

Universitat Politècnica de València

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO NATURAL



ESTUDIOS SOBRE EL GEN PHF5a EN *Drosophila melanogaster*

Trabajo Fin de Grado
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO ACADÉMICO: 2014-2015
Valencia, Julio 2015

Autor: Francisco José Martínez Blázquez

Tutor: Miguel Leiva Brondo

Co-Tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

Centro de Investigación Príncipe Felipe, CIPF

Departamento de Biología del Desarrollo y Modelos de Enfermedades
Neuromusculares



Tipo de Licencia: Reconocimiento – No Comercial – Sin Obra Derivada

Estudios sobre el gen PHF5a en *Drosophila melanogaster*

Autor: Francisco José Martínez Blázquez

Tutor: Miguel Leiva Brondo

Co-tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

Tipo de Licencia: Reconocimiento – No Comercial – Sin Obra Derivada

Valencia, Julio 2015

RESUMEN

La proteína PHF5a ha sido descrita como un componente del complejo espliceosomal, sin embargo, nuevas investigaciones han relacionado su presencia como un factor esencial en ciertos tumores. Poco se conoce acerca de otros fenómenos como expresión génica o mitosis celular de los que se tiene constancia, que PHF5a participa de alguna manera. En este estudio se realizaron diversos experimentos en los cuáles se llevó a cabo el silenciamiento o la sobreexpresión de PHF5a en *Drosophila melanogaster*, para evaluar los cambios fenotípicos producidos.

Esta proteína fue primeramente silenciada en todo el organismo y, más tarde, silenciada por sistemas más restrictivos en determinados órganos. Los fenotipos conseguidos se evaluaron de una forma visual y al microscopio, mediante análisis de imágenes. Además, se comprobó los efectos producidos por la sobreexpresión de PHF5a a su longevidad.

Tras la observación de los resultados, se demuestra que esta proteína es un factor crítico para la supervivencia del organismo y que se requiere, especialmente, en las etapas de desarrollo larvario y metamorfosis de mosca. El mecanismo por el cual actúa es todavía desconocido, aunque parece estar relacionado con el proceso de mitosis celular. En cuanto a la sobreexpresión, los datos están inacabados y, hasta la fecha, parecen ser algo contradictorios.

Estos datos muestran un papel crucial de PHF5a en el desarrollo de este organismo y su posible implicación en procesos celulares en los que no se pensaba que podía estar involucrado. Esto puede conducir a replantearse la aparente información que hay de PHF5a hasta el momento.

Palabras clave: discos imaginales, RNA interferente, silenciamiento génico, sobreexpresión, inmunofluorescencia

Studies about PHF5a gene in *Drosophila melanogaster*

Author: Francisco José Martínez Blázquez

Tutor: Miguel Leiva Brondo

Co-tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

License Type: Attribution-Noncommercial-No Derivative Works

Valencia, July 2015

ABSTRACT

The PHF5a protein has been described as a component of the spliceosomal complex. Nevertheless, recent studies have demonstrated its implication as an essential factor in certain tumors. On the other hand, little is known about other processes such as gene expression or cellular mitosis where it has been shown that PHF5a is involved somehow. In the present study using *Drosophila melanogaster* as model organism, overexpression and silencing experiments of PHF5a were conducted in order to assess the resulting phenotypic changes.

Along the first part of the project, the protein was silenced throughout the whole body and after that the silencing was directed against target organs by more stringent expression systems. Thereafter, phenotypes were evaluated visually and by microscope using image analysis. Furthermore, by studying the flies' longevity the effects of PHF5a overexpression were proved.

The results' analysis demonstrates the protein's critical role in the survival of the organism, especially its requirement in larva development and fly metamorphosis. The mechanism by which it acts is still unknown, although it seems to be related to the process of cellular mitosis. Regarding the results of the overexpression, data are still uncompleted and seem to be contradictory up to now.

Taking into account the previous considerations, this study shows PHF5a crucial function in *D. melanogaster's* development and its possible implication in cellular processes nobody thought it could be involved. Thus, these facts may lead to reconsider the existing information about PHF5a.

Key words: imaginal discs, RNA interference, gene silencing, overexpression, immunofluorescence

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Fin de Grado no habría podido ser realizado sin una serie de personas que me han ayudado durante el desarrollo del mismo y a las que me gustaría hacer especial mención.

En primer lugar, dar las gracias a mi tutor del CIPF, Máximo Ibo Galindo, por haberme ayudado a realizar este trabajo y dejarme trabajar en su estupendo equipo de investigación. También estoy agradecido a mi tutor de la UPV, Miguel Leiva, por solventar mis problemas acerca de este trabajo y por su corrección y colaboración en este escrito.

También quería hacer especial mención a Víctor López y Tamara Ovejero que me han ayudado a manejarme en el laboratorio, a resolver cualquier duda que me ha surgido y de los que he aprendido tanto.

Mi gratitud a mi compañera de trabajo durante un breve periodo de tiempo, Maite Sánchez, que me ayudó desde un primer momento cuando más estaba perdido. Y por último, recordar también a mi compañera de banca, Andrea Tapia, con la que me reído y con quién ha sido un placer estar al lado.

Y por último, mi gratitud a mis sponsors que han contribuido económicamente durante todos los años de mi vida, mis padres. Y a toda mi familia y amigos que siempre han estado ahí.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Materiales	
Cepas utilizadas en los cruces de moscas.....	10
3.2. Métodos	
Mantenimiento de las moscas.....	12
Métodos de biología molecular.....	11
Métodos histológicos.....	14
Métodos inmunológicos.....	14
Microscopía.....	15
Estadística y representaciones de gráficos.....	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIÓN.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia proteica de PHF5a.....	2
Figura 2. Expresión de PHF5a en embriones de <i>Drosophila</i>	4
Figura 3. Ciclo vital de <i>Drosophila</i>	7
Figura 4. Esquema de los cruces realizados para el silenciamiento del gen <i>PHF5a</i> con el promotor de la actina.....	16
Figura 5. Larvas necróticas con silenciamiento GD (fuerte) del gen <i>PHF5a</i>	17
Figura 6. Gel empleado para correr los productos de la PCR.....	17
Figura 7. Expresión relativa del gen <i>PHF5a</i> respecto del gen referencia <i>gadh1</i>	18
Figura 8. Esquema de los cruces realizados para la sobreexpresión del gen <i>PHF5a</i> con el promotor de la actina.....	18
Figura 9. Curvas de supervivencia entre individuos con sobreexpresión.....	19
Figura 10. Esquema de los cruces realizados para el silenciamiento del gen <i>PHF5a</i> con el promotor de <i>engrailed</i>	20
Figura 11. Comparación de la histología de discos imaginales de ala en GFP positivos.....	21
Figura 12. Evolución durante la etapa de pupa en moscas control, cepa <i>en-Gal4, UAS-GFP/+</i> , y muestras experimentales con silenciamiento GD dirigido por el promotor <i>en</i>	22
Figura 13. Esquema de los cruces realizados para el silenciamiento del gen <i>PHF5a</i> con el promotor de <i>dpp</i>	23
Figura 14. Inmunofluorescencia de los discos imaginales de ala <i>dpp</i> GFP positivos...	24
Figura 15. Comparación entre las áreas del <i>dpp</i> en discos control y con discos experimentales, con silenciamiento GD.....	25
Figura 16. Porcentajes del número de puntos de Fosfohistona H3 contados en la zona <i>dpp</i> , respecto del total en los discos imaginales de ala.....	25
Figura 17. Porcentajes del número de puntos de Caspasa 3 contados en la zona <i>dpp</i> , respecto del total en los discos imaginales de ala.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de moscas utilizadas en los distintos experimentos del trabajo.....	10
Tabla 2. Lista de ingredientes y cantidades necesarios para la comida de moscas....	11
Tabla 3. Reactivos necesarios y cantidades del primer mix utilizado en la retrotranscripción.....	12
Tabla 4. Reactivos necesarios y cantidades del segundo mix utilizado en la retrotranscripción.....	13
Tabla 5. Secuencias de los distintos primers empleados.....	13
Tabla 6. Reactivos y cantidades empleados en la PCR.....	13
Tabla 7. Programa de la PCR.....	13

ABREVIATURAS

GFP: Proteína verde fluorescente

ARN: Ácido ribonucleíco

ARNi: Ácido ribonucleíco de interferencia

snRNP: Ribonucleoproteína pequeña nuclear

UAS: Secuencia activadora corriente arriba

wt: Cepa salvaje

GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

PBS: Tampón fosfato salino

PBT: Tampón fosfato salino con Tritón-X 100

s: Segundos

min: Minutos

1. Introducción

La búsqueda de nuevos procesos y moléculas diana candidatas para un tratamiento terapéutico contra el cáncer, es algo prioritario hoy en día y de gran relevancia en el campo sanitario (revisado en Vockley and Niederhuber, 2015). Recientemente, se han encontrado muchos genes que son necesarios para la proliferación celular y supervivencia en distintos tipos de cáncer. Ejemplo de ello, es el gen cuyo producto es la proteína PHF5a (Plant Homeodomain Finger protein 5a) en humano, o CG9548 en *Drosophila melanogaster* (Meigen), colocada en el punto de mira en un estudio de cribado del genoma completo (Hubert *et al.*, 2013). En este experimento, encontraron que PHF5a es uno de los genes clave para la supervivencia y multiplicación de las células madre tumorales de glioblastoma (GSC). Adicionalmente, ensayos en la cascada de alteraciones celulares desencadenada por el tratamiento con el antimetabolito 5-fluorouracilo (5-FU), utilizado en muchos tratamientos generales de quimioterapia, asocian a esta proteína como uno de los genes diana que pueden mediar en la citotoxicidad de 5-FU (Mojardin *et al.*, 2013). Muy poco se sabe hasta la fecha de PHF5a, de modo, que la información que pueda extraerse del presente trabajo, puede ofrecer más indicios acerca de cómo aprovecharse de ella en el tratamiento contra el cáncer.

El cáncer es ahora una de las enfermedades con más relevancia en el panorama mundial. De acuerdo a la cifras es la segunda causa de mortalidad en países desarrollados, por detrás de enfermedades cardiovasculares, y está cogiendo importancia en los países en desarrollo y subdesarrollados (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2015). Este aumento remarcado tiene su explicación en dos hechos principales. El primero es el aumento de la edad en las poblaciones y el segundo, a los hábitos de vida como el tabaco, la inactividad física o las dietas de comida rápida (revisión Anand *et al.*; 2008 Jemal *et al.*, 2010). De ahí que a lo largo del siglo XX, con el aumento de la esperanza de vida y la comodidad en la vida cotidiana en los países desarrollados, aumento de la contaminación por la industrialización de muchas ciudades en países en desarrollo, etc., el cáncer haya cogido una mayor incidencia (revisión de Jones *et al.*, 2006).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las próximas 2 décadas, el número de nuevos casos se aumentará en un 70% a nivel mundial. Se esperan unos 15 millones de nuevos casos, de los cuales 12 acabarán muriendo (OMS, 2012). Actualmente las terapias más utilizadas son la quimioterapia, radioterapia y la cirugía. Todas ellas sólo ofrecen un tratamiento paliativo al cáncer y presentan numerosos efectos secundarios que empeoran considerablemente la calidad vida del paciente (revisado en Rampling *et al.*, 2004; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). A causa de ello, es necesaria la investigación para prevenir, controlar y curar el cáncer. En estos últimos años, se está intentando conseguir nuevas terapias personalizadas basadas en biomarcadores predictivos de respuesta, que den mejor resultado en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes (revisado en Di Leo *et al.*, 2015). Es ahí, donde puede ser posible que PHF5a juegue su papel en años futuros, cuando se descubra los procesos exactos en los que interviene.

PHF5a, también conocida como Rds3 en *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen), MCG1346 en *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan), GC9548 en *D. melanogaster* o Ini1 en

Schizosaccharomyces pombe, (Linder) es una proteína pequeña que en vertebrados contiene 110 aminoácidos y su peso molecular es de unos 14 KDa. Es un tipo de proteínas que contiene los motivos de los PHD, *plant homeodomain*, que forman un dedo PHD y funcionan como factores de transcripción, represores o cofactores y/o modulación de la cromatina, mediante su actividad de unión a nucleosomas (revisión de Bienz, 2006). El dedo PHD fue descubierto por primera vez en la proteína HAT3.1 de *Arabidopsis thaliana*, (Heynhold) donde cumple funciones de unión proteína-proteína y proteína-ADN (Schindler *et al.*, 1993). PHF5a contiene 3 dedos de zinc, una cremallera de leucina y una señal de translocación nuclear (figura 1A) lo que le permite desarrollar sus funciones anteriormente comentadas. Sin embargo, su estructura tridimensional no se ajusta a los dedos PHD característicos. Según un experimento de resonancia magnética nuclear (NMR) en levadura (van Roon *et al.*, 2008), la Rds3 forma una estructura enrevesada de nudo, no vista en otras proteínas con dedos de zinc. La secuencia proteica de PHF5a está altamente conservada, siendo 100% idéntica en todos los vertebrados estudiados y hasta un 55% en la secuencia ortóloga más distante encontrada, la Rds3 de *S. cerevisiae* (figura 1B). Tal grado de conservación durante el proceso evolutivo entre especies, implica que esta proteína cumple una función común y muy importante. Hasta esencial, como comprobaremos más adelante.

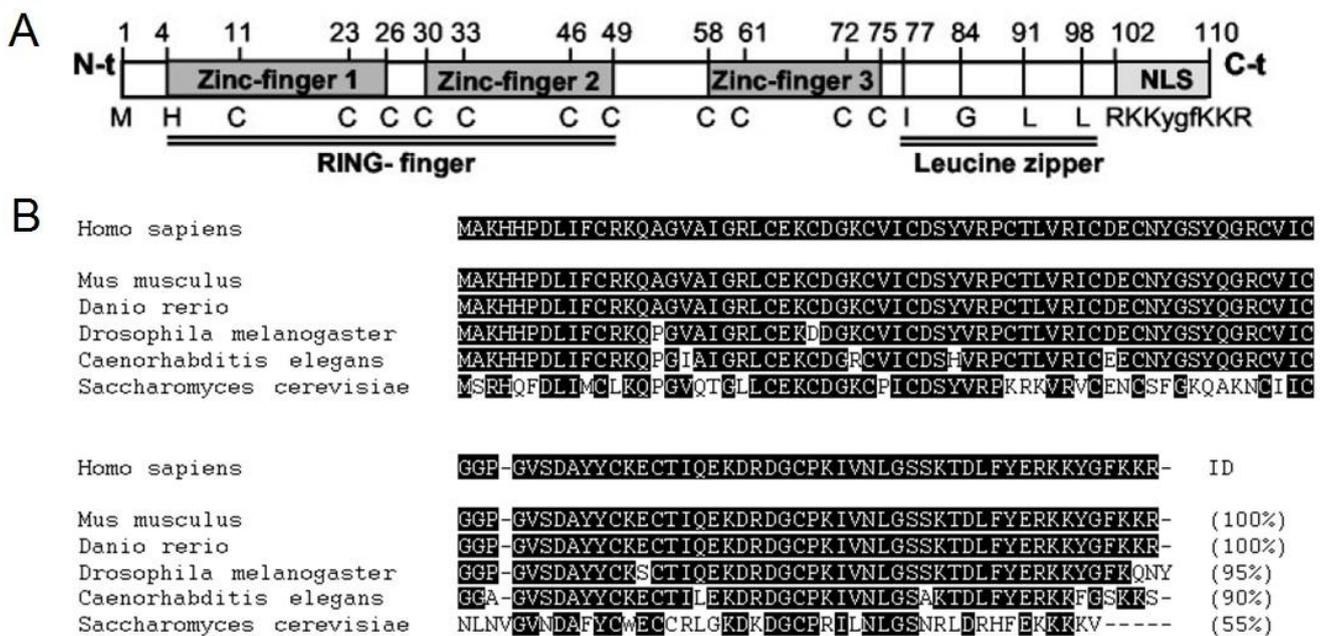


Figura 1. Secuencia proteica de PHF5a. A, estructura esquemática de PHF5a. Posiciones de cisteínas e histidinas que posiblemente participen en la unión al zinc y los residuos participantes de la cremallera de leucina. La señal de translocación nuclear también está indicada. B, alineamiento de secuencias ortólogas de PHF5a mediante el programa de alineamiento ClustalW de EBI (European Bioinformatics Institute, 2015).

PHF5a se encuentra predominantemente en el núcleo, aunque también en el citoplasma, de acuerdo a los resultados obtenidos en levadura por microscopia de fluorescencia al fusionar PHF5a con GFP (Green fluorescent protein) (Oltra *et al.*, 2004). Trappe *et al.* (2002a) también confirmaron su presencia nuclear en células de ratón, además de comprobar, que no se encuentra en el espacio nucleolar sino en los *nuclear speckles* o agrupaciones de gránulos intercromatínicos. Esta proteína está presente en el complejo pre-espliceosomal, formando parte de la ribonucleoproteína

U2 (U2 snRNP) (Herold *et al.*, 2009; Will *et al.*, 2002). La U2 snRNP es la responsable de unirse al *branch site* o sitio de ramificación en el intrón que va a ser escindido y, por ende, participa en la interacción con el siguiente complejo en unirse al espliceosoma, el complejo U4/U6.U5 snRNP (revisado en Will and Luhrmann, 2011). Su participación en el proceso de edición del ARN concuerda con su localización nuclear, al no encontrarse en el nucléolo, sino en el resto del núcleo, dentro de los llamados *nuclear speckles*, los lugares cuya principal actividad de edición de ARN o *splicing* (revisión de Han *et al.*, 2011). Desde el ser humano hasta levadura, hay una gran disparidad en ciertas proteínas del espliceosoma y de sus factores reguladores, sin embargo, en el caso de PHF5a, su alto grado de conservación entre diversas especies explica que cumpla una función esencial y determinante dentro del complejo U2 snRNP.

En otro estudio (Rzymiski *et al.*, 2008), el homólogo de PHF5a en ratón, PHF-5, se ha encontrado que funciona como una especie de enlace entre proteínas con dominios RS y helicasas ATP dependientes. Los dominios RS, ricos en arginina (R) y serina (S), de ahí su nombre, participan como dominios de interacción entre proteínas dentro del complejo del espliceosoma (revisado en Hertel y Graveley, 2005). Las helicasas ATP dependientes participan principalmente en el metabolismo de ARN como splicing, edición, transcripción, exportación del núcleo, etc. (revisado en Tanner y Linder, 2001). En dicho trabajo, se comprobó que PHF-5 era capaz de interactuar con dos tipos de proteínas RS, U2AF1 y SFRS5, componentes del complejo U2 snRNP, y dos helicasas, DDX1 y EP400. A parte, también se demostró la alta expresión de PHF-5 junto con las 2 proteínas RS y las helicasas, comentadas anteriormente, en espermatoцитos y espermátidas, indicando un rol importante en la meiosis. Esto implica un papel muy relevante de PHF5a, no sólo como factor de proliferación mitótica celular, sino que sus funciones se extienden a otras divisiones celulares como la meiosis.

Muy pocos análisis se han realizado para observar cuál es el patrón de expresión de PHF5a, durante el tiempo de vida y desarrollo de ciertos organismos y su especificidad de tejido. Trappe *et al.* (2002b) mostraron en sus ensayos con *Caenorhabditis elegans* (Maupas), que PHF5a comienza a expresarse en el embrión de 100-250 células y se extiende, más notoriamente, en todo el embrión en los siguientes estadios morfogénicos. Ya en estado de larvas y adultos, la expresión se restringe al músculo de la faringe, en el músculo de la pared del cuerpo y en músculos anales. En este mismo estudio se realizaron ARN de interferencia (ARNi) de PHF5a, comprobándose su letalidad principalmente en la etapa de embrión. En otro estudio llevado a cabo por compañeros del mismo laboratorio (datos no publicados, Oltra *et al.* 2014), se observa que PHF5a está expresado uniformemente en el embrión de *D. melanogaster*, tanto en el primer como en el cuarto estadio (figura 2). Ya en larva de mosca, observaron su localización en discos de alas y patas, cerebro, cuerpo graso y glándula salival, corroborando su presencia ubicua en el organismo y nuclear en las células.

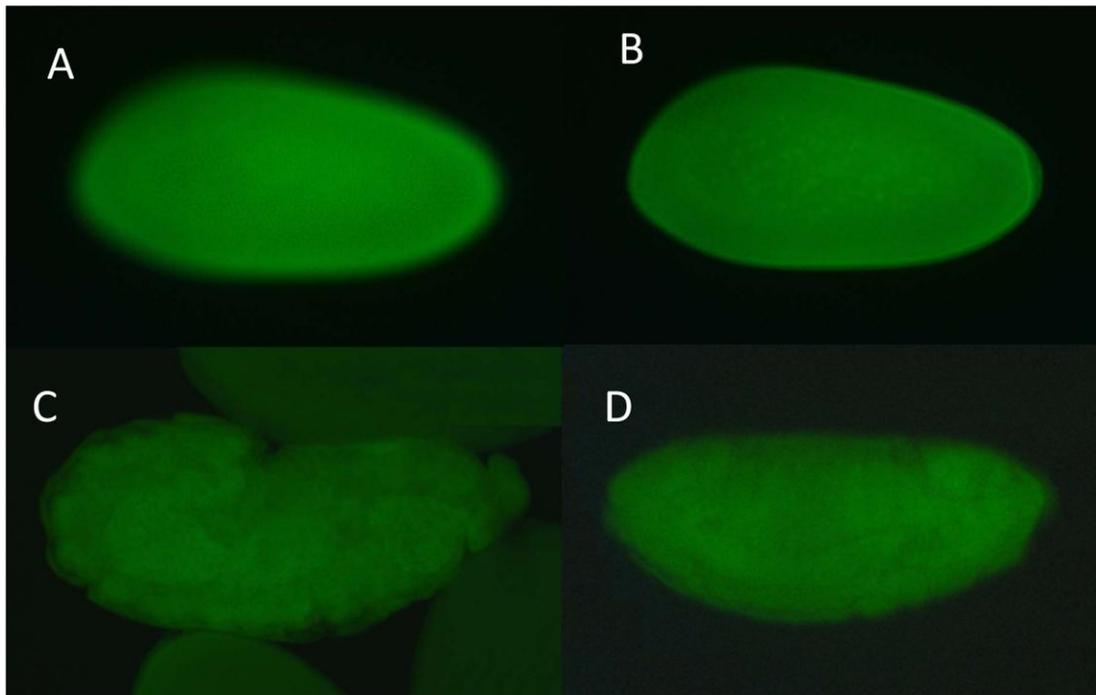


Figura 2. Expresión de PHF5a en embriones de *Drosophila*. PHF5a se fusionó con GFP y su localización fue observada con un microscopio de fluorescencia. La expresión de esta proteína puede observarse que es ubicua en los cuatro estadios de larva. A y B estadios tempranos y C y D, estadios tardíos.

En cuanto al aspecto de esencialidad de PHF5a, en el trabajo anteriormente mencionado, se llevó a cabo el silenciamiento mediante un ARNi en mosca. Los individuos con el ARNi morían en etapa de larva o pupa, lo que demuestra que PHF5a es esencial para el desarrollo de la mosca, volviéndose crítica para la metamorfosis de las pupas y larvas en moscas adultas. En otro experimento (Oltra *et al.*, 2004) se construyó una cepa de levadura sin el gen PHF5a, comprobándose que éstas eran incapaces de completar con éxito la mitosis. El contenido en el ADN era mayoritariamente el doble al normal, lo que indica que el arresto de la división tiene lugar en la fase S tardía o fase G2 del ciclo celular. Esto hace suponer que PHF5a es requerido para acumular factores claves en la transición de G2 a M. También se comprobó un defecto de retención de intrones de varios genes de levadura, hondando en la idea de que PHF5a es un factor clave en el complejo espliceosomal.

Otro aspecto interesante sobre PHF5a es su participación en el proceso de expresión génica. Oltra *et al.* (2003) demostraron que PHF5a en líneas celulares de ratón, se une específicamente al promotor de la conexina 43 (cx43), proteína que forma uniones tipo gap principalmente en el miocardio y en la musculatura del útero de rata. Estas uniones tipo gap son muy importantes para transmitir el potencial de acción en la musculatura del corazón (Inada *et al.*, 2014) y en la sincronía de las contracciones al final del embarazo (Tong *et al.*, 2009). En otro estudio (Xu *et al.*, 2014), establece otra característica importante de la cx43, su participación en las adhesiones celulares como requerimiento para la supervivencia celular y diferenciación en hueso. En Oltra *et al.* (2003), los autores también comprobaron que en respuesta al estrógeno, PHF5a aumenta su expresión y, por tanto, se aumenta la actividad de cx43. Su papel entonces adquiere una nueva extensión, y participa en forma de factor de transcripción o cofactor, con actividad modulable en función de algunas hormonas como el

estrógeno. Sin embargo, su catálogo de funciones debe de ser más amplio al encontrarse distribuido en otros tejidos de distintos organismos.

Curiosamente, las uniones tipo gap que presentan cx43 han sido relacionadas con la supresión de cáncer de mama (McLachlan *et al.*, 2006). En este experimento, líneas celulares humanas de tumor de mama en 2D y en organoides que sobreexpresaban cx43 y cx26, reducían la formación de colonias, inducían diferenciación parcial y reducían el potencial de migración. Esto es debido principalmente a las interacciones célula-célula y célula-matriz que se establecen, siendo un impedimento para las células tumorales en su afán de replicación e invasión, las cuales necesitan cierta libertad de movimiento (revisión de Hanahan and Weinberg, 2011). En otro estudio (Falck and Klinga-Levan, 2013), se comprobó que líneas celulares de ratón con adenocarcinoma endometrial (EAC) presentaban una reducción en los niveles de PHF5a y cx43 (también llamado *Gja1*), lo que concuerda con la idea de su participación como factor de transcripción de cx43. Además, debido a esta relación inversa vista en el experimento, puede suponerse como un posible gen supresor en este tipo de cánceres, aunque hace falta muchos más análisis. De todas formas, de esta manera se confirma la estrecha relación que existe entre la proteína PHF5a, o PHF5a, y el cáncer, siendo un enlace que les une el cx43, comprobado hasta la fecha.

Por último, recientes estudios han puesto en primera plana PHF5a como un gen diana contra el cáncer. Hubert *et al.* (2013) establecieron 4 cultivos celulares que consistían, en una línea de células madre neuronal (NSC) y 3 cultivos aislados de células madre de glioblastoma de pacientes (GSC1, 2 y 3). Mediante el cribado del genoma completo con ARNi de 1086 factores de unión al ADN, se obtuvieron 17 genes letales que se encontraban en las GSCs pero no en la línea NSC. Entre los 17, se encuentra el PHF5a. Su importancia en las GSCs se comprobó al realizar un knockdown, dando como resultado eventos de retención de intrones en cientos de genes. Otro caso importante es el de Mojardin *et al.* (2013) que estudió los efectos del citotóxico 5-FU (fluorouracilo) en levadura. En los análisis de diversos ARN, se ha comprobado un efecto de retención de intrones, detrás del cual, se encuentra el poder citotóxico de 5-FU. También fueron testados, niveles de proteínas que intervienen en el procesado del ARN. PHF5a fue encontrado como una de las proteínas que están inducidas como respuesta al 5-FU. De este modo, PHF5a puede ser un probable mecanismo de defensa debido al desacople de los procesos de procesamiento de ARN que surge con 5-FU. El efecto combinatorio de 5-FU con algún inhibidor de PHF5a u otras proteínas del complejo espliceosomal, puede ayudar a dar mejor resultado.

En conclusión con los antecedentes vistos hasta la fecha, la descripción completa de las funciones de PHF5a queda aún distante. Aunque su participación en el complejo espliceosomal está bastante detallada, es muy escueto quedarse en esta simple definición. Su verdadero papel es aún más extenso, viéndose implicado como cofactor o factor de transcripción génica y una íntima relación en el proceso de tumoral, que aunque no sea fatal y conduzca directamente al cáncer, sí que es una especie de mecanismo utilizado para la supervivencia.

En el presente trabajo, para desarrollar un estudio sobre PHF5a, se ha elegido a *Drosophila melanogaster* como modelo animal. Este organismo fue primeramente utilizado como sistema de investigación científica por Thomas Hunt Morgan (1910).

Como breve descripción sobre *Drosophila*, o mosca de la fruta, comentar que su genoma está completamente secuenciado y anotado y está formado por 4 pares de cromosomas, 3 autosomales y el X/Y sexual. Su genoma se encuentra completamente secuenciado y se observa que contiene alrededor de 14000 genes de los cuales el 60% son codificantes de proteínas. Comparándolo con el ser humano, éste tiene 25000 genes de los cuales un 40% tienen un homólogo con el de mosca. Se estima que el 75% de los genes relacionados con enfermedades humanas, tienen un ortólogo en mosca (Reiter *et al.*, 2001).

El ciclo de vida de mosca es muy corto, siendo desde un huevo hasta un adulto fértil, de 10 días. La duración del ciclo de vida y de los distintos estadios puede variar por diversos factores, de los cuales el más importante es la temperatura. Son 4 los estadios de desarrollo de la mosca: embrión, larva, pupa y adulto (figura 3). En verdad, *Drosophila* ha sido estudiado como 4 distintos organismos modelo, cada uno con sus ventajas y especificidades. El embrión, por ejemplo, es idóneo para estudios de determinación del destino celular, organogénesis, desarrollo neuronal o gradiente y localización de factores que cambian durante el desarrollo. Trabajo a destacar es el de Bertet *et al.* (2004), que comprueba que la elongación de la banda germinal durante el desarrollo del embrión, es causada por un proceso de intercalación de células, no por división o cambios de volumen de células. En estado de larva, sobretodo en el tercer estadio, también es posible el seguimiento de procesos de desarrollo y organogénesis, además de comportamientos simples. En relación a esto último, Xu *et al.* (2004), encontraron que mutaciones en el gen *dfmr1*, el homólogo en mosca del FMR1 humano causante del síndrome X frágil, provocan problemas locomotores vía el gen *ppk1* (subunidad del canal de sodio) en neuronas multidendríticas. En pupa, el nivel experimental ha sido algo más discreto pero, es especialmente importante los mecanismos moleculares y genéticos, que tienen lugar en el desarrollo de los discos imaginales, que han proporcionado valiosa información en la biología humana (revisión de Pandey y Nichols, 2011). La mosca adulta tiene varias estructuras aptas para la experimentación, cuyos resultados asemejen a lo que pasa en el organismo humano. Órganos como por ejemplo corazón, cuerpo graso, intestino, ojo, musculatura o tracto reproductor. Además, el cerebro es muy destacable y las más de 100000 neuronas que lo forman median complejos comportamientos como ritmos circadianos, sueño, memoria, alimentación o agresión. Por ejemplo, en ojo se encontraron varios factores que participan junto con *Notch* en la proliferación y metástasis de células tumorales (Pallavi *et al.*, 2012).

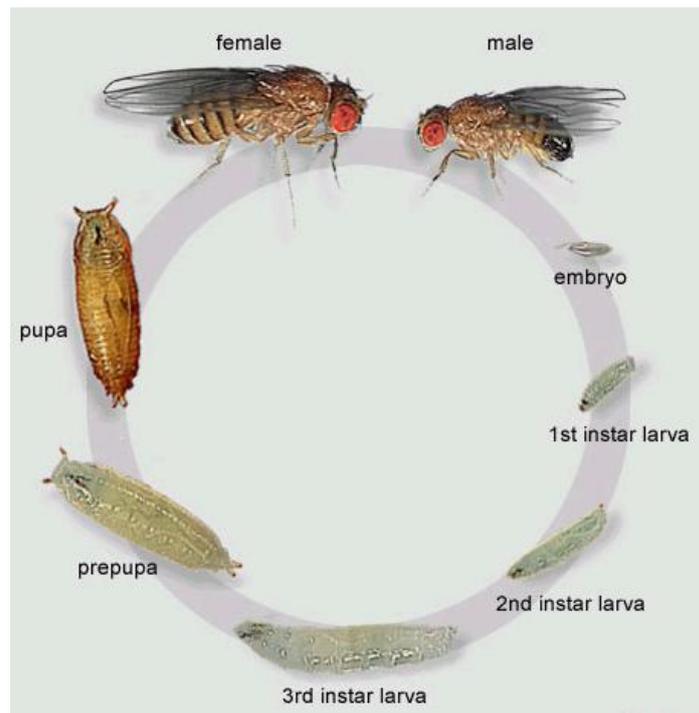


Figura 3. Ciclo vital de *Drosophila*. Comenzando por el embrión, *Drosophila* pasa por 3 estados de larva hasta que se transforma en pupa. Tras la metamorfosis, sale una mosca adulta completa y vuelve a comenzar el ciclo con la progenie. Extraída de: <http://www.artrosfera.com/>

El proceso del cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones que tiene lugar a lo largo de la vida. En organismos como *Drosophila* con un ciclo de vida corto, donde no es muy común que desarrollen cáncer, surge la duda de que puedan ser sistemas donde estudiar los distintos procesos moleculares del cáncer, sin embargo, muchos de los genes y rutas implicados se han mantenido esencialmente a lo largo de la evolución de las células eucariotas. Características del cáncer como evasión de la apoptosis, proliferación excesiva, metástasis, supervivencia prolongada, inestabilidad en el genoma o alteración metabólica, se observan en *Drosophila*, haciendo posible su estudio (revisado en Tipping and Perrimon, 2014).

Uno de los genes más estudiados en *Drosophila* es *Notch*, cuya pérdida provoca muescas en las alas (Morgan, 1917). Su alteración se ha comprobado que provoca exceso de proliferación en órganos como ojos o discos imaginales (Go *et al.*, 1998) y en humanos, el homólogo de *Notch*, se ha relacionado con leucemia linfoblástica de células T (Ellisen *et al.*, 1991). De igual forma, la señalización de Hedgehog (Hh) fue primeramente descrita en *Drosophila*. La pérdida del locus Hh se ha relacionado con la pérdida de tejido en todos los segmentos de larva (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). La sobreactividad de esta ruta se ha relacionado con varios tipos de cánceres como el carcinoma de células basales o BCC (Ozgur *et al.*, 2015). Otra importante ruta descrita en *Drosophila* es la Ras-PI3K. En un amplio estudio (Read *et al.*, 2009), se analizó dicha ruta mediante la activación con el EGFR y muchos de los efectores corriente abajo que son responsables del crecimiento celular y la migración de las células en cerebros de larva. Por tanto, *Drosophila* puede ser un interesante organismo modelo en el cuál basar la experimentación sobre PHF5a.

El objetivo de este trabajo es determinar las consecuencias fenotípicas resultantes del silenciamiento y sobreexpresión de PHF5a en *Drosophila*. Para ello se disponen de diversas moscas transgénicas con diversos constructos, que nos permiten generar las condiciones genéticas necesarias para el silenciamiento o sobreexpresión. Los efectos producidos serán visualizados en larva y en órganos principales como los discos imaginales de ala. Con ello, se pretende elucidar algo más de información sobre el papel desempeñado por PHF5a.

2. Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es determinar las consecuencias fenotípicas resultantes del silenciamiento y sobreexpresión de la proteína PHF5a en *Drosophila melanogaster*. Para ello, se han descrito una serie de objetivos parciales:

- Silenciamiento y sobreexpresión de la proteína en el organismo completo. Observación visual de los fenotipos obtenidos y de la viabilidad del organismo.
- Silenciamiento en ciertos órganos como los discos imaginales de ala. Observación visual de las deficiencias y análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Cepas utilizadas en los cruces de moscas

Para el desarrollo de los experimentos, se utilizaron cepas de moscas transgénicas provenientes de colecciones públicas, además de otras generadas en el laboratorio (tabla 1). El sistema de expresión de los genes, insertos en las cepas, es el GAL4-UAS, por tanto, se utilizan moscas conductoras que expresan el factor de transcripción GAL4 y otras con la secuencia activadora UAS, que es reconocida por GAL4.

Para reconocer los individuos de interés tras cada cruce, algunas de las cepas contienen cromosomas equilibradores. Éstos contienen rearrreglos cromosómicos (múltiples inversiones) que impiden la recombinación con el cromosoma homólogo. Además, presentan al menos un alelo dominante y visible para poder hacerle el seguimiento en la progenie. En este estudio se utilizan los siguientes equilibradores:

- TM6B: es el cromosoma 3 y contiene como marcadores visibles: *Humeral* (Hu), quetas humerales extra; y *Tubby* (Tb), larvas y pupas más pequeñas.
- Cyo: es el cromosoma 2 y contiene como marcador visible *curly* (Cyo), alas de adulto curvadas.

Tabla 1. Cepas de moscas utilizadas en los distintos experimentos del trabajo.

Nombre Abreviado	Genotipo	Descripción	Procedencia
OrR	wt	-	Laboratorio
Act-Gal4	Actina5c-Gal4/TM6B (III)	Cromosoma 3 contiene el promotor constitutivo de la actina citoplasmática (Act) y el gen Gal4, componente del sistema de expresión génica GAL4-UAS. Esta construcción está balanceada con TM6B	Colección pública Bloomington Stock Center (Universidad de Indiana)
KK	UAS-CG9548 ^{RNAi^{KK}} (II)	En el cromosoma 2 en homocigosis contiene, un inserto con el promotor UAS, componente del sistema de expresión génica GAL4-UAS y una copia del gen ARN de interferencia de la proteína PHF5a	Colección pública VDRC (Vienna Drosophila RNAi Center)
GD	UAS-CG9548 ^{RNAi^{GD}} (II)	En el cromosoma 2 en homocigosis contiene, un inserto con el promotor UAS, componente del sistema de expresión génica GAL4-UAS y una copia del gen del ARN de interferencia de la proteína PHF5a.	Colección pública VDRC (Vienna Drosophila RNAi Center)
dpp-Gal4; GFP	dpp-Gal4, UAS-Dcr/TM6B; UAS-GFP	Contiene dos insertos: en el cromosoma 3, el promotor UAS con el gen del enzima dicer y el promotor de la proteína decapentaplégica (dpp) que en disco imaginal de ala se expresa en la zona central, entre las venas 3 y 4, con Gal4 y balanceados con TM6B; y el promotor UAS con el gen de GFP en el cromosoma 2.	Laboratorio
en-Gal4; GFP	en-Gal4 ;UAS-GFP/Cyo (II)	En el cromosoma 2, contiene dos insertos: I) el promotor del factor de transcripción engrailed (en) que en disco imaginal de ala se expresa en la parte posterior; II) el promotor UAS con el gen de GFP. Balanceado con Cyo	Laboratorio
3M	UAS-CG9548 ^{3M} /TM6B	Presenta en el cromosoma 3, el promotor UAS junto con una copia adicional del gen PHF5a. Balanceado con TM6B.	Laboratio
4M	UAS-CG9548 ^{4M} /TM6B	Presenta en el cromosoma 3, el promotor UAS junto con una copia adicional del gen PHF5a. Balanceado con TM6B	Laboratorio

3.2. Métodos

Mantenimiento de las moscas

Las moscas se dejan crecer en pequeños tubos de plástico con un volumen de comida suficiente como para 2 semanas, unos 18 ml. Cuando se establecen los primeros cruces con hembras vírgenes, los tubos se renuevan cada 2 días. En ese tiempo, han crecido los suficientes embriones de la F_1 resultado del cruce y los padres se colocan en un tubo nuevo para que generen más individuos de la progenie. El tiempo que aproximadamente se van renovando los tubos con los mismos padres es de unas 3 semanas, después, los padres ya no se utilizan y se vuelve a repetir el cruce con moscas nuevas. El sistema para dormir las moscas adultas y poder manipularlas son bombonas de CO_2 .

El medio de cultivo se prepara para un volumen final de 2 litros. Los pasos a seguir para hacerla son los siguientes:

- 1) Preparar la alícuota con los siguientes ingredientes (tabla 2):

Tabla 2. Lista de ingredientes y cantidades necesarios para el medio de cultivo de las moscas.

Ingrediente	Cantidad para 2 litros de comida (g)
Agar	20
Soja	20
Harina de Maíz	120
Azúcar	100

- 2) A continuación, se calientan 1,2 litros de agua tipo II (desionizada) durante 5 min.
- 3) Pesar 60 g de levadura seca.
- 4) Poner el autoclave a precalentar con agua tipo II.
- 5) Mezclar todos los ingredientes, junto con la levadura, con la batidora.
- 6) Meter la mezcla en el autoclave durante 20 min. Taparla previamente con papel de aluminio y poner la cinta de autoclave.
- 7) Unos minutos antes de finalizar, calentar 800 ml de agua tipo II durante 5 min.
- 8) Rellenar la mezcla autoclavada con el agua hasta los 2 litros.
- 9) Añadir el antibacteriano, Nipagin (metil 4-hidroxibenzoato), y el antifúngico, ácido propiónico:
 - Ácido propiónico: se añaden 10 ml.
 - Nipagin: para prepararlo se mezclan 60 g de Nipagin con 200 ml de etanol (96°). De esta disolución, se añaden 20 ml a la comida.
- 10) Dispensar la comida en los tubos. Se utiliza la máquina Masterflex L/S Easy-Load III de la compañía Cole-Parmer (Illinois, Estados Unidos).
- 11) Los tubos se dejan tapados con una sábana durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 12) Al día siguiente se colocan los tapones y se guardan a 4°C.

Métodos de biología molecular

Para comprobar el nivel de ARN de nuestra proteína en la descendencia, se utilizaron larvas para hacer una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y comprobar que, efectivamente hay silenciamiento del gen. Previamente se requiere de la extracción de ARN de las larvas. Dicha extracción se realizó con unas 7-8 larvas sin tratar, guardadas a -80°C en un eppendorf sin ningún disolvente. El protocolo consiste en lo siguiente:

- 1) Homogeneizar (triturar) en 800 μl de Tritol.
- 2) Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- 3) Añadir 160 μl de Cloroformo, agitar vigorosamente (15 s) e incubar a temperatura ambiente durante 3 min.
- 4) Centrifugar a 12000G durante 15 min a 4°C .
- 5) Transferir la fase acuosa a un tubo de vacío y precipitar con 400 μl de Isopropanol durante 10 min.
- 6) Centrifugar a 12000G durante 15 min a 4°C .
- 7) Eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet con 1 ml de Etanol 75% y centrifugar durante 5 min a 4°C .
- 8) Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet durante 15 min a temperatura ambiente.
- 9) Resuspender el pellet en 10 μl de agua. Se incuba durante 10 min a 55°C para ayudar a resuspender.
- 10) Tratamiento con DNasa (DNase I – Amplification Grade, Sigma-Aldrich; Sant Louis, EEUU) :
 - 10.1) 8 μl de muestra + 1 μl DNasa + 1 μl de tampón 10x. Incubar durante 30 min a 37°C .
 - 10.2) Añadir la disolución de Stop. Incubar durante 15 min a 70°C .

Con las muestras obtenidas de ARN se le realizó una retro transcripción (RT). Primeramente, las muestras se analizan por espectrofotometría, (aparato NanoDrop 2000c de Thermo Scientific; Massachusetts, EEUU), para comprobar la concentración de ARN y su pureza, para lo que se utiliza el ratio $A_{260/280}$. Para la RT se siguió con el protocolo de SuperScriptTM III Reverse transcriptase (Life Technologies). Para ello se preparó un primer mix de reacción (tabla 3):

Tabla 3. Reactivos necesarios y cantidades del primer mix utilizado en la retrotranscripción.

Componente	Volumen (μl)
Oligo(dT)	1
dNTPs	1
DNA	2,6
H ₂ O destilada	8,4

Este primer mix se calienta a 65°C durante 5 min y se deja enfriar en hielo durante 1 min. A esta mezcla, se le añade el segundo mix (tabla 4).

Tabla 4. Reactivos necesarios y cantidades del segundo mix utilizado en la retrotranscripción.

Componente	Volumen (μ l)
Tampón	4
0,1 M DTT	1
Inhibidor RNasa	1
SuperScript III (enzima)	1

La reacción tiene lugar a 50°C durante 30 min y, por último, se calienta a 70°C durante 15 min para inactivar la reacción.

Más tarde, se prosiguió con una PCR para comprobar definitivamente el silenciamiento de PHF5a. El termociclador usado es el Mastercycler de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Se usó como control el gen GADPH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). En las tablas que aparecen a continuación, se detallan los primers empleados (tabla 5), los reactivos (tabla 6) y el programa de la PCR (tabla 7).

Tabla 5. Secuencias de los distintos primers empleados.

Gen	Primer directo	Primer inverso
PHF5a	AGAAGTCGCCGCTTTTTCAG	AGGAGTCGCAGATCACACAC
GADPH	GATGGTGCGAGTATGTGGTA	CG TTGATTATCTTGGCGAGTG

Tabla 6. Reactivos y cantidades empleados en la PCR.

Reactivo	Volumen (μ l)
Tampón	10
dNTPs	1
ADN	3
MgCl ₂	5
Primers (x2)	2,5 (x2)
GotaQ (polimerasa)	0,5
ddH ₂ O	25,5

Vol. Final: 50 μ l

Tabla 7. Programa de la PCR.

Temperatura ($^{\circ}$C)	95	95	56	72	72
Tiempo	5 min	30 seg	20 seg	30 seg	7 min

Finalmente, el cADN amplificado se visualizó en un gel con 2% de agarosa, voltaje de 120 durante 1 hora y 15 min.

Métodos Histológicos

Para la visualización de los discos de ala en un porta, es necesario el diseccionamiento de la parte superior de la larva y la extracción de dichos discos. Previamente a la disección, se fijan las larvas de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) Darle la vuelta a las larvas. Cada larva se parte en dos y con la parte superior, se empuja la mandíbula hacia dentro hasta que sale por el otro extremo junto con el cerebro, discos imaginales de patas, alas, halterios, etc.
- 2) Fijar en paraformaldehído (PFA) durante 10 min.
- 3) Lavar con PBT (PBS + 0,1% Triton-X 100 + 0,2% BSA).
- 4) Lavar con etanol 100%.
- 5) Volver a echar etanol 100% y guardar a -20°C.

Métodos Inmunológicos

Se realizó dos tipos de inmunofluorescencia llevadas a la par. Una muestra, en la cual se utilizó como anticuerpo primario la Cleaved Caspase-3, Asp 175 (Cell Singaling Technology, Massachusetts, EEUU) y otra donde el anticuerpo primario fue la Anti-FosfohistonaH3, Ser10 (MILLIPORE, Darmstadt, Alemania). Para ambas muestras, se utilizó el mismo anticuerpo secundario, Conejo TRTC (Jackson Laboratories, Maine, EEUU), y se incubaron con DAPI. El protocolo es el siguiente:

- 1) Fijar larvas según protocolo, en *métodos histológicos*.
 - 2) Cambiar el Etanol por PBT.
 - 3) Lavar 2 veces rápidas con PBT.
 - 4) Añadir anticuerpo primario:
 - Anti-Caspase-3: 0,5 µl de anticuerpo + 499,5 µl de PBT. Volumen final de 500 µl. Concentración del anticuerpo, 1:1000.
 - Anti-FosfohistonaH3: 1 µl de anticuerpo + 499 µl de PBT. Volumen final de 500 µl. Concentración del anticuerpo, 1:500.Guardar las muestras en un tubo opaco a 4°C en la noria durante toda la noche.
 - 5) Quitar la solución y guardarla para reutilizarla en otros ensayos.
 - 6) Lavar 2 veces con PBT durante 5 min, en oscuridad y en la noria.
 - 7) Añadir el anticuerpo secundario:
 - Conejo TRTC: 2 µl de anticuerpo + 398 µl de PBT. Volumen final de 400 µl. Concentración del anticuerpo, 1:200.
 - 8) Dejar en la noria durante 2 horas a temperatura ambiente.
 - 9) Poner 0,5 µl de DAPI en los 400 µl de disolución. Incubar en la noria durante 20 min.
 - 10) Lavar 2 veces con PBT durante 15 min, en oscuridad y en la noria. Las larvas se pueden guardar en PBT en la oscuridad a 4°C.
 - 11) Diseccionar los disco imaginales de ala y montarlos en un porta.
-

Microscopia

Los discos de ala montados en los porta se visualizan en el microscopio vertical Leica DM6000 (Wetzlar, Alemania). En el caso de que se haya realizado la inmunofluorescencia, se visualizan en el microscopio Confocal Leica TCS SP2 (Wetzlar, Alemania). Las imágenes obtenidas son analizadas con los programas ImageJ y GIMP2.

Estadística y representaciones de gráficos

Los diversos gráficos y figuras utilizados para representar un conjunto de datos, fueron realizados a partir del programa Excel de Microsoft Office 2007 o bien por el programa GraphPad Prism 5 de GraphPad Software, Inc.

En el programa Excel, se desarrolló la prueba t de Student para observar la significancia (p-value) entre las muestras del control y las muestras experimentales, en el análisis de las imágenes obtenidas en la inmunofluorescencia. Las barras de error SEM ("Standard Error of the mean") fueron elaboradas en el programa GraphPad Prism 5.

4. Resultados

PHF5a implicado en el desarrollo de *Drosophila*

En el presente estudio, se llevaron a cabo varios experimentos de silenciamiento del gen *PHF5a* en *D. melanogaster*, llamado *CG9548* en este organismo. El primero de ellos consiste en un silenciamiento de esta proteína en todas las células de la mosca, gracias al promotor del gen de la actina (*Act5C*) y el sistema de expresión GAL4-UAS. Para lograrlo, se cruzó la cepa con la construcción *Act-Gal4* con la cepa *OrR* (la cepa salvaje no transgénica); con la cepa *KK*, que contiene la secuencia activadora UAS y una copia del ARNi del gen *PHF5a*; y, por último, con la cepa *GD* que contiene el UAS y una copia del ARNi. Los resultados del cruce se muestran a continuación (Figura 4).

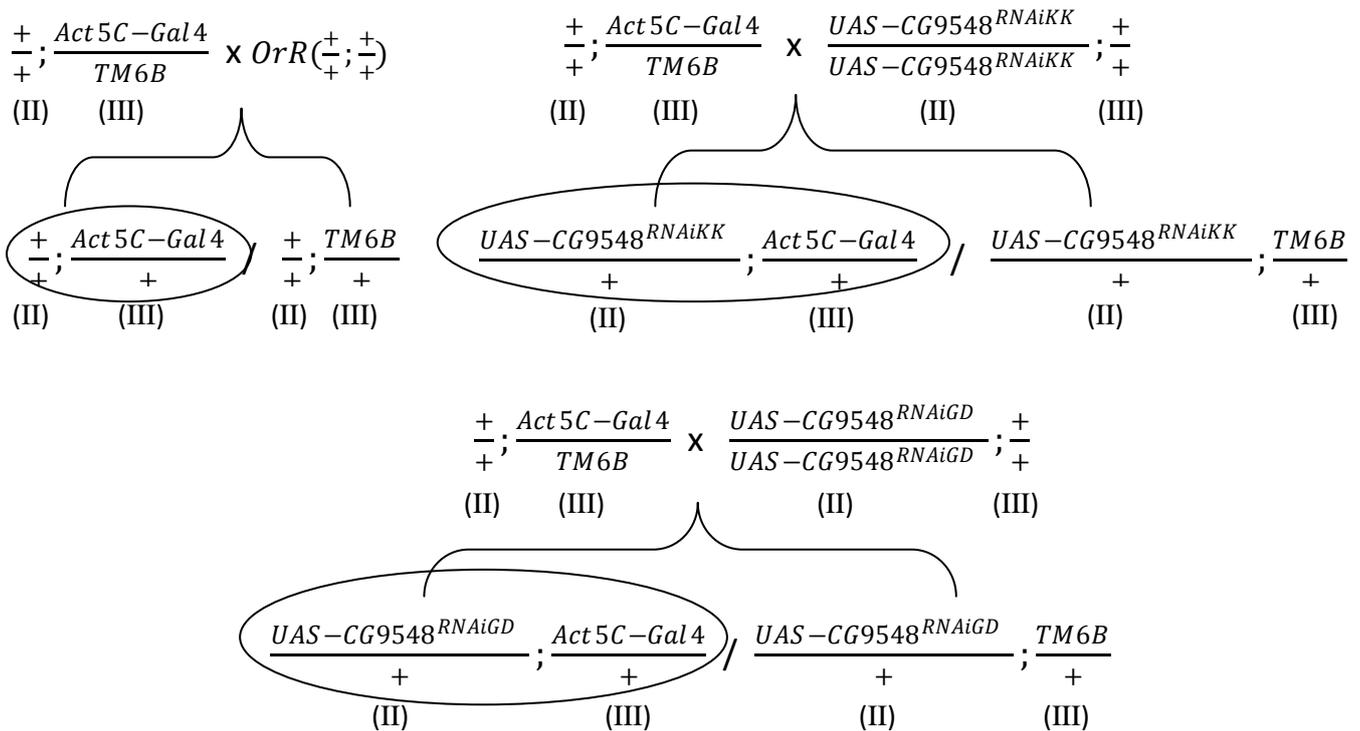


Figura 4. Esquema de los cruces realizados para el silenciamiento del gen *PHF5a* con el promotor del gen de actina. En cada cruce se realizaron varias réplicas, de 3 a 5 tubos donde se dispusieron alrededor de 3 hembras y 3 machos por tubo. Los números romanos entre paréntesis indican el número del cromosoma.

Los individuos de la F_1 que presentan el fenotipo que se desea, son aquellos que contienen el sistema de expresión GAL4-UAS completo y expresan el ARNi (señalados con un círculo). Estos individuos no presentan el balanceador *TM6B*, de modo que se seleccionaron aquellas larvas que no presentaron el marcador *Tubby*. Los individuos con genotipo *Act5C-Gal4/+* son utilizados como control del cruce.

En individuos con silenciamiento, se encontró que el gen era letal en el estadio III de larva y pupa. Aquellas moscas que presentaban el silenciamiento con *KK* (silenciamiento débil), unas 11 de las 120 examinadas (9,2%), alcanzaron el estado de pupa pero no conseguían acabar la metamorfosis y llegar a la edad adulta. En el caso de las moscas con silenciamiento *GD* (silenciamiento más fuerte), no llegaban al estado de pupa. Las 110 examinadas morían todas en estado de larva, además, algunas de ellas presentaban puntos de necrosis en diversas partes del cuerpo (Figura 5).



Figura 5. Larvas necróticas con silenciamiento GD (fuerte) del gen *PHF5a*. Genotipo de estas larvas: *Act5C-Gal4/UAS-CG9548^{RNAiGD}*.

Para comprobar que estos fenotipos eran debidos a un silenciamiento del gen *PHF5a*, se comprobó el nivel de ARN mensajero mediante una PCR utilizando como control el *gadh1* y medir la expresión relativa de *PHF5a*. El resultado obtenido fue satisfactorio, observándose en la intensidad de las bandas, una reducción gradual en la expresión de *PHF5a* (Figuras 6 y 7), siendo el control donde más se expresa y el ARNi con GD, donde menos. Este silenciamiento, por tanto, se relaciona con la muerte prematura en larvas y pupas de mosca, siendo esencial para el desarrollo del organismo. El estado alcanzado de larva y pupa sugiere que esta proteína es necesaria para llevar a cabo el reclutamiento de factores necesarios para producir los cambios clave de la metamorfosis de este organismo.

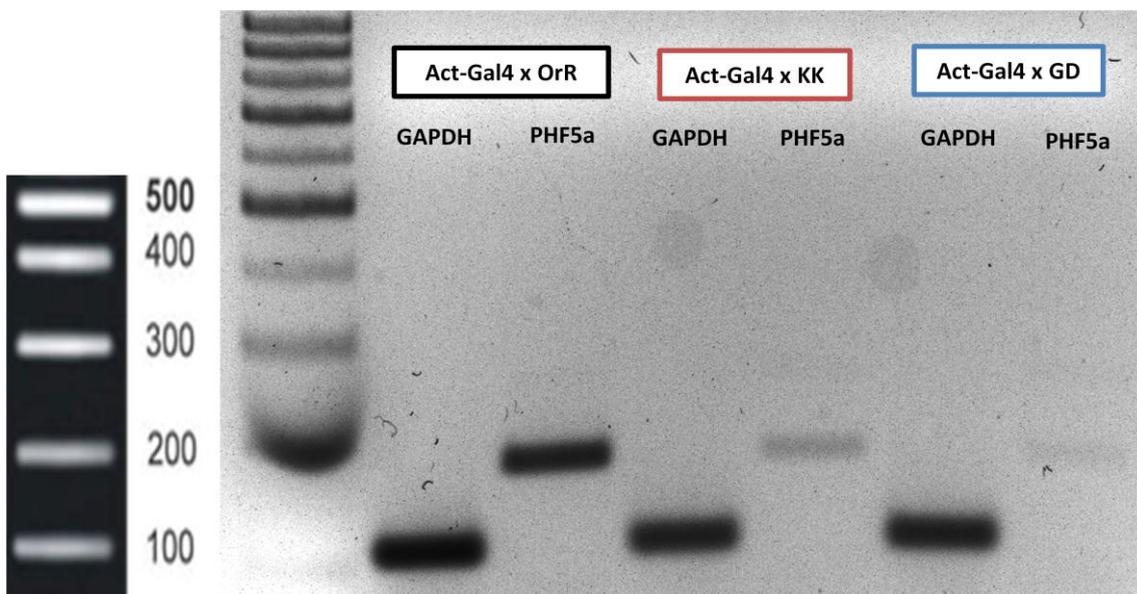


Figura 6. Gel empleado para correr los productos de la PCR. En todas las muestras son dos los genes amplificados, el de referencia *gadh1* y el *PHF5a*. Las dos primeras columnas corresponden a los individuos del control, mientras que las siguientes representan los individuos que presentan silenciamiento, KK y GD.

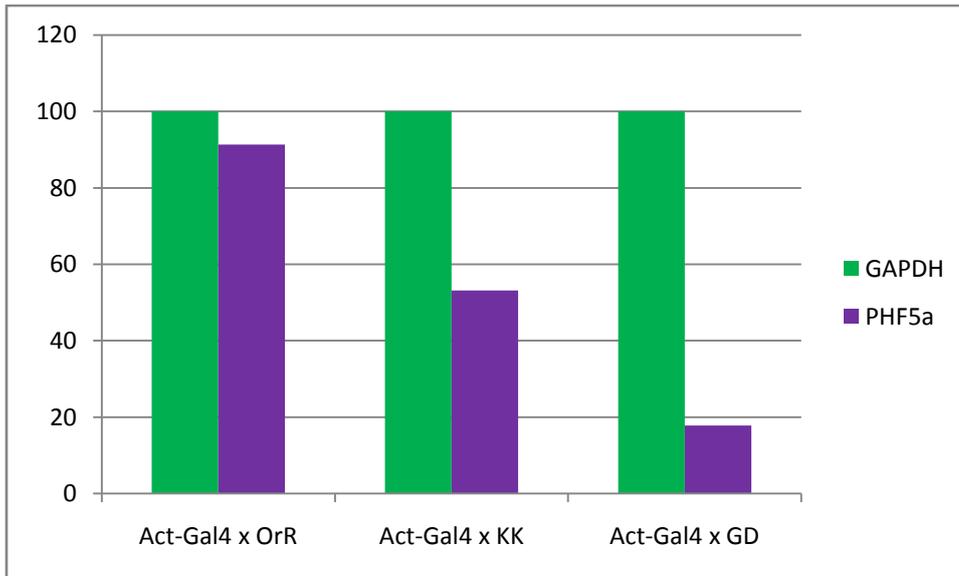


Figura 7. Expresión relativa del gen *PHF5a* respecto del gen referencia *gadh1*. Valores obtenidos mediante el análisis de la imagen, densitometría, del gel de la figura 12 utilizando el programa ImageJ.

Una característica sorprendente de estas larvas es que no contienen discos imaginales. Las moscas silenciadas tanto con KK como GD se diseccionaron y se observó que carecían completamente de los discos imaginales de ala, de pata y los halterios. De este modo, se concluye que este gen es un componente clave en la supervivencia de *Drosophila* y, concretamente, en el desarrollo de los discos imaginales en larva. La proteína PHF5a es un factor crítico para que se lleven a cabo los procesos celulares necesarios para la formación del disco imaginal.

La sobreexpresión de PHF5a no produce ningún efecto visible

En este experimento, se quiso ver si la sobreexpresión del gen *PHF5a* conducía a algún tipo de alteración en mosca. De la misma manera se utilizó la cepa Act-Gal4 pero en este caso, se cruzó con otras dos cepas diferentes que contienen una copia adicional del gen, cepas 3M y 4M, además de con la cepa salvaje *OrR* como control. El resultado de los cruces se muestra a continuación (Figura 8).

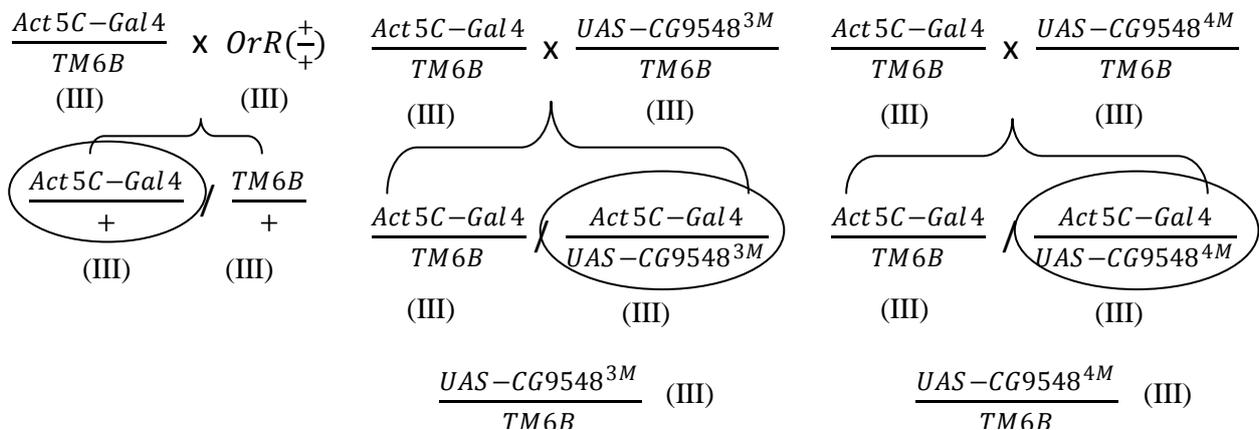


Figura 8. Esquema de los cruces realizados para la sobreexpresión del gen *PHF5a* con el promotor del gen de actina. En cada cruce se realizaron varias réplicas, de 3 a 5 tubos donde se dispusieron alrededor de 3 hembras y 3 machos por tubo. Los números romanos entre paréntesis indican el número del cromosoma donde se encuentra el inserto.

Aquellos individuos de la descendencia que sobreexpresan la proteína (señalados con un círculo) son los que presentan el sistema de expresión UAS-GAL4 completo. Estos individuos no presentan el balanceador TM6B, de modo, que se seleccionaron aquellas larvas que no presentaron el marcador *Tubby* y, en edad adulta, los que no presentan el marcador *Humeral*.

Tanto en estado de larva, pupa o adulto, estos individuos que sobreexpresan el *PHF5a* no presentan ninguna estructura u órgano alterado. En larva, fueron observados los principales órganos: cerebro, discos imaginales, cuerpo graso o glándula salival; y en ninguno se detectaron anomalías visibles a simple vista. De igual manera, en la mosca adulta, ninguno de los órganos y estructuras presentaban algún rasgo diferente al normal. De este modo, para tener una primera aproximación acerca de algún cambio que no sea apreciable a simple vista, se realizó una curva de supervivencia para observar si la sobreexpresión afecta a la viabilidad a largo plazo. Se eligieron 90 machos adultos de cada una de las cepas de la descendencia señaladas anteriormente: control, sobreexpresión con 3M y sobreexpresión con 4M, y se dispusieron en 3 tubos diferentes, 30 individuos por tubo.

En este momento, el experimento no ha sido completado hasta el final, pero de todas formas, los porcentajes de supervivencia fueron evaluados hasta los 60 primeros días. La comparación entre las curvas de supervivencia (Figura 9) muestra, a priori, unos datos algo contradictorios. La curva de supervivencia del control se encuentra en medio de las curvas correspondientes a las moscas con sobreexpresión, siendo la curva 3M en la que se mantiene más la supervivencia, mientras que la curva 4M tiene un descenso más acentuado.

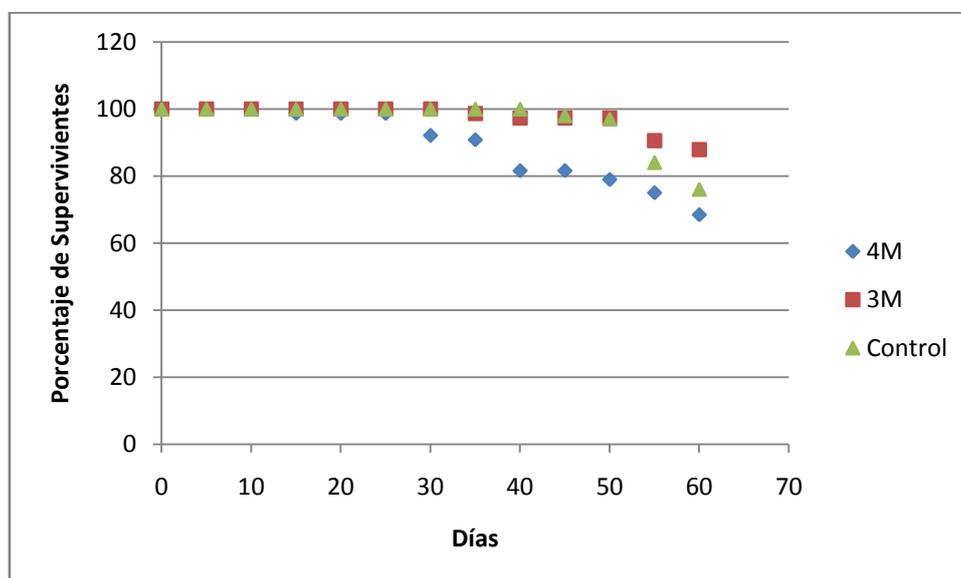


Figura 9. Curvas de supervivencia entre individuos con sobreexpresión. Evolución de los porcentajes de los supervivientes a lo largo de los primeros 60 días. El número total de individuos contabilizados de cada cepa son 90.

PHF5a relevante en el desarrollo del disco imaginal de ala

Visto el resultado observado en el silenciamiento de la proteína PHF5a en los discos imaginales de ala, se quiso comprobar si PHF5a afecta al crecimiento y desarrollo del ala. Para ello se escogió un sistema de silenciamiento menos restrictivo que el de

actina, que permitiera observar algún tipo de cambio fenotípico en el disco de ala sin que llegara a desaparecer. Se utilizó el gen *engrailed* (*en*), clave en el desarrollo de los segmentos de embrión y larva de mosca (DiNardo *et al.*, 1985). Dicha proteína se acumula en la parte posterior, tanto de los segmentos del embrión como de los discos imaginales de larva (Kornberg *et al.*, 1985).

El promotor de *en* es utilizado para llevar a cabo el silenciamiento de *PHF5a*, únicamente en la parte posterior del disco. Su efecto se observará, a priori, en la parte posterior de los discos imaginales de ala. En este experimento, se utilizó la cepa *en-Gal4,UAS-GFP/Cyo* que contiene el promotor *en* junto con GAL4, además de contener el inserto UAS-GFP para observar con fluorescencia aquellas células que expresen *en*. Esta cepa se cruzó con las cepas que presentan el ARNi, KK y GD, para conseguir el silenciamiento y con *OrR* como control. Los individuos que resultan del cruce se muestran a continuación (Figura 10).

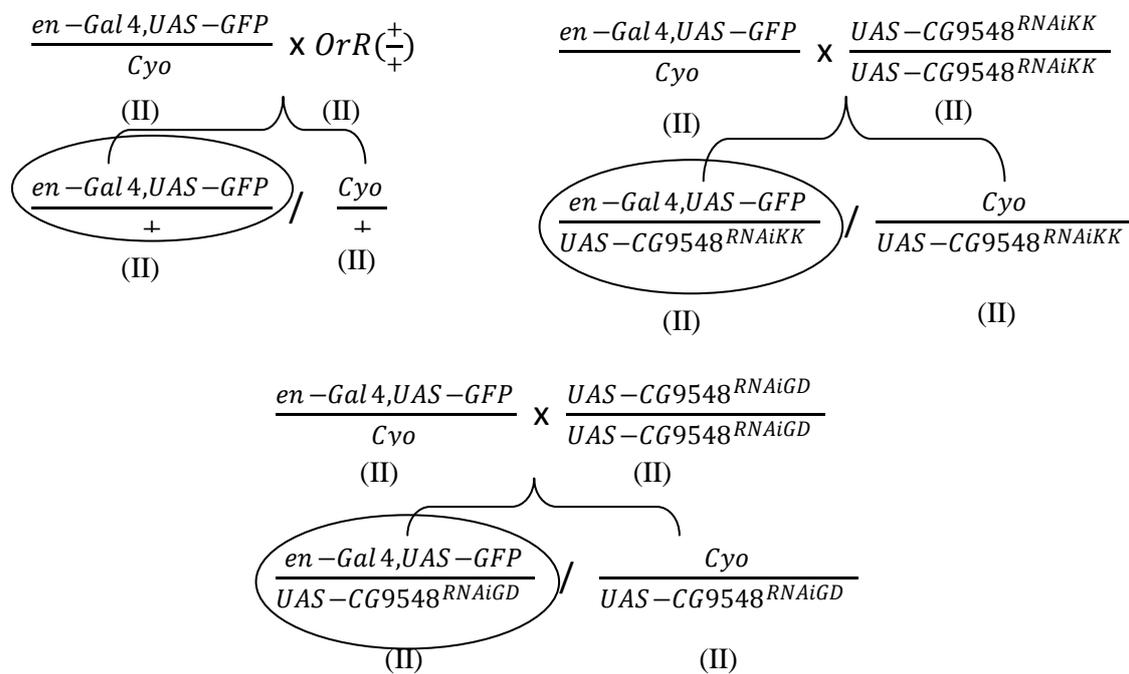


Figura 10. Esquema de los cruces realizados para el silenciamiento del gen *PHF5a* con el promotor de *engrailed*. En cada cruce se realizaron varias réplicas, de 3 a 5 tubos donde se dispusieron alrededor de 3 hembras y 3 machos por tubo. Los números romanos entre paréntesis indican el número del cromosoma donde se encuentra el inserto.

Aquellas larvas de la F₁ que presentan el genotipo que se desea (señalados con un círculo) son todas verdes, es decir, presentan GFP como se indican en los genotipos. En estas larvas se quiso observar, si existía algún tipo de reducción del número de células en los discos de ala. Las imágenes obtenidas (Figura 11) muestran un notable cambio en el área de células GFP positivas, es decir, aquellas células de la parte posterior y que expresan *en*.

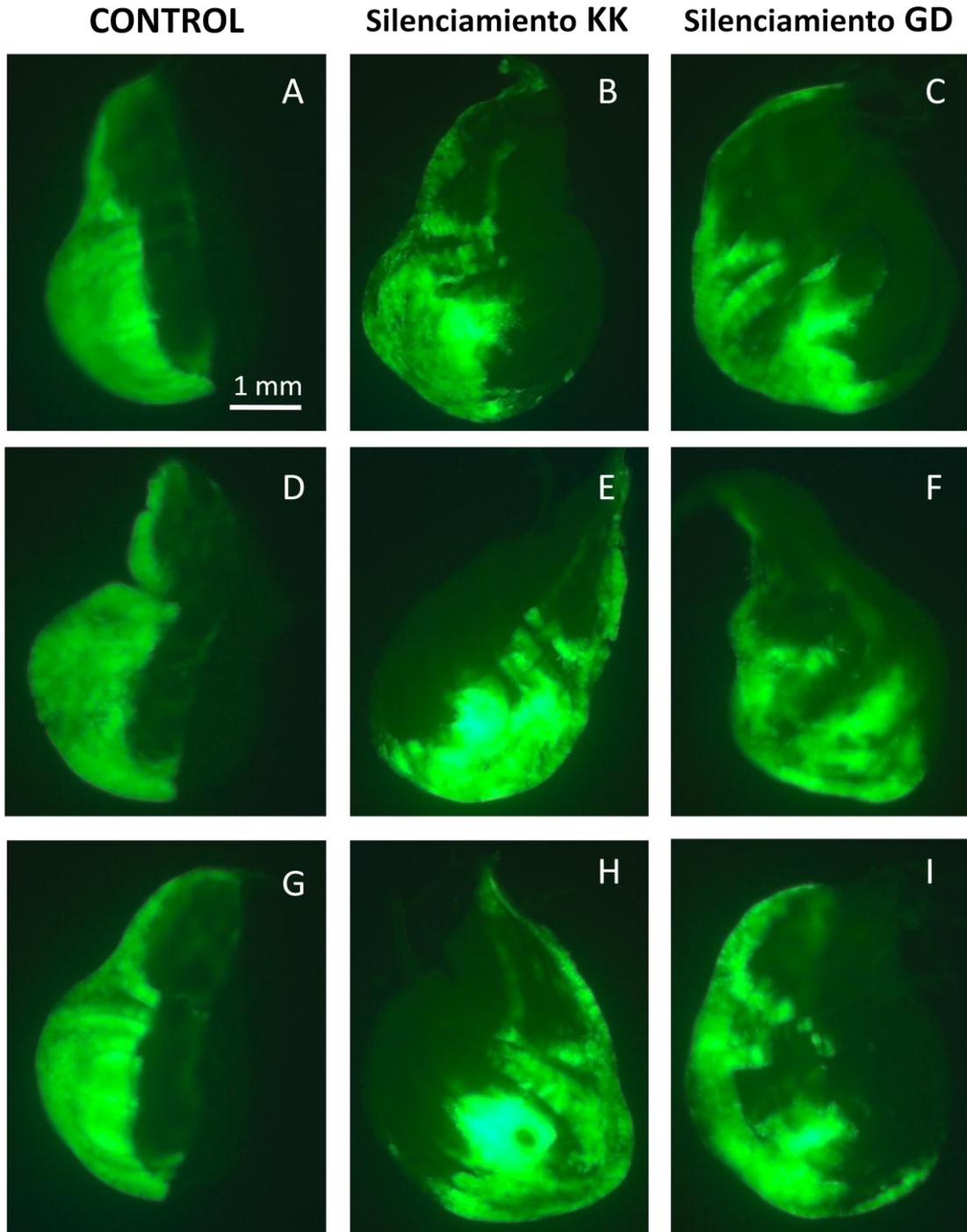


Figura 11. Comparación de la histología de discos imaginales de ala *en* GFP positivos. Discos correspondientes al control, cepa *en-Gal4, UAS-GFP/+* (A, D y G), discos de muestras experimentales que presentan silenciamiento con KK (B, E y H) y con GD (C, F e I). La barra representa una longitud de 1 mm.

Como se puede observar en la figura 11, el área de células GFP positivas que expresan *en* está delimitada perfectamente en la parte posterior del disco de ala como indican los controles (Figuras 11A, D y G). Sin embargo, en aquellos discos correspondientes al cruzamiento con el ARNi, KK y GD, se observa que éste área es más irregular y sus límites no están bien delimitados. Se puede apreciar una ligera diferencia entre los discos KK y GD, siendo los de GD (Figuras 11C, F e I) los que parecen tener menos área verde. La reducción de la zona verde sugiere que hay

menos células *en* como consecuencia del ARNi, de modo, que la falta de la proteína PHF5a afecta de alguna manera, al número de células normal que deberían de haber en la zona posterior en el disco de ala. Esto demuestra la relevancia de PHF5a en la formación y desarrollo del ala. Sin embargo, cabe destacar que los discos con el ARNi preservan a priori su forma, sin apreciarse ningún defecto en la estructura general del disco.

También se comprobó que estas moscas con silenciamiento en la parte posterior, no llegaban a edad adulta, sólo llegaban a estado de pupa (Figura 12). Dicha muerte sucede en la etapa de pupa, de modo, que esta deficiencia se vuelve crítica en la metamorfosis de mosca.

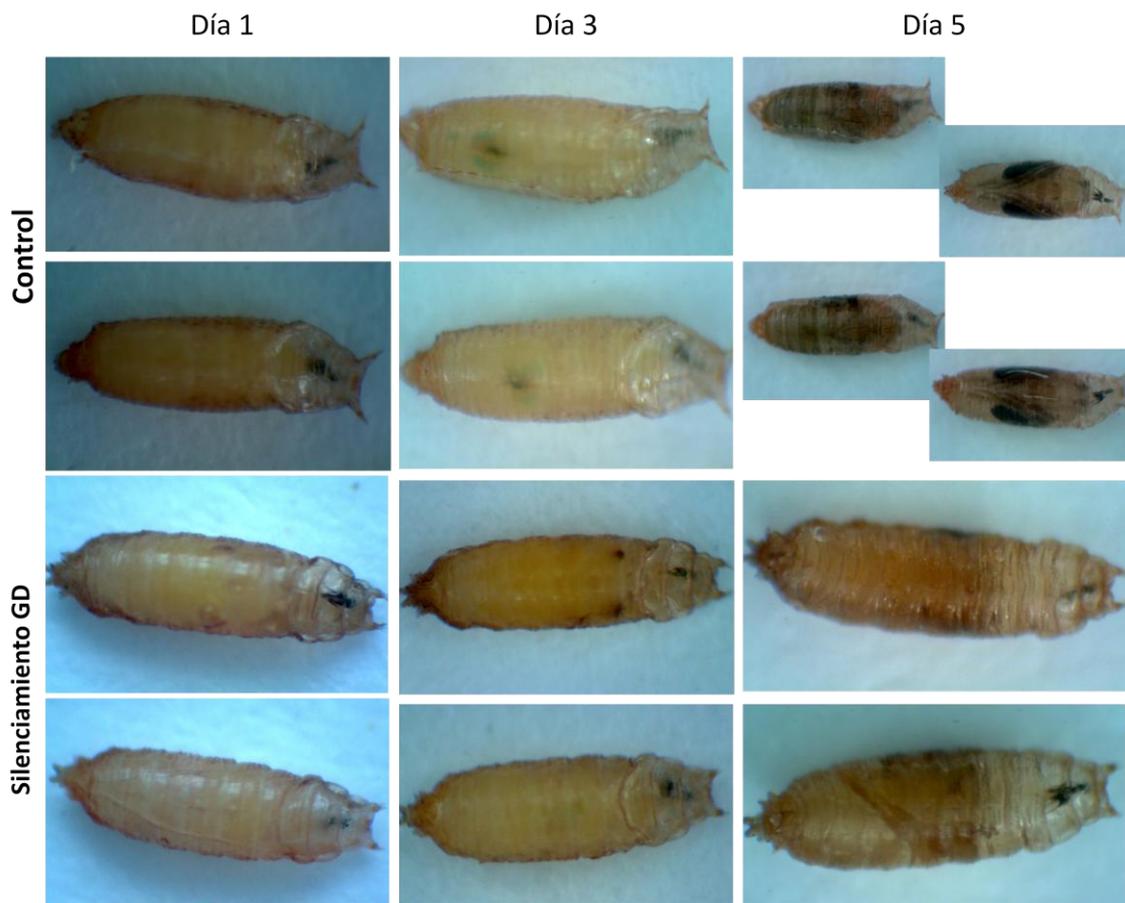


Figura 12. Evolución durante la etapa de pupa en moscas control, cepa *en-Gal4, UAS-GFP/+*, y muestras experimentales con silenciamiento GD dirigido por el promotor *en*. Evolución de los días 1 de pupa hasta el último, día 5.

Como se observa en la figura 12, los individuos con silenciamiento GD consiguen pupar aunque no completan la metamorfosis y no alcanzan la etapa adulta. Aunque no aparezca, lo mismo ocurre con aquellos que también tienen silenciamiento con KK. Esto constituye una nueva comprobación de que PHF5a es esencial para la supervivencia de *Drosophila* y que es especialmente importante en el desarrollo de la estructura de los discos imaginales.

PHF5a y su papel en la apoptosis y mitosis celular

En vista de la implicación de PHF5a para el correcto desarrollo del disco imaginal de ala, queda por saber cuál es el mecanismo implicado en el defecto causado al hacer el ARNi. Una reducción del número de células *en* observadas en el anterior experimento puede explicarse de dos maneras. Es posible que la deficiencia de PHF5a provoque determinadas alteraciones en la célula que conduzcan a la activación de rutas apoptóticas y resulte en muerte celular. Otra posible razón, es que la pérdida de este factor imposibilite la proliferación celular y, por tanto, las células sean incapaces de crecer durante el desarrollo del disco de ala. Esto fue observado en el trabajo de cribado de Hubert *et al.* (2013), en donde la proteína PHF5a era requerida para la viabilidad y la proliferación de células madre tumorales de glioblastoma. Cualquiera de estos dos mecanismos puede dar lugar a la desaparición del área del disco de ala observado anteriormente.

En este ensayo se utilizó un promotor que produjera el silenciamiento de *PHF5a* de forma menos agresiva que el de actina. Se utilizó el gen *decapentaplégic (dpp)*. Esta proteína se expresa en una franja delgada de células de la parte anterior del ala, justo en la frontera con la parte posterior (Basler y Struhl, 1994). En esta delgada línea de células *dpp*, será relativamente sencillo evaluar que ocurre en esa zona a consecuencia del silenciamiento. El promotor del *dpp* se utiliza para dirigir el ARNi utilizando nuevamente el sistema de expresión génica GAL4-UAS. Se utilizaron las siguientes cepas: *dpp-Gal4; GFP*, que contiene el promotor *dpp* junto con Gal4, además de contener el inserto UAS-GFP para observar con fluorescencia las células que expresen la molécula *dpp*; la cepa GD que contiene el ARNi; y la cepa *OrR* como control. El resultado del cruce se indica a continuación (Figura 13).

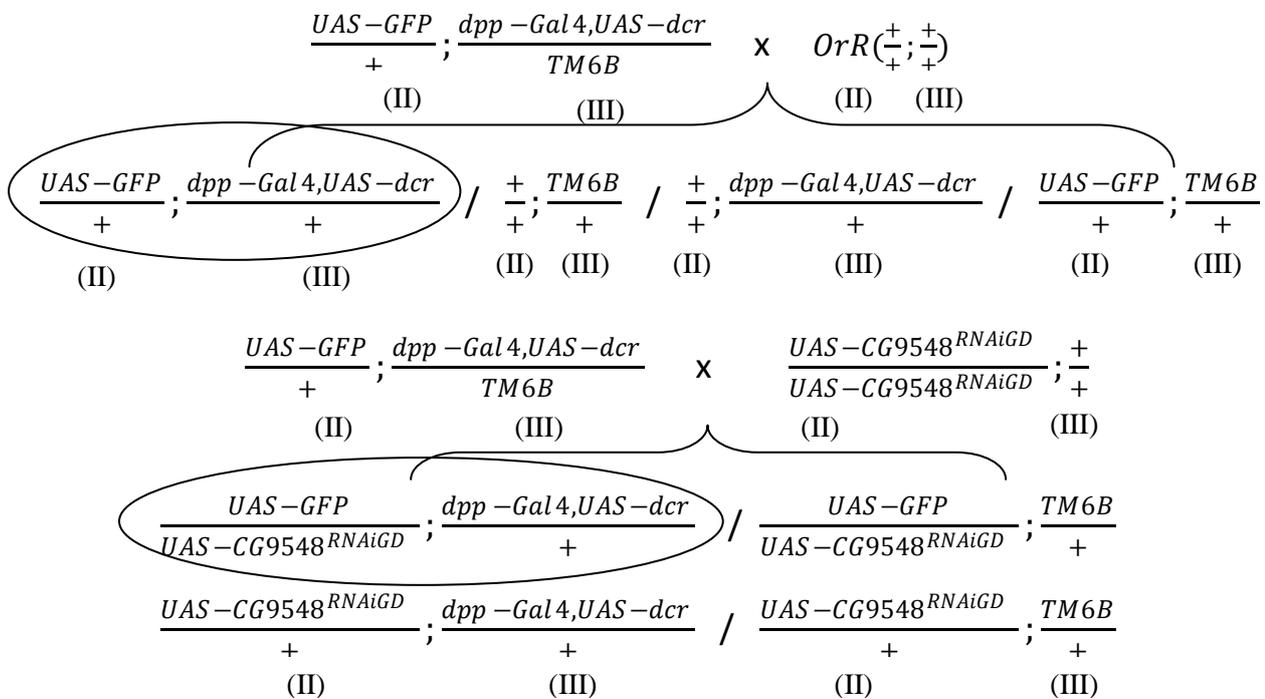


Figura 13. Esquema de los cruces realizados para el silenciamiento del gen *PHF5a* con el promotor de *dpp*. En cada cruce se realizaron varias réplicas, de 3 a 5 tubos donde se dispusieron alrededor de 3 hembras y 3 machos por tubo. Los números romanos entre paréntesis indican el número del cromosoma donde se encuentra el inserto.

Los individuos que contienen el fenotipo que nos interesa (redondeados) son los únicos GFP positivos, por lo que, para distinguirlos, simplemente se seleccionan aquellas larvas que sean verdes. Los discos imaginales de ala se diseccionaron y se les realizó una inmunofluorescencia.

Para determinar cuál es el mecanismo, si apoptosis o reducción de la mitosis celular, se realizaron dos tipos de inmunofluorescencia: la primera de ellas utilizando como anticuerpo primario el anti-Caspasa 3; y otra, usando el anti-Fosfohistona H3 (ver materiales y métodos). El anti-Caspasa 3 detecta específicamente el fragmento largo de la Caspasa 3 activada y se utiliza como un marcador de apoptosis en las células. El anti-Fosfohistona H3 reconoce la histona H3 fosforilada en la serina 10 y se utiliza como marcador de mitosis. Según la diferencia que haya entre el número de puntos de Caspasa 3 e Fosfohistona H3 en la zona del *dpp* con respecto a la superficie total del disco (Figura 14), indicarán qué proceso es el principal responsable de la reducción del número de células.

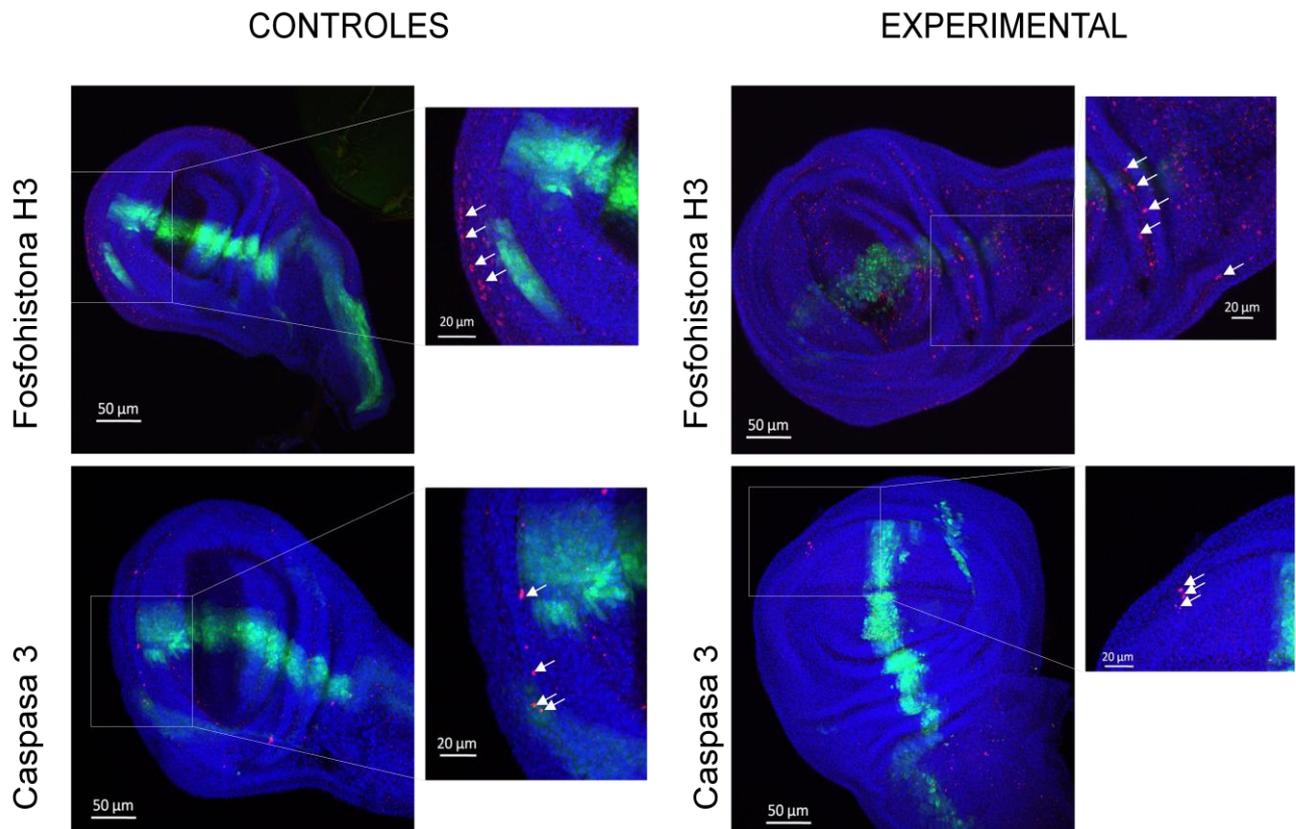


Figura 14. Inmunofluorescencia de los discos imaginales de ala *dpp* GFP positivos. Imágenