (1986) Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 102: 1494-1509.
65. St Pierre SE PL, Stefanicsik R, McQuilton P (2014) *Nucleic Acids Res*. *Nucleic Acids Res* 42: D780-788.
66. Celniker (2009) Unlocking the secrets of the genome. Pubmed: NCBI.
67. Arbeitman MN, Furlong EE, Imam F, Johnson E, Null BH, et al. (2002) Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* 297: 2270-2275.

68. Wang F, Dumstrei K, Haag T, Hartenstein V (2004) The role of DE-cadherin during cellularization, germ layer formation and early neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 270: 350-363.
69. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, et al. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30: 1236-1240.
70. Dunn JG, Foo CK, Belletier NG, Gavis ER, Weissman JS (2013) Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *Elife* 2: e01179.
71. Bier E, Vaessin H, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN (1992) deadpan, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes Dev* 6: 2137-2151.
72. de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ (1996) Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122: 359-369.
73. Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273: 1227-1231.
74. Tang X, Zhou B (2013) Ferritin is the key to dietary iron absorption and tissue iron detoxification in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J* 27: 288-298.
75. Mehta A, Deshpande A, Bettedi L, Missirlis F (2009) Ferritin accumulation under iron scarcity in *Drosophila* iron cells. *Biochimie* 91: 1331-1334.
76. Kohwi M, Lupton JR, Lai SL, Miller MR, Doe CQ (2013) Developmentally regulated subnuclear genome reorganization restricts neural progenitor competence in *Drosophila*. *Cell* 152: 97-108.
77. Boone JQ, Doe CQ (2008) Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* 68: 1185-1195.
78. Gambis A, Dourlen P, Steller H, Mollereau B (2011) Two-color in vivo imaging of photoreceptor apoptosis and development in *Drosophila*. *Dev Biol* 351: 128-134.
79. Kosmidis S, Botella JA, Mandilaras K, Schneuwly S, Skoulakis EM, et al. (2011) Ferritin overexpression in *Drosophila* glia leads to iron deposition in the optic lobes and late-onset behavioral defects. *Neurobiol Dis* 43: 213-219.
80. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, et al. (2004) Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 119: 529-542.
81. Denton D, Mills K, Kumar S (2008) Methods and protocols for studying cell death in *Drosophila*. *Methods Enzymol* 446: 17-37.
82. Uhrigshardt H, Rouault TA, Missirlis F (2013) Insertion mutants in *Drosophila melanogaster* Hsc20 halt larval growth and lead to reduced iron-sulfur cluster enzyme activities and impaired iron homeostasis. *J Biol Inorg Chem* 18: 441-449.

83. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, et al. (2002) Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109: 47-60.
84. Lai T, Cho H, Liu Z, Bowler MW, Piao S, et al. (2012) Structural basis of the PNR2-mediated link between mRNA surveillance and decapping. *Structure* 20: 2025-2037.
85. Zhou D, Shen R, Ye JJ, Li Y, Tsark W, et al. (2008) Nuclear receptor coactivator PNR2 regulates energy expenditure and adiposity. *J Biol Chem* 283: 541-553.

Apéndice

1.1 Artículo publicado Ferritin Is Required in Multiple Tissues during *Drosophila melanogaster* Development



RESEARCH ARTICLE

Ferritin Is Required in Multiple Tissues during *Drosophila melanogaster* Development

Nicanor González-Morales[☉], Miguel Ángel Mendoza-Ortiz[☉], Liisa M. Blowes^{✉a}, Fanis Missirlis^{✉b}, Juan R. Riesgo-Escovar^{*}

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, 76230, México

☉ These authors contributed equally to this work.

✉a Current address: School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, 327 Mile End Road, London, E1 4NS, United Kingdom

✉b Current address: Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, Zacatenco, 07360, México

* juanriesgo@prodigy.net.mx



click for updates

OPEN ACCESS

Citation: González-Morales N, Mendoza-Ortiz MÁ, Blowes LM, Missirlis F, Riesgo-Escovar JR (2015) Ferritin Is Required in Multiple Tissues during *Drosophila melanogaster* Development. PLoS ONE 10(7): e0133499. doi:10.1371/journal.pone.0133499

Editor: Efthimios M. C. Skoulakis, Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center, GREECE

Received: April 22, 2015

Accepted: June 28, 2015

Published: July 20, 2015

Copyright: © 2015 González-Morales et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Miguel Ángel Mendoza-Ortiz is a PhD student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a PhD fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [164428]. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [177962 to J.R.R.E.], Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [IN203110 to J.R.R.E.], and Universidad Nacional Autónoma de México

Abstract

In *Drosophila melanogaster*, iron is stored in the cellular endomembrane system inside a protein cage formed by 24 ferritin subunits of two types (Fer1HCH and Fer2LCH) in a 1:1 stoichiometry. In larvae, ferritin accumulates in the midgut, hemolymph, garland, pericardial cells and in the nervous system. Here we present analyses of embryonic phenotypes for mutations in *Fer1HCH*, *Fer2LCH* and in both genes simultaneously. Mutations in either gene or deletion of both genes results in a similar set of cuticular embryonic phenotypes, ranging from non-deposition of cuticle to defects associated with germ band retraction, dorsal closure and head involution. A fraction of ferritin mutants have embryonic nervous systems with ventral nerve cord disruptions, misguided axonal projections and brain malformations. Ferritin mutants die with ectopic apoptotic events. Furthermore, we show that ferritin maternal contribution, which varies reflecting the mother's iron stores, is used in early development. We also evaluated phenotypes arising from the blockage of COPII transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, feeding the secretory pathway, plus analysis of ectopically expressed and fluorescently marked Fer1HCH and Fer2LCH. Overall, our results are consistent with insect ferritin combining three functions: iron storage, intercellular iron transport, and protection from iron-induced oxidative stress. These functions are required in multiple tissues during *Drosophila* embryonic development.

Introduction

Iron is the most abundant transition metal on earth, commonly found at active sites of enzymes in the form of heme or iron-sulfur clusters, or as mono-nuclear or di-nuclear iron [1]. Because of the high reactivity between iron and oxygen, iron has become a key player in aerobic metabolism. Excessive iron catalyzes noxious oxidative stress. Therefore, iron concentration

laboratory budget to J.R.R.E. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

within subcellular compartments and extracellular fluids is tightly regulated. The Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) is responsible for cellular iron uptake [2,3].

Ferritin participates in iron homeostasis as the main iron storage complex in both prokaryotes and eukaryotes [4,5]. Ferritin major form (holoferritin) is cytosolic and consists of 24 H and L protein chains subunits that assemble into a cage-like structure. This complex sequesters up to 4,500 iron atoms in its interior. The H chains contain a ferroxidase center necessary for iron internalization while the L chains contain acidic groups exposed in the interior surface of the holoferritin complex facilitating iron mineralization [6]. Ferritin genes are regulated during translation by the iron regulatory protein (IRP) binding to an iron responsive element (IRE) in the ferritins mRNAs 5' untranslated region [7–9]. The discovery of ferritin receptors Scara5 [10] and Tim2 [11] in mice has led to the idea that ferritin might be involved in iron transport [12,13]; however, this idea remains controversial [14].

In insects, ferritin shells have an H12L12 organization due to inter- and intra- subunit disulfide-bonds that ensure protein folding and assembly [15]. Intracellular ferritin in most insects is directed to the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus [16,17]. The *Drosophila melanogaster* genome encodes three ferritin genes: *Ferritin 1 heavy chain homologue* (*Fer1HCH*) and *Ferritin 2 light chain homologue* (*Fer2LCH*) that together produce the major ferritin complex [18–20]. *Ferritin 3 heavy chain homologue* (*Fer3HCH*) encodes the mitochondrial ferritin, predominantly expressed in testis [16,21].

The *Drosophila* Iron Regulatory Protein-1A (IRP-1A), in its iron-sulfur cluster depleted modality, binds IREs thereby regulating the translation of a subset of *Fer1HCH* mRNA transcripts [22]. The sole *Drosophila* DMT1 homolog [23] was originally isolated as a gustatory mutant named *Malvolio* (*Mvl*) [24,25].

Previous work has shown that ferritin is required for embryonic and larval development [17,26] and that the ferroxidase center of the H chain is essential [17], but the specific phenotypes of the ferritin mutants have not been studied. It has been proposed that *Drosophila* ferritin might also serve a role as an extracellular source of iron [10,26–28], but functional analyses supporting this exist only for the secreted ferritin of ticks [29,30].

Here we analyze *Fer1HCH* and *Fer2LCH* mutant embryonic phenotypes. We show that key functions of the ferritin subunits are likely mediated through the ferritin complex, as single mutant phenotypes are indistinguishable from double mutants during embryogenesis. We also show that ferritin mutant phenotypes can be enhanced when embryos have reduced or are deprived of ferritin maternal contribution, by limiting iron uptake in parental diets, or by induction of germ line clones, respectively. Ferritin mutant phenotypes encompass a wide range of cuticular phenotypes, implying widespread embryonic functions. A strong central nervous system (CNS) defect results from mutations in ferritin genes. We show that this phenotype is accompanied by ectopic apoptosis. Last, we show that blocking the intracellular secretory pathway during embryogenesis results in the mislocalisation of ferritin, and that ectopically expressed and marked ferritin subunits are in tissues and organs where they were not synthesized, also implying transport. We hypothesize that failure of ferritin transport contributes to mutant phenotypes and lethality.

Results

Pleiotropic phenotypes of ferritin mutants in embryonic cuticle preparations

Nüsslein-Volhard and Wieschaus examined *Drosophila* embryonic cuticular defects extensively (affecting in principle the ectodermally derived tegument and cuticle deposition) and showed it to be a useful and comprehensive way of analyzing genes required during

embryogenesis, since many times mutations affecting the cuticle also affect other embryonic tissues and cell types [31]. We analyzed cuticles of previously described transposon-induced loss-of-function ferritin alleles: *Fer1HCH451* and *Fer2LCH35* [17,26]. We also used and compared them with a null mutation for both ferritin genes *Df(3R)Fer* [32], a GFP-trap allele, *Fer1HCHG188* [17], and a new allele, *Fer2LCHA17*, that fails to complement *Fer1HCH451*, *Fer1HCHG188*, and *Fer2LCH35* (see [Materials and Methods](#)). All of these alleles are lethal.

A significant number of ferritin mutant embryos die during embryogenesis (36% for *Fer2LCH35*, 43% for *Fer1HCH451*, and 90% for *Df(3R)Fer*; in our hands in these experiments in control flies only 1% of embryos die during embryogenesis. Differing numbers of mutant cuticles may just reflect level of lack-of-function attained in the different mutant genotypes, as opposed to qualitative differences, since they all exhibit exactly the same mutant phenotypes). Cuticle preparations of zygotic ferritin homozygous mutants are mostly wildtype (approximately 75%), but a fraction (overall 25%) has no cuticle deposition, or cuticular defects (a small fraction have germ band extension and retraction, dorsal closure, and head involution defects, among others; [Fig 1](#)). Quantification showed that the majority of mutant embryos presented either a normal cuticle (~75%) or no cuticle at all (~15%). A significant finding was that the ferritin mutant genotypes tested showed similar percentages of mutant phenotypes. We interpret this to mean that individual ferritin subunits only function in concert (as the ferritin complex, holoferritin) and do not have vital subunit-specific functions. These diverse phenotypes also suggest that ferritin is required in several tissues during development, consistent with differential iron needs in cells and tissues. Notably, a number of iron sulfur cluster proteins are induced during the final stages of embryogenesis to support glycolysis in an aerobic environment [33]. As cuticle deposition occurs during the last stages of embryonic development, defects in cuticle deposition may have a late cause. On the other hand, mutant cuticles pinpoint defects manifested earlier during development: germband extension-retraction (stages 9–12), dorsal closure (stages 13–15), and head involution (stages 14–16). Overall, we found defects from mid-development (stage 9) onwards. All these defects were not found in control stocks.

Ferritin maternal contribution is utilized during early embryonic development

Ferritin is maternally contributed [17]. We therefore wondered if our analysis of zygotic mutants would miss early ferritin requirements (even obligate maternally-encoded ferritin requirements) fulfilled by this maternal contribution. To analyze how maternal ferritin functioned during embryogenesis we followed two strategies: a) curtailed iron availability in mothers, where some maternally deposited ferritin mRNAs and proteins would be available in the egg, but iron would be limited, and b) generating female germ line clones without wild type copies of the two main ferritin genes.

A way of reducing ferritin expression and iron availability in adults is to add an iron-specific chelator in the diet ([S1 Fig](#)) [16,34]. We hypothesized that reduced overall iron levels would result in decreased ferritin (and iron) maternal contribution and a more severe embryonic phenotype. Homozygous mutant embryos derived from heterozygous adults fed with 200 μ M Bathophenanthroline Sulfate (BPS) showed, in general, a doubling of incidence of embryonic defects (particularly head involution), including the no cuticle phenotype (from ~15% to ~30%). We interpret this accrual of cuticle phenotypes, like no cuticle, as due to early embryonic death, sometimes before epidermal differentiation, although we have not excluded a particular requirement for iron in the differentiation of the epidermis, which could provide an alternative explanation for the same last phenotype. The other embryonic phenotypes also became more frequent: U-shaped embryos, indicative of a failure of germ band retraction,

cuticle preparation from ferritin mutants

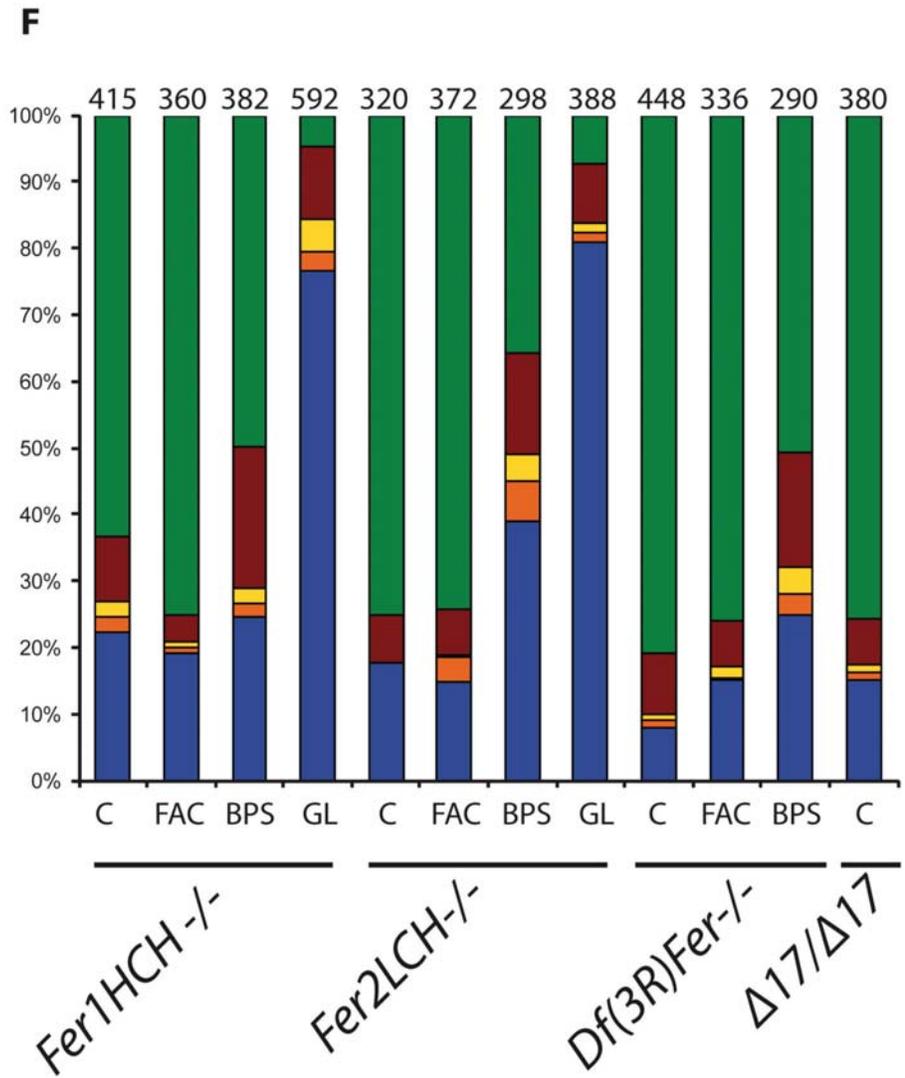
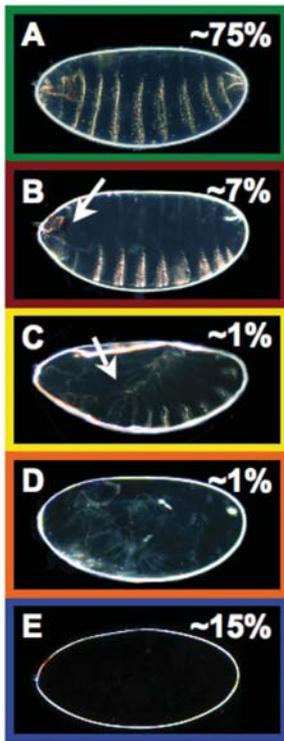


Fig 1. Ferritin mutants result in a variety of cuticle phenotypes quantified by different colors. Examples are shown of (A) wild type cuticle (green), (B) head involution defects (red), (C) dorsal closure defects (yellow), (D) germ band retraction defects (orange), and (E) no cuticle deposition (blue). (F) Percentages of cuticular phenotypes of ferritin mutants. An enhancement of the earlier phenotypes was seen in mutant embryos whose mothers were fed BPS, which was dramatic in embryos derived from ferritin mutant germline clones. C: normal diet, FAC: high iron diet, BPS: low iron diet, GL: germline clones, n: number of embryos examined per genotype. An asterisk denotes statistical difference compared to the control lane at $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g001

augmented from ~2% to ~4%, and embryos failing to complete dorsal closure increased from ~1% to ~4% (Fig 1F; BPS columns). At the same time, the percentage of “wild type” cuticles decreased. Using cuticle preparations, this evidence points to iron levels being critical for all ferritin embryonic functions, and BPS treatment as being a way of generating more extreme lack-of-function conditions. No new mutant phenotypes, different from non-iron reduced zygotic mutants, were detected in these embryos, supporting that ferritin and iron deficits are

phenotypically coincidental. Once again, the changes in phenotypic classes abundances were consistently similar in *Fer1HCH451*, *Fer2LCH35*, and *Df(3R)Fer*.

On the other hand, feeding extra iron to adults did not result in a rescue of the zygotic embryonic phenotype of the mutant offspring (Fig 1E, FAC), even though total levels of ferritin in mothers increased (S1 Fig). This shows that maternal ferritin contribution is not sufficient to fully rescue embryogenesis in ferritin homozygous mutants, implying an obligate role for zygotically expressed ferritin in embryonic development.

To further explore whether maternal ferritin only partially rescues zygotic ferritin mutants, especially during early development, we generated homozygous ferritin mutant germ line clones. Most germ line clones had no cuticle or bore cuticles with defects (95% of mutant embryos). The ‘no cuticle’ phenotype percentage changed spectacularly from ~15% to ~80% (Fig 1E). Again, no new mutant phenotypes were seen. This augmentation of phenotypes is in agreement with the BPS experiment above, consistent with early ferritin/iron requirements during embryogenesis. A wild type copy of zygotic ferritin can rescue a small fraction of mutant embryos that were maternally deprived of ferritin, implying no obligate function for maternally supplied ferritin.

Heterozygous embryos without maternal contribution develop normally into adults without defects. Taken together, these results show that maternally supplied ferritin is employed early during development, but can be functionally replaced by zygotically expressed ferritin. We hypothesize that this rescue is due to zygotic ferritin genes being overexpressed in order to compensate for lack of maternal ferritin, sufficient to handle iron needs during embryonic development. It still remains to be seen how iron is maternally deployed in the oocyte when there is no maternal *Fer1HCH* and *Fer2LCH* available, as ferritin complex formed from these two proteins is the main iron storage complex in the fly.

The diversity of cuticular phenotypes, and their increase in conditions where iron availability is reduced and/or ferritin is deprived, leads to a common ‘syndrome’ of mutant cuticles, where lack of cuticle deposition becomes particularly abundant. The different mutant embryonic cuticular phenotypes, including their increase in maternally reduced or deprived embryos, are consistent with ferritin requirements several times during development.

Central Nervous System (CNS) phenotypes of ferritin mutants

The majority of zygotic ferritin mutant embryos derived from heterozygous mothers die with an apparently normal cuticle. Since not all functional requirements in embryonic lethal mutations are reflected as cuticular defects, we also sought to study other tissues and organs. We sought to study an internal organ or tissue that might be affected by lack of ferritin, and contribute to the death of the mutant embryos, an organ or tissue whose defects which might not necessarily reflect in the cuticle. Since ferritin transcripts are first detected in the developing neuroectoderm at stages 7–8 and the protein becomes concentrated in the CNS of first instar larvae [21,35], we asked whether the CNS developed normally in ferritin mutants.

Fer1HCH451 carries a *LacZ* element that serves as a reporter for *Fer1HCH* expression. Previous reports have shown that both ferritin subunit transcripts are mainly present in the neuroectoderm, the fat body, and in the midgut in the final stages of embryonic development [16,21,35]. We tested whether this *LacZ* reporter recapitulates known *Fer1HCH* expression. For this, we monitored *LacZ* activity (due to the reporter transgene) in the anterior midgut upon iron feeding of larvae (a condition that augments endogenous *Fer1HCH* expression; S2 Fig). Since we observed iron-dependent induction of expression, we reasoned that the reporter responds to iron (like the endogenous *Fer1HCH*), and used this *Fer1HCH451 LacZ* staining as an enhancer trap to monitor *Fer1HCH* expression in the embryo. *Fer1HCH451-LacZ* is

strongly expressed in the neuroectoderm (Fig 2). Co-localization between the neuronal marker Elav and β -galactosidase was also observed in homozygous mutant embryos that have a disrupted CNS (Fig 2). The earliest stage we see defects with Elav antibody are stage 11–12, some time after nervous system ferritin expression is seen at stages 7–8.

We then stained embryos with antibodies against several neuronal markers. Anti-Elav, which marks neuronal nuclei, showed that some ferritin mutants harbor holes in the abdominal CNS segments (Figs 2 and 3). More severe phenotypes were also present, albeit in fewer embryos, including aberrant condensation of the CNS, twisted CNS, and loss of parts of the brain and peripheral nervous system (PNS). Importantly, and consistent with our analysis of the cuticle phenotypes discussed above, these phenotypes were observed with both ferritin alleles and with the 2.2 kb genomic deletion that specifically deletes both *Fer1HCH* and *Fer2LCH* (Fig 3B–3H, distribution of defects in 3I, compared with the control 3A). These phenotypes were significantly different from control embryos (Fig 3I). The developing CNS consists of at least four types of cells: neuroblasts, ganglion mother cells, neurons, and glia. Neuroblasts are CNS precursor cells and give rise to ganglion mother cells; and these, in turn, give rise to neurons and glia [36]. In order to test whether neuroblasts and ganglion mother cells were affected in ferritin mutant embryos, we performed antibody staining against Deadpan (Dpn) and Evenskipped (Eve) [37,38]. Anti-Deadpan staining, which marks all neuroblasts, shows that CNS defects are already present within neuroblast cell lineages in at least some mutant embryos (Fig 4A–4D). As expected for early CNS defects, mutant embryos can also be found where Eve positive ganglion mother cells are affected (Fig 3E–3H). CNS defects are detected from the time neuroblast cell lineages are specified in some mutant embryos, at stages 7–8, precisely during germband extension-retraction, when the earliest cuticle defects are seen. These early defects may result in more maturecontorted and aberrant nervous systems, as seen with anti-Elav.

In order to examine other aspects of later embryonic CNS stages (besides anti-Elav), we used anti-BP102 antibody to study condensed CNS and axonal trajectories in ferritin mutant embryos. Anti-BP102 stains axons and CNS. We studied the condensed ventral nerve cord and axons. Anti-BP102 staining revealed that in some mutant embryos the CNS ventral nerve cord is aberrant and contorted, and that axons are misguided (Fig 3I–3L). Altogether, CNS defects occur throughout CNS development.

Ectopic apoptotic activation in ferritin mutants

What are the consequences of ferritin loss in affected tissues? There are links between iron metabolism and apoptosis [39–44]. We hypothesized that in the mutants; disrupted CNS could lead to cell death by an apoptotic mechanism. To test this hypothesis we used an antibody that recognizes solely the cleaved, activated caspase3 in cells as an apoptosis marker [45]. In contrast to control embryos at stage 12 where no apoptotic signal was detected (Fig 5A), ectopic apoptotic activation appeared in mutant embryos (Fig 5B). By stage 15 of embryogenesis control embryos have a weak and restricted apoptotic signal (Fig 5C), whereas in the mutant embryos this signal was massive and covered most of the embryo (Fig 5D; significantly different from control, Fig 5E). Similar patterns were seen with *Fer1HCH451* and *Fer2LCH35* homozygous mutant embryos (S3 Fig). Thus, early apoptotic activation in ferritin mutants after we see CNS anatomical defects, and subsequent generalized apoptosis, suggest that ferritin mutants may suffer apoptosis as a direct consequence of lack of the ferritin complex (again both mutant alleles show a qualitatively similar apoptosis phenotype), ultimately affecting many tissues.

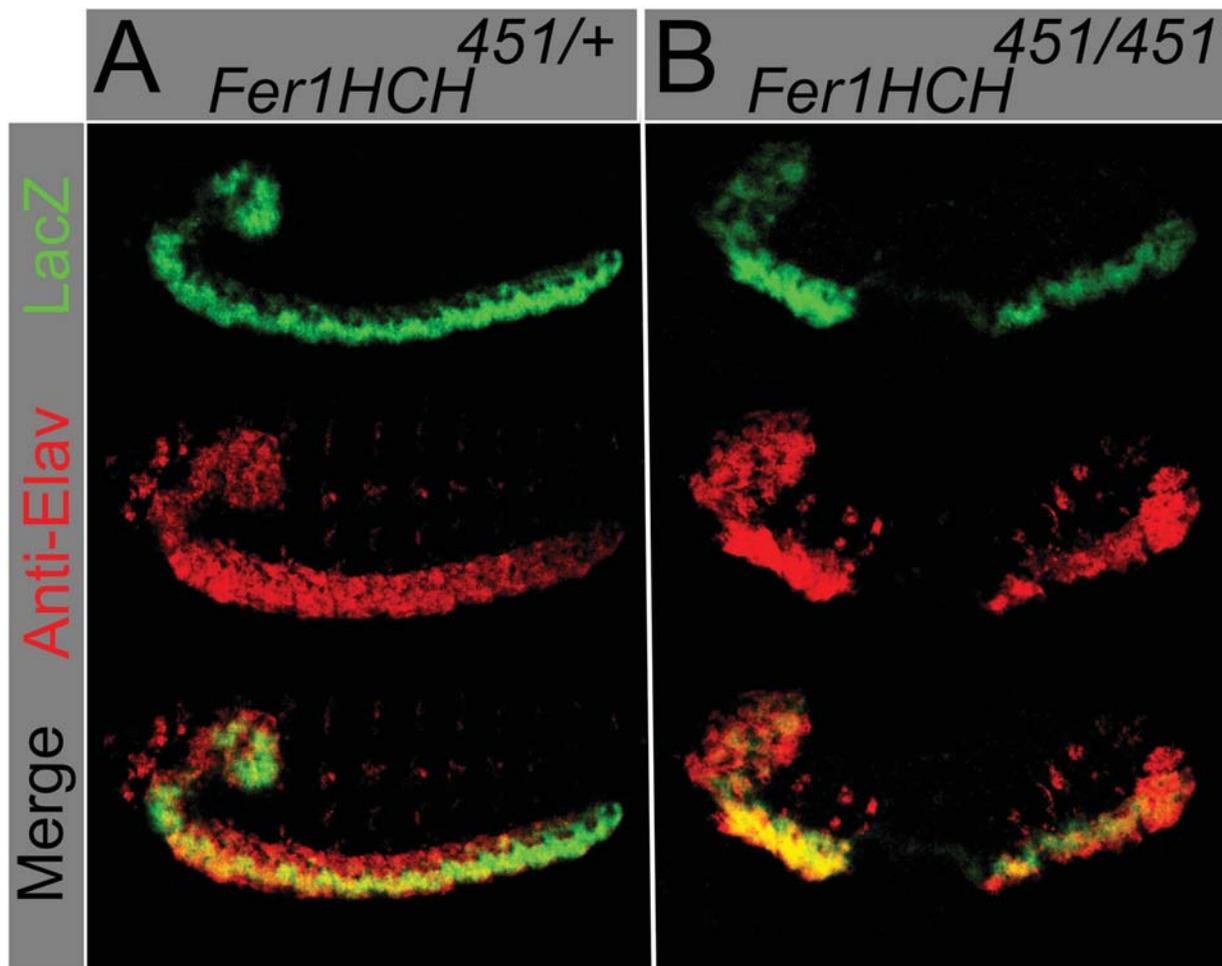


Fig 2. *Fer1HCH*⁴⁵¹ *lacZ* enhancer trap is expressed in the embryonic CNS. Using an antibody against Anti- Beta-Galactosidase (green) and an antibody against the neuronal marker Elav (red), colocalization is observed in (A) heterozygous *Fer1HCH*^{451/+} and (B) homozygous *Fer1HCH*⁴⁵¹ embryos. Ferritin homozygous mutant embryo has abnormally shaped and separated nervous system.

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g002

The *Drosophila* DMT1 homolog, *Malvolio*, is upregulated in ferritin mutants

Mutations in *Mvl* result in reduced iron within intestinal iron storage cells, but also in the whole body [46]. *Mvl* mutants can suppress both intestinal iron accumulation resulting from ferritin [26] and from Multicopper Oxidase-1 (MCO1) misregulation [47]. A recent paper by the same group shows that the likely reductase for this enzyme is ascorbate; its influence on iron homeostasis is conserved in mosquitoes [48]. In view of the above findings, we used *Mvl97f*, a P-element insertion mutant carrying a *LacZ* reporter for gene activity that also leads to reduced *Mvl* expression [24,46] to ask whether *Mvl* and ferritin genes interact.

In control embryos, *LacZ* showed a very restricted pattern of *Mvl* expression consistent with previous studies [21,24]. However, in a mutant ferritin background, *Mvl*- driven *LacZ* is

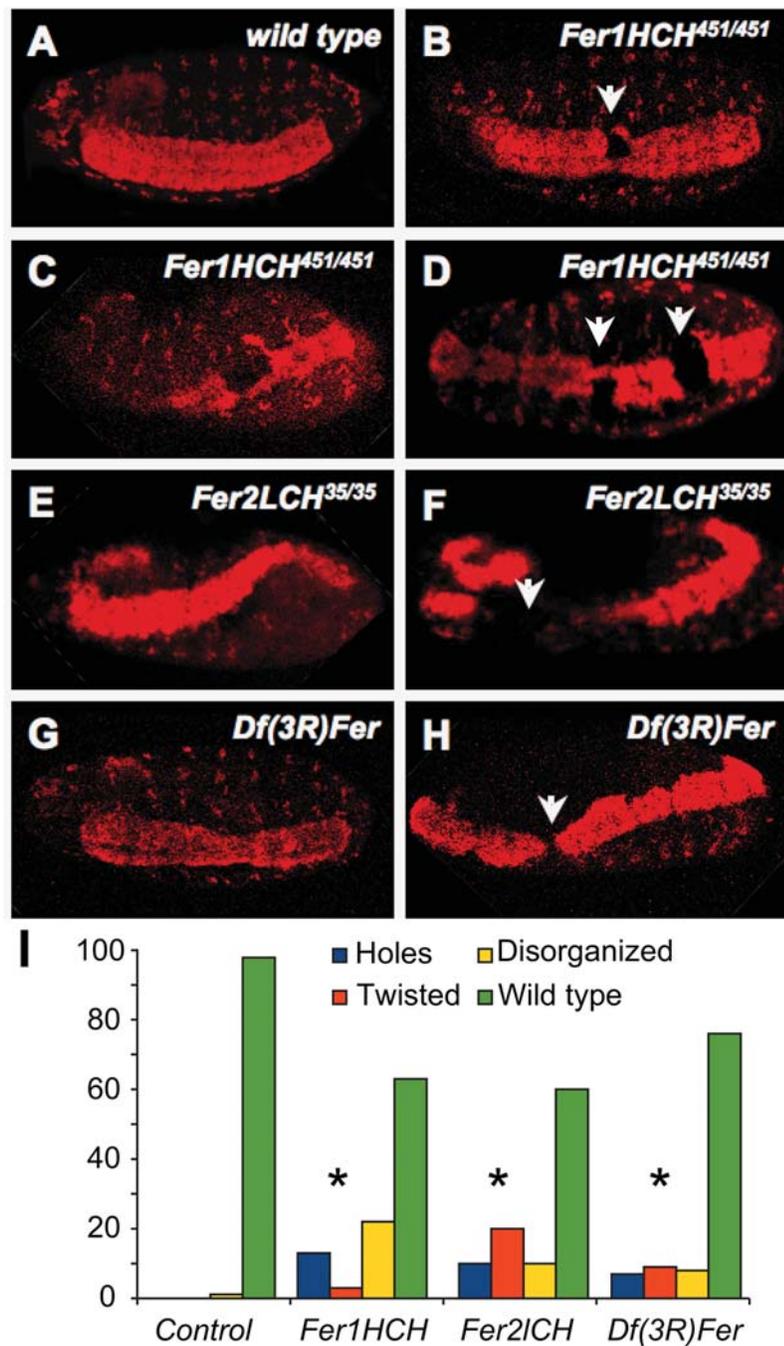


Fig 3. Ferritin mutants result in CNS phenotypes, as revealed by α -Elav staining. (A) Mutant CNS (B-H) appear twisted and irregular (E, G); often, holes are seen within the ventral nerve cord (white arrows). Holes can range in sizes from small, partially (B, C) or completely (H) interrupting the ventral nerve cord, to large (F). There can also be multiple holes (D), as compared to wild type. Embryonic brains are also disrupted (F, opposite white arrow). Embryos are photographed at stages 14–15. (I) Quantification and distribution of CNS

defects in different ferritin mutants that present CNS defects; statistical difference compared to control following a Chi squared test, at $p < 0.0001$, and is denoted by an asterisk ($n = 32, 10,$ and 138 embryos, respectively).

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g003

upregulated, its levels increasing as development proceeds (Fig 6A, 6B and 6E). We hypothesize that in the absence of functional ferritin, iron depleted cells upregulate *Mvl* in an effort to counter iron depletion. Quantitation showed a significant difference of expression (Fig 6E). Significantly, the addition of one copy of the *Mvl97f* hypomorphic allele into a ferritin-depleted embryo resulted significantly in the appearance of necrotic patches, which were rarely present in *Mvl97f* or in ferritin homozygous mutants alone (Fig 6C, 6D and 6F).

Ferritin expression, localization and trafficking during development

Ferritin might participate in an iron import pathway [26]. The above interaction between DMT1 and ferritin is reminiscent of recent findings in mammals. Indeed, the mammalian ferritin receptor SCARA5 is upregulated in the absence of the transferrin receptor [10].

In order to study this proposed transport function of ferritin, we used the *Fer1HCHG188* mutant allele. *Fer1HCHG188* is a mutant *Fer1HCH* allele, shown to generate a chimeric GFP-*Fer1HCH* protein that faithfully mimics the endogenous *Fer1HCH* pattern in heterozygous condition [17,32,35,49]. The GFP tag in homozygosis is thought to block the correct function of ferritin, because in homozygotes all the H-subunits carry a GFP tag, and embryonic development fails [17]. *Fer1HCHG188/+* flies are viable as heterozygotes, showing a dominant mild effect: a small reduction in iron accumulation within ferritin [34].

During stages 16–17 of embryonic development GFP tagged *Fer1HCH* is present in hemocytes in *Fer1HCHG188* heterozygotes (Fig 7A). Hemocytes are large cells that are loosely

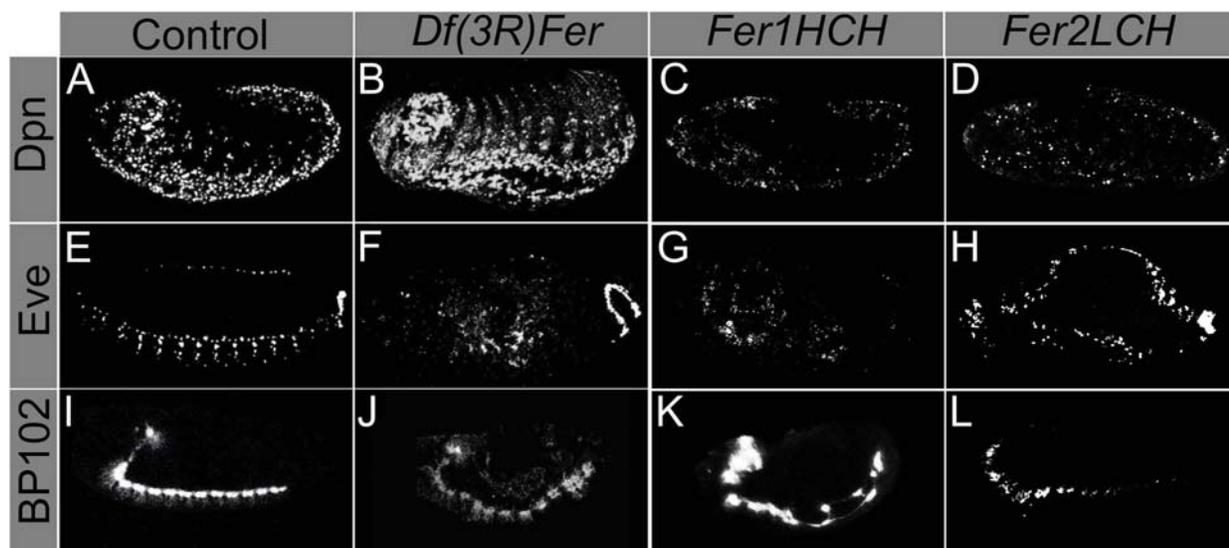


Fig 4. Neuroblast and ganglion mother cells populations and neuronal axons derived from embryonic neurons are affected in ferritin mutants. Neuroblast populations, as marked by Dpn (A, control) are affected in ferritin mutants (B–D). Ganglion mother cells (E, control) are affected in ferritin mutants (F–H). Axons emanating from the brain and ventral nerve cord have a stereotyped pattern in normal development (I). In ferritin mutants, the axons form but are disorganized (J–L).

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g004

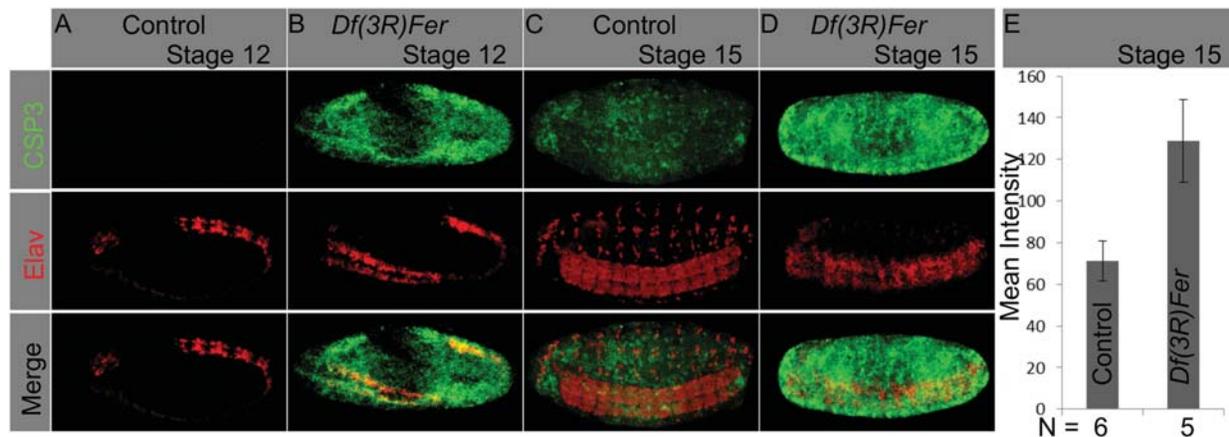


Fig 5. Ferritin mutants cause apoptosis in the CNS and other tissues. (A-D) Whole embryos were stained with an α -CSP3act marking apoptotic cells (green), and an α -Elav marking neurons (red). Ectopic apoptosis was observed in ferritin mutants from stage 12 onwards; at this stage it was mostly restricted to the neurogenic region (B). At stage 15 apoptosis covers most mutant embryonic tissues (D). Quantification of the mean intensity value on CSP3act staining in control and ferritin mutants at stage 15 show a significant difference, with higher levels of staining in mutant embryos (n = 5; T-test, p = 0.0113).

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g005

associated with peripheral tissues circulating in the hemolymph, where they function as both phagocytic and immune cells [50]. There is no report of ferritin mRNA expression in hemocytes. In order to confirm that the large, ferritin-accumulating cells were actually hemocytes we used the *Cg-Gal4* line to drive expression, exclusively in hemocytes, of a nuclearRFP in *Fer1HCHG188/+* embryos. GFP-Fer1HCH is present in the same cells as Cg-nRFP (Fig 7A).

Ferritin mRNAs have been located in the fat body [17]. In a similar experiment as above, we used *Fer1HCHG188/+* and tagged the fat body with FB-nRFP, a fat body specific Gal4 line. *Fer1HCHG188* GFP and FB-nRFP are not coincidental (Fig 7B). If the ferritin mRNAs are translated in the fat body, they are either degraded quickly or transported elsewhere. A likely target candidate for transport is the hemocytes, where conversely there are no ferritin mRNAs; rather ferritin protein is present.

We noticed that homozygous mutant *Fer1HCHG188* embryos showed a clumped and concentrated accumulation of GFP-Fer1HCH than similarly staged heterozygous *Fer1HCHG188* embryos (Fig 7C and 7D). Homozygous *Fer1HCHG188* embryos have a lower and restricted GFP-Fer1HCH expression; this is mainly seen in the intestinal region (Fig 7D), suggesting either degradation of the mutant protein or that mutant, non-functional heteropolymers (composed exclusively of GFP-Ferritin1HCH and Ferritin 2LCH subunits), are not trafficked. The intestine could also be a possible source of transported ferritin, as iron from the diet is accumulated there and both ferritins mRNAs and proteins are present there (Fig 7C). Fewer hemocytes have *Fer1HCHG188*-derived GFP in the mutant (Fig 7E and 7F), again consistent with ferritin transport from intestinal and / or fat body sources.

To test further whether ferritin is delivered from other embryonic tissues, we blocked the intracellular secretory pathway by means of a lethal mutation in *Sec23*. *sec23j13C8* is a P-element insertion in the 5' UTR of *sec23*, expected to eliminate or severely attenuate gene function [51]. If ferritin is indeed transported during embryogenesis, blocking the secretory pathway will impede its exit from the cells where it is originally transcribed. Ferritin was detected clumped in *sec23j13C8/j13C8* mutants (compare Fig 7H to 7G); GFP-Fer1HCH aggregates were detected mainly around the midgut (Fig 7H) in a similar expression pattern as that

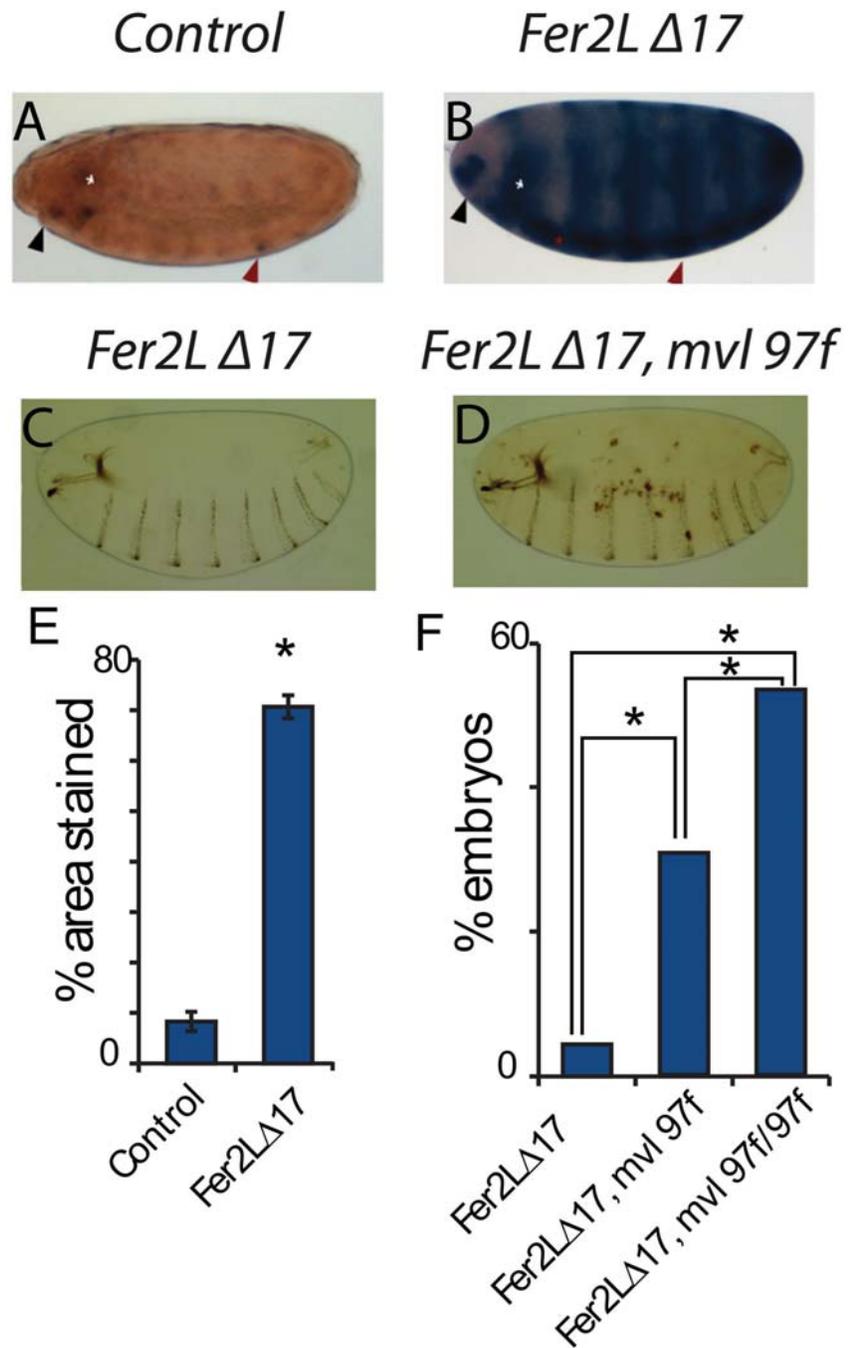


Fig 6. Ferritin genes interact genetically with the DMT1 homolog *Mvl*. (A) The *Mvl*^{97f}-*LacZ* line shows a spatially restricted expression pattern for *Mvl*, mainly in the head region, the brain, and a segmentally repeated pattern. (B) In a ferritin homozygous mutant background, *Mvl*^{97f}-*LacZ* expression increases. Black arrows denote the head region, white asterisk the embryonic brain, red asterisk the ventral nerve cord, and red arrows mark the segmented expression pattern. Introduction of a *Mvl*^{97f} allele into a ferritin mutant

background resulted in the appearance of necrotic patches in the cuticle (C, D). (E) Quantification of the total area covered by LacZ staining in control and ferritin mutant backgrounds, ($p < 0.0001$; T-test, asterisk). (F) Quantification of the number of embryos showing necrotic patches with one or two *Mv⁹⁷¹* alleles; statistical difference using a Chi squared test with $p < 0.0001$ is shown by an asterisk.

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g006

observed in homozygous *Fer1HCHG188* mutants. This is consistent with ferritin trafficking during embryonic development.

Thus, in embryos impaired in the secretory pathway some cells fail to accumulate ferritin, suggesting that in wild type embryos ferritin may be actively secreted into the hemolymph. We then made use of two constructs, UAS-mcherry::*Fer2LCH* and UAS-GFP::*Fer1HCH* (Gambis, Steller & Mollereau, personal communication), and expressed them using the hemocyte *Cg-Gal4* line. We found that embryonic expression of the ectopic, tagged ferritin subunits was largely, although not absolutely, coincidental, and that expression was seen in cells other than hemocytes (S4 Fig) in late embryos.

We also used the same fluorescently tagged ferritin constructs to see whether these tagged ferritin proteins could also be expressed and transported in larvae. We used *Fer2LCH-Gal4* to drive expression (S5A and S5B Fig). We found expression of both constructs in the midgut, as expected (due to *Fer2LCH-Gal4*), but also in Garland cells, where no *Fer2LCH-Gal4* expression is seen, implying ferritin transport. We also used two other drivers: *elav-Gal4* for expression in neurons (S5C Fig) and *repo-Gal4* for expression in glial cells (S5D Fig). In both cases, fluorescence is also seen in Garland cells, and again, implying ferritin transport. Garland cells are nephrocytes, part of the larval fly hemolymph filtration system [52], and may come in contact and accumulate ferritin circulating in the hemolymph.

Taken together, all these data point that ferritin traffics between tissues, and that hemocytes and hemolymph may play key roles in this trafficking process, conveying ferritin from one tissue to another. Such a role for hemocytes has been suggested in the context of tissue communication in the innate immune response [53].

Discussion

Insect embryos must course through development with limited amounts of iron, provided during oogenesis by the mother, in part *via* ferritin. It seems reasonable to assume that tissues developing at different rates present different iron requirements, and therefore iron transport must be of vital importance for normal development. This may also mean that ferritin is used for trafficking from storage sites, as development proceeds, to tissues and cells where it is required, as an iron conveyor.

Here we show that ferritin mutants die during embryogenesis with a wide range of phenotypes. Ferritin mutants first show cuticular defects after gastrulation, during germband extension-retraction and the formation of the nervous system, if we classify lack of cuticle formation only as a late occurring defect. Around stage 12, at about the initiation of dorsal closure, there is already ectopic apoptosis, and it becomes more prevalent and intense as embryonic development continues. Judging from the generalization of apoptosis, not all portions of the embryo are affected in a similar manner, as ectopic apoptotic signal is first seen in the neurogenic region, before becoming generalized. Most zygotic mutants die from cuticle, implying that even at a stage where there is prevalent apoptosis, some cells survive (differentiating epidermis cells) enough to secrete cuticle at the end of embryogenesis. In contrast, the CNS is affected from the start.

If iron provided maternally by ferritin is reduced or completely missing, the same phenotypes are present, but particularly, embryos not forming cuticle become prevalent. This implies

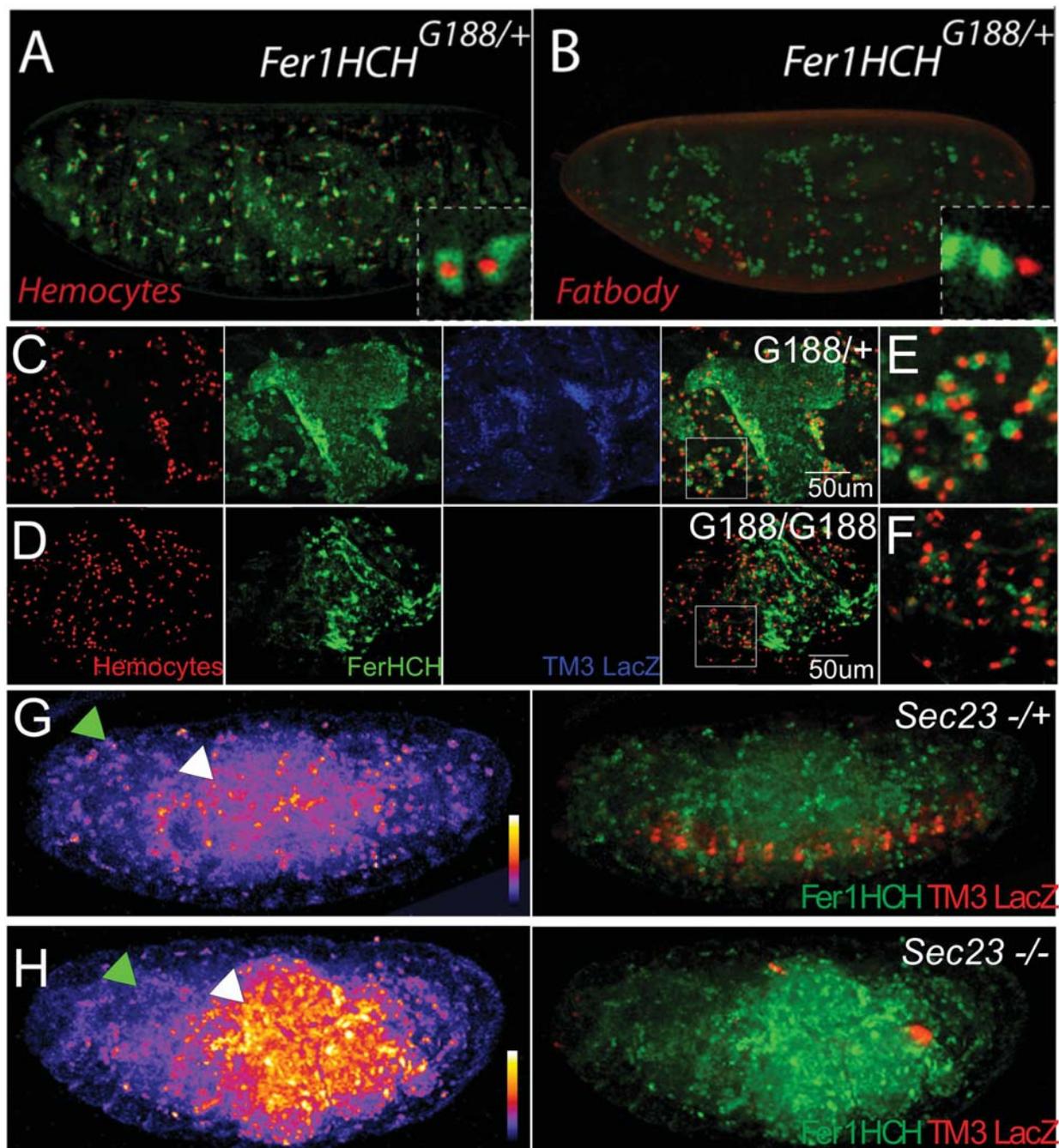


Fig 7. Marked ferritin accumulation in embryos with different genetic backgrounds. *Fer1HCH* protein was visualized in all embryos using the *Fer1HCH^{G188}* GFP trap line (green). In stage 17 *Fer1HCH^{G188/+}* embryos that successfully complete development, ferritin accumulates mainly in the midgut and hemocytes. (A) The GFP-*Fer1HCH* signal is found in hemocytes marked by *cg* driving nuclear RFP, but not (B) in the fat bodies marked by the fat body driver FB driving nuclear RFP. (C-F) *Fer1HCH^{G188}* homozygous embryos, which die like other ferritin mutants, also show intestinal ectopically localized ferritin accumulation (D) and much reduced hemocyte ferritin accumulation (F), compared to heterozygous controls (C, E). (G, H) Blocking the secretory

pathway using a homozygous mutant *sec23^{13C8}* background leads to a decrease of ferritin levels in the hemocytes (green arrowheads), and ectopic accumulation in the intestine (white arrowheads). Intensity of GFP::Fer1HCH fluorescence is shown in the left side of panels G and H using a fire scale. The fire scales are shown in the lower right side of each, with warmer colors (red-orange-yellow-white) denoting higher intensity of fluorescence, and colder colors (purple-blue) denoting lower levels of fluorescence for the green channel. Note higher fluorescence levels in the *sec23* homozygous mutant embryo (H). A merged image showing GFP::Fer1HCH fluorescence and control RFP staining (G) due to the balancer chromosome is shown to the right side of each panel.

doi:10.1371/journal.pone.0133499.g007

that the ‘no cuticle’ phenotype stems from a very early ferritin requirement manifested late by lack of cuticle deposition. Ferritin damage ends in ectopic apoptosis, eventually generalized throughout the embryo.

We also provide evidence of ferritin trafficking. Blocking the secretory pathway during development causes abnormal ferritin distribution, suggesting an additional iron-trafficking role for ferritin. Our ectopic studies point in the same way, at least for the ectopically produced ferritin subunits. This may be responsible for differences in ferritin mRNA and protein expression. Ferritin mutations also cause an up-regulation of *Mvl*, probably as a means to stimulate iron uptake from iron deprived cells.

Tang and Zhou demonstrated the importance of ferritin expression in the larval intestine [26]. Our studies in larval intestine are consistent with this, and suggest that ferritin expression in the gut is a starting point for ferritin larval function.

Our results also point to both ferritin subunits being jointly required in the embryonic CNS. In adult flies, in contrast, both genes might also have different functions. RNA interference in subsets of neurons against *Fer2LCH* but not against *Fer1HCH* disrupted circadian rhythms [54]. Furthermore, some cell types, including commonly used cell culture lines [55,56], only express *Fer1HCH* and not *Fer2LCH*. Overexpression of either *Fer1HCH* or *Fer2LCH*, or both subunits simultaneously in *Drosophila* glia [43] or neurons [53,57] resulted in qualitatively different responses. We also find that embryonic ectopic expression of both ferritin subunits leads to some cells differentially expressing one of the two genes. Use of the *elav-Gal4* driver to silence either *Fer1HCH* or *Fer2LCH* resulted in viable adults with perturbed circadian behavior [54] and apparent neurodegeneration [26]. RNA interference is known to cause reduced expression but not complete silencing of its targets, which may explain why ferritin RNAi flies survived to adulthood. In addition and consistent with our early CNS defects results, overexpression of ferritin subunits in this last study with *elav-Gal4* failed to rescue their respective mutants [26], implying an early ferritin neuronal requirement, before the *elav-Gal4* transgene is active, as seen in our staining experiments with early CNS markers. Furthermore, disrupting ferritin levels (either by reductions or ectopic expression may provoke disequilibrium of ferritin proteins and explain the differing results observed.

We conclude that both ferritins are normally required, but that sometimes regulation in vivo is effected primarily via *Fer2LCH*. Thus, the question of how different cell types regulate in vivo the two ferritin genes and subunits and whether they always act in concert requires further investigation.

Materials and Methods

Fly stocks

All flies were *Drosophila melanogaster* Meigen. As a control strain *y, w* flies were used. *Fer1HCH451* and *Fer2LCH35* are P(ry[+t7.2] = PZ) insertion alleles generated during a large-scale mutagenesis screen [58], and have been partially characterized elsewhere [17]. They were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC); stock numbers #11497 and #11483, respectively. *Fer2LCHΔ17* was generated from an imprecise excision of *Fer2L-CHP1059* (described in Flybase) and interferes with expression of both genes, as confirmed

by complementation crosses. *Df(3R)Fer* was a gift from Alexis Gambis, Bertrand Mollereau, and Hermann Steller and is a 2.2 kb deletion disrupting specifically *Fer1HCH* and *Fer2LCH* [34]. To generate germline clones, *Fer1HCH451* and *Fer2LCH35* were recombined unto FRT82 containing chromosomes [59]. *Fer1HCHG188* is a protein trap line and has been extensively described elsewhere [17,60]. *Mvl97f* is an homozygous viable *P(lacW)* insertion obtained from the (BDSC stock #5151) (Rodriguez, et al. 1995). *Sec23j13c8* mutant is a *P(lacW)* insertion within the 5'UTR of *Sec23* [51]; BDSC stock #10218. *Cg-Gal4* (BDSC stock #7011) was used to drive expression in the hemocytes, *drm-Gal4* (BDSC stock #7098) in embryonic gut and scattered cells around the epidermis, *FB-Gal4* in the fat body (P{GAL4}fat; Flybase ID; FBti0013267) [16,61,62]. UAS-mcherry::*Fer2LCH* and UAS-GFP::*Fer1HCH* were a gift from Alexis Gambis, Hermann Steller and Bertrand Mollereau (Gambis, Steller, and Mollereau, personal communication), and will be described elsewhere. In cases where recombinant or double balanced stocks were needed they were generated following conventional crossing schemes.

Iron diets

Flies were raised for 3 successive generations on standard medium supplemented with 200 μ M Bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt (SIGMA #B1375) referred to as BPS in the text or with 1 mM ammonium iron (III) citrate (SIGMA #F5859) referred to as FAC. Adults were used for embryo collections. Protein extracts from female adults were also analyzed by non-reducing SDS- PAGE, confirming the differential accumulation of ferritin in flies raised on the respective diets.

Immunohistochemistry and confocal imaging

Following dechoriation with a commercial bleach solution, embryos from overnight collections were devitellinized and fixed in a 1:1 mixture of heptane and 36% formaldehyde for 5 minutes and then washed in methanol. Embryos were then stored at -20 C or rehydrated, and used for staining. Primary antibodies used were: rat α -Elav 1:100, mouse α -BP102 1:100, mouse α -Eve 1:100 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Indiana, USA); α -activated Caspase 3 1:100 (Cell Signaling, USA); and rat α -Deadpan 1:2, a gift from Cheng-Yu Lee. Secondary antibodies used were: Alexa flour 546 α -rat 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, USA), Cy5 α -mouse 1:1000, Cy3 α -mouse 1:1000, FITC α -rabbit 1:1000 (Zymax, USA). Signal from α -deadpan staining was increased with the ABC kit from Vectastain (USA). A 510 Meta and 780 Duo confocal microscopes (Zeiss, Germany) were used for fluorescent imaging, and images were processed with Zeiss software and ImageJ. Homozygous mutant embryos were selected by lack of TM3GFP of TM3LacZ. Accumulation of GFP::*Fer1HCH* in *Sec23* mutants was evaluated using the fire LUT of ImageJ.

Cuticle preparations and X-Gal staining

Embryos were collected in agar containing plates for 12 hours and incubated for another 36 hours at 25°C. Viable first instar larvae were removed from cultures. The cuticles of unhatched (dead) embryos were dechorionated and mounted in Hoyer's medium and incubated for 24 hours at 50°C to digest soft tissues. Resulting cuticles were then viewed and photographed with dark field optics in a compound microscope (Nikon, Japan). For X-Gal staining embryos were fixed and stained with X-Gal using standard procedures. Both controls and experimental embryos were incubated in parallel for the same amount of time to allow for direct comparisons.

Supporting Information

S1 Fig. Ferritin expression can be modulated by iron availability. Ferritin complexes were revealed by Coomassie staining and identified by size, when either flies were fed Bathophenanthroline Sulfate (BPS) to reduce iron availability (BPS is an iron chelator), or fed extra iron (FAC).

(TIF)

S2 Fig. *Fer1HCH*⁴⁵¹ is a functional ferritin enhancer trap line. β -Galactosidase expression is normally restricted to the iron region in the larval midgut, but expression is enhanced in the anterior midgut (AMG) when iron fed, as occurs in wild type larvae (Mehta et al. 2009).

(TIF)

S3 Fig. Apoptosis in ferritin mutants. Apoptosis revealed with an α -active caspase 3 antibody (CSP3act) marking apoptotic cells (green), and an α -Elav marking neurons (red) in *Fer1HCH*^{451/451} (A) and *Fer2LCH*^{35/35} (B) mutant embryos.

(TIF)

S4 Fig. Embryonic ectopic expression of fluorescence-tagged ferritin subunits reveals embryonic dynamic ferritin transport of tagged ferritins. (A) Control embryo where embryonic hemocytes are revealed by the *Cg-Gal4* line and UAS-RFP (red fluorescent protein). *Cg-Gal4* drives RFP expression specifically in hemocytes. (B-D) Overexpression of both ferritin tagged subunits in the hemocytes results in ferritin accumulation in these cells (asterisk), but also in other tissues (arrowhead). UAS-mcherry::*Fer2LCH* (UAS-cherry::*Fer2LCH*) tagged ferritin expression is in (B), and UAS-GFP::*Fer1HCH* (UAS-GFP::*Fer1HCH*) is in (C). A merged image is shown in D. The white arrowhead points to embryonic tissues harboring fluorescence other than hemocytes. The asterisk marks hemocytes. (E-G) Higher magnification images of a similar embryo revealing partial co-localization of tagged ferritin subunits driven by *Cg-Gal4*, where cells accumulating one subunit but not the other are seen (dashed circles). UAS-mcherry::*Fer2LCH* expression is shown in (E), UAS-GFP::*Fer1HCH* is shown in (F), and a merged image is shown in G. The tagged ferritin lines will be described elsewhere (Gambis, Steller, and Mollereau, personal communication).

(TIF)

S5 Fig. Ectopic expression of tagged ferritin subunits reveals dynamic ferritin transport in larvae. (A) Ectopic expression of RFP::*Fer2LCH* using a *Fer2LCH-Gal4* line results in ferritin accumulation in the anterior midgut and in Garland cells (dashed line). UAS-GFP was used as a transcription marker for *Fer2LCH-Gal4* activity (A') and is detected in the anterior midgut but not in the Garland cells. Merged image in (A''). (B) Likewise, ectopic expression of GFP::*Fer1HCH* using *Fer2LCH-Gal4* also results in GFP::*Fer1HCH* accumulation in the anterior midgut and in Garland cells (dashed line). Nuclear RFP (B') was used as a transcription marker for *Fer2LCH-Gal4* and is detected in the anterior midgut but not in the Garland cells. Merged image in (B''). (C) Ectopic expression of tagged ferritin subunits in neurons via *elav-Gal4* results in their accumulation in Garland cells, implying GFP::*Fer1HCH* (C) and RFP::*Fer2LCH* (C') transport from neurons to Garland cells. Merged image in (C'') also shows localization of Garland cells around digestive tract (combined fluorescence and transmitted light image). (D) Glial expression via the *repo-Gal4* driver of both tagged ferritin subunits (GFP::*Fer1HCH* (D) and RFP::*Fer2LCH* (D')) results in tagged their accumulation in a discrete portion of midgut enterocytes. Merged image in (D'').

(TIF)

Acknowledgments

We thank María Teresa Peña-Rangel for technical assistance during the course of this project, Nydia Hernández-Rios for assistance with the use of the confocal microscope. We also acknowledge Cheng- Yu Lee for sending the α -deadpan antibody and Alexis Gambis, Hermann Steller, and Bertrand Mollereau for sharing the *Df(3R)Fer*, and the UAS-mcherry::Fer2LCH and UAS-GFP::Fer1HCH fly stocks prior to publication. This work is part of the PhD dissertation of Miguel Ángel Mendoza-Ortíz, who is a PhD student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a PhD fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [164428].

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NGM MÁMO FM JRRE. Performed the experiments: NGM MÁMO LMB FM JRRE. Analyzed the data: NGM MÁMO FM JRRE. Contributed reagents/materials/analysis tools: FM JRRE. Wrote the paper: NGM FM JRRE.

References

1. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820: 161–87. doi:S0304-4165(11)00185-1 [pii] doi: [10.1016/j.bbagen.2011.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.002) PMID: [21856378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21856378/)
2. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997; 388: 482–8. doi: [10.1038/41343](https://doi.org/10.1038/41343) PMID: [9242408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9242408/)
3. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 72–81. doi:nrm2295 [pii] doi: [10.1038/nrm2295](https://doi.org/10.1038/nrm2295) PMID: [17987043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17987043/)
4. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1275: 161–203. PMID: [8695634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8695634/)
5. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2004; 117: 285–97. doi:S0092867404003435 [pii] PMID: [15109490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15109490/)
6. Santambrogio P, Levi S, Cozzi A, Rovida E, Albertini A, Arosio P. Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J Biol Chem*. 1993; 268: 12744–8. PMID: [8509409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8509409/)
7. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 51: 5705–24. doi: [10.1021/bi300752r](https://doi.org/10.1021/bi300752r)
8. Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Acad Sci*. 2004; 1012: 1–13.
9. Piccinelli P, Samuelsson T. Evolution of the iron-responsive element. *RNA*. 2007; 13: 952–66. doi:ma.464807 [pii] doi: [10.1261/ma.464807](https://doi.org/10.1261/ma.464807) PMID: [17513696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17513696/)
10. Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, Leete T, et al. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell*. 2009; 16: 35–46. doi:S1534-5807(08)00512-1 [pii] doi: [10.1016/j.devcel.2008.12.002](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.002) PMID: [19154717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19154717/)
11. Todorich B, Zhang X, Slagle-Webb B, Seaman WE, Connor JR. Tim-2 is the receptor for H-ferritin on oligodendrocytes. *J Neurochem*. 2008; 107: 1495–505. doi:JNC5678 [pii] doi: [10.1111/j.1471-4159.2008.05678.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05678.x) PMID: [19014383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19014383/)
12. Fisher J, Devraj K, Ingram J, Slagle-Webb B, Madhankumar AB, Liu X, et al. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293: C641–9. doi:00599.2006 [pii] doi: [10.1152/ajpcell.00599.2006](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00599.2006) PMID: [17459943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459943/)
13. Meyron-Holtz EG, Moshe-Belizowski S, Cohen LA. A possible role for secreted ferritin in tissue iron distribution. *J Neural Transm*. 2011; 118: 337–47. doi: [10.1007/s00702-011-0582-0](https://doi.org/10.1007/s00702-011-0582-0) PMID: [21298454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21298454/)
14. Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics*. 2014; doi: [10.1039/c3mt00347g](https://doi.org/10.1039/c3mt00347g)

15. Hamburger AE, West AP, Hamburger ZA, Hamburger P, Bjorkman PJ. Crystal structure of a secreted insect ferritin reveals a symmetrical arrangement of heavy and light chains. *J Mol Biol.* 2005; 349: 558–69. doi:S0022-2836(05)00375-X [pii] doi: [10.1016/j.jmb.2005.03.074](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.074) PMID: [15896348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15896348/)
16. Missirlis F, Holmberg S, Georgieva T, Dunkov BC, Rouault TA, Law JH. Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2006; 103: 5893–8. doi:0601471103 [pii] doi: [10.1073/pnas.0601471103](https://doi.org/10.1073/pnas.0601471103)
17. Missirlis F, Kosmidis S, Brody T, Mavrakis M, Holmberg S, Odenwald WF, et al. Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. *Genetics.* 2007; 177: 89–100. doi:genetics.107.075150 [pii] doi: [10.1534/genetics.107.075150](https://doi.org/10.1534/genetics.107.075150) PMID: [17603097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17603097/)
18. Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH. Iron availability dramatically alters the distribution of ferritin subunit messages in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U A.* 1999; 96: 2716–21.
19. Georgieva T, Dunkov BC, Dimov S, Ralchev K, Law JH. *Drosophila melanogaster* ferritin: cDNA encoding a light chain homologue, temporal and tissue specific expression of both subunit types. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002; 32: 295–302. doi:S096517480100090X [pii] PMID: [11804801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11804801/)
20. Mandilaras K, Pathmanathan T, Missirlis F. Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients.* 2013; 5: 1622–47. doi:nu5051622 [pii] doi: [10.3390/nu5051622](https://doi.org/10.3390/nu5051622) PMID: [23686013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23686013/)
21. Kumar S, Konikoff C, Van Emden B, Busick C, Davis KT, Ji S, et al. FlyExpress: visual mining of spatio-temporal patterns for genes and publications in *Drosophila* embryogenesis. *Bioinformatics.* 2011; 27: 3319–20. doi:btr567 [pii] doi: [10.1093/bioinformatics/btr567](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr567) PMID: [21994220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21994220/)
22. Lind MI, Missirlis F, Melefors O, Uhrigshardt H, Kirby K, Phillips JP, et al. Of two cytosolic aconitases expressed in *Drosophila*, only one functions as an iron-regulatory protein. *J Biol Chem.* 2006; 281: 18707–14. doi:M603354200 [pii] doi: [10.1074/jbc.M603354200](https://doi.org/10.1074/jbc.M603354200) PMID: [16679315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16679315/)
23. Folwell JL, Barton CH, Shepherd D. Immunolocalisation of the *D. melanogaster* Nramp homologue Malvolio to gut and Malpighian tubules provides evidence that Malvolio and Nramp2 are orthologous. *J Exp Biol.* 2006; 209: 1988–95. doi:209/10/1988 [pii] doi: [10.1242/jeb.02193](https://doi.org/10.1242/jeb.02193) PMID: [16651563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16651563/)
24. Rodrigues V, Cheah PY, Ray K, Chia W. malvolio, the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO J.* 1995; 14: 3007–20. PMID: [7621816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7621816/)
25. D'Souza J, Cheah PY, Gros P, Chia W, Rodrigues V. Functional complementation of the malvolio mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1). *J Exp Biol.* 1999; 202: 1909–15. PMID: [10377272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10377272/)
26. Tang X, Zhou B. Ferritin is the key to dietary iron absorption and tissue iron detoxification in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 2013; 27: 288–98. doi:fj.12-213595 [pii] doi: [10.1096/fj.12-213595](https://doi.org/10.1096/fj.12-213595) PMID: [23064556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23064556/)
27. Nichol H, Law JH, Winzerling JJ. Iron metabolism in insects. *Annu Rev Entomol.* 2002; 47: 535–559. doi: [10.1146/annurev.ento.47.091201.145237](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145237) PMID: [11729084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11729084/)
28. Zhou G, Kohlhepp P, Geiser D, Frasquillo MC, Vazquez-Moreno L, Winzerling JJ. Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J Insect Physiol.* 2007; 53: 1169–78. doi:S0022-1910(07)00145-X [pii] doi: [10.1016/j.jinsphys.2007.06.009](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.009) PMID: [17689557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17689557/)
29. Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, et al. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2009; 106: 1033–8. doi:0807961106 [pii] doi: [10.1073/pnas.0807961106](https://doi.org/10.1073/pnas.0807961106)
30. Galay RL, Aung KM, Umerniya-Shirafuji R, Maeda H, Matsuo T, Kawaguchi H, et al. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Exp Biol.* 2013; 216: 1905–15. doi:jeb.081240 [pii] doi: [10.1242/jeb.081240](https://doi.org/10.1242/jeb.081240) PMID: [23393286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23393286/)
31. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980; 287: 795–801. PMID: [6776413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6776413/)
32. Gutierrez L, Sabaratnam N, Aktar R, Bettedi L, Mandilaras K, Missirlis F. Zinc accumulation in heterozygous mutants of fumble, the pantothenate kinase homologue of *Drosophila*. *FEBS Lett.* 2010; 584: 2942–6. doi:S0014-5793(10)00422-9 [pii] doi: [10.1016/j.febslet.2010.05.029](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.029) PMID: [20493851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20493851/)
33. Tennessen JM, Bertagnolli NM, Evans J, Sieber MH, Cox J, Thummel CS. Coordinated metabolic transitions during *Drosophila* embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. *G3 Bethesda Md.* 2014; 4: 839–850. doi: [10.1534/g3.114.010652](https://doi.org/10.1534/g3.114.010652)
34. Gutierrez L, Zubow K, Nield J, Gambis A, Mollereau B, Lazaro FJ, et al. Biophysical and genetic analysis of iron partitioning and ferritin function in *Drosophila melanogaster*. *Metallomics.* 2013; 5: 997–1005. doi: [10.1039/c3mt00118k](https://doi.org/10.1039/c3mt00118k) PMID: [23771129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23771129/)

35. Mehta A, Deshpande A, Betti L, Missirlis F. Ferritin accumulation under iron scarcity in *Drosophila* iron cells. *Biochimie*. 2009; 91: 1331–4. doi:S0300-9084(09)00129-1 [pii] doi: [10.1016/j.biochi.2009.05.003](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.05.003) PMID: [19465081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465081/)
36. Biffar L, Stollewerk A. Conservation and evolutionary modifications of neuroblast expression patterns in insects. *Dev Biol*. 2014; 388: 103–116. doi: [10.1016/j.ydbio.2014.01.028](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.028) PMID: [24525296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24525296/)
37. Boone JQ, Doe CQ. Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol*. 2008; 68: 1185–95. doi: [10.1002/dneu.20648](https://doi.org/10.1002/dneu.20648) PMID: [18548484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18548484/)
38. Kohwi M, Lupton JR, Lai SL, Miller MR, Doe CQ. Developmentally regulated subnuclear genome reorganization restricts neural progenitor competence in *Drosophila*. *Cell*. 2013; 152: 97–108. doi:S0092-8674(12)01437-7 [pii] doi: [10.1016/j.cell.2012.11.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.049) PMID: [23332748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23332748/)
39. Thompson K, Menzies S, Muckenthaler M, Torti FM, Wood T, Torti SV, et al. Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a protein profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative stress. *J Neurosci Res*. 2003; 71: 46–63. doi: [10.1002/jnr.10463](https://doi.org/10.1002/jnr.10463) PMID: [12478613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12478613/)
40. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, et al. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell*. 2004; 119: 529–42. doi:S0092867404009985 [pii] doi: [10.1016/j.cell.2004.10.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.017) PMID: [15537542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15537542/)
41. Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. 2006; 2: 406–14. doi:nchembio807 [pii] doi: [10.1038/nchembio807](https://doi.org/10.1038/nchembio807) PMID: [16850017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16850017/)
42. Gambis A, Dourlen P, Steller H, Mollereau B. Two-color in vivo imaging of photoreceptor apoptosis and development in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2011; 351: 128–34. doi:S0012-1606(10)01296-0 [pii] doi: [10.1016/j.ydbio.2010.12.040](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.040) PMID: [21215264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215264/)
43. Kosmidis S, Botella JA, Mandilaras K, Schneuwly S, Skoulakis EM, Rouault TA, et al. Ferritin overexpression in *Drosophila* glia leads to iron deposition in the optic lobes and late-onset behavioral defects. *Neurobiol Dis*. 2011; 43: 213–9. doi:S0969-9961(11)00095-7 [pii] doi: [10.1016/j.nbd.2011.03.013](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.03.013) PMID: [21440626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21440626/)
44. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012; 149: 1060–1072. doi: [10.1016/j.cell.2012.03.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042) PMID: [22632970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22632970/)
45. Denton D, Mills K, Kumar S. Methods and protocols for studying cell death in *Drosophila*. *Methods Enzym*. 2008; 446: 17–37. doi:S0076-6879(08)01602-9 [pii] doi: [10.1016/S0076-6879\(08\)01602-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01602-9)
46. Betti L, Aslam MF, Szular J, Mandilaras K, Missirlis F. Iron depletion in the intestines of *Malvolio* mutant flies does not occur in the absence of a multicopper oxidase. *J Exp Biol*. 2011; 214: 971–8. doi:214/6/971 [pii] doi: [10.1242/jeb.051664](https://doi.org/10.1242/jeb.051664) PMID: [21346125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21346125/)
47. Lang M, Braun CL, Kanost MR, Gorman MJ. Multicopper oxidase-1 is a ferroxidase essential for iron homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2012; 109: 13337–42. doi:1208703109 [pii] doi: [10.1073/pnas.1208703109](https://doi.org/10.1073/pnas.1208703109)
48. Peng Z, Dittmer NT, Lang M, Brummett LM, Braun CL, Davis LC, et al. Multicopper oxidase-1 orthologs from diverse insect species have ascorbate oxidase activity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2015; 59: 58–71. doi: [10.1016/j.ibmb.2015.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.02.005) PMID: [25701385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25701385/)
49. Uhrigshardt H, Rouault TA, Missirlis F. Insertion mutants in *Drosophila melanogaster* Hsc20 halt larval growth and lead to reduced iron-sulfur cluster enzyme activities and impaired iron homeostasis. *J Biol Inorg Chem*. 2013; 18: 441–9. doi: [10.1007/s00775-013-0988-2](https://doi.org/10.1007/s00775-013-0988-2) PMID: [23444034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444034/)
50. Evans IR, Wood W. *Drosophila* embryonic hemocytes. *Curr Biol CB*. 2011; 21: R173–174. doi: [10.1016/j.cub.2011.01.061](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.061) PMID: [21377090](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21377090/)
51. Abrams EW, Andrew DJ. CrebA regulates secretory activity in the *Drosophila* salivary gland and epidermis. *Development*. 2005; 132: 2743–58. doi:dev.01863 [pii] doi: [10.1242/dev.01863](https://doi.org/10.1242/dev.01863) PMID: [15901661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15901661/)
52. Na J, Cagan R. The *Drosophila* nephrocyte: back on stage. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24: 161–163. doi: [10.1681/ASN.2012121227](https://doi.org/10.1681/ASN.2012121227) PMID: [23334393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23334393/)
53. Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol Aging*. 2012; 33: 199 e1–12. doi:S0197-4580(10)00283-6 [pii] doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.018](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.018) PMID: [20674094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20674094/)
54. Mandilaras K, Missirlis F. Genes for iron metabolism influence circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Met Integr Biometal Sci*. 2012; 4: 928–936. doi: [10.1039/c2mt20065a](https://doi.org/10.1039/c2mt20065a)
55. Missirlis F, Hu J, Kirby K, Hilliker AJ, Rouault TA, Phillips JP. Compartment-specific protection of iron-sulfur proteins by superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2003; 278: 47365–9. doi: [10.1074/jbc.M307700200](https://doi.org/10.1074/jbc.M307700200) M307700200 [pii] PMID: [12972424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12972424/)

56. Metzendorf C, Wu W, Lind MI. Overexpression of *Drosophila* mitoferrin in I(2)mbn cells results in dysregulation of Fer1HCH expression. *Biochem J.* 2009; 421: 463–71. doi:BJ20082231 [pii] 10.1042/BJ20082231 doi: [10.1042/BJ20082231](https://doi.org/10.1042/BJ20082231) PMID: [19453295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453295/)
57. Kosmidis S, Missirlis F, Botella JA, Schnewly S, Rouault TA, Skoulakis EMC. Behavioral decline and premature lethality upon pan-neuronal ferritin overexpression in *Drosophila* infected with a virulent form of *Wolbachia*. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 66. doi: [10.3389/fphar.2014.00066](https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00066) PMID: [24772084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24772084/)
58. Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Lavery T, Mozden N, et al. The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics.* 1999; 153: 135–77. PMID: [10471706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10471706/)
59. Xu T, Rubin GM. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development.* 1993; 117: 1223–37. PMID: [8404527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8404527/)
60. Kelso RJ, Buszczak M, Quinones AT, Castiblanco C, Mazzalupo S, Cooley L. Flytrap, a database documenting a GFP protein-trap insertion screen in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: D418–20. doi: [10.1093/nar/gkh014](https://doi.org/10.1093/nar/gkh014) 32/suppl_1/D418 [pii] PMID: [14681446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14681446/)
61. Missirlis F, Rahlfs S, Dimopoulos N, Bauer H, Becker K, Hilliker A, et al. A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol Chem.* 2003; 384: 463–72. doi: [10.1515/BC.2003.052](https://doi.org/10.1515/BC.2003.052) PMID: [12715897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12715897/)
62. Dos Santos G, Schroeder AJ, Goodman JL, Strelets VB, Crosby MA, Thurmond J, et al. FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations. *Nucleic Acids Res.* 2014; gku1099. doi: [10.1093/nar/gku1099](https://doi.org/10.1093/nar/gku1099)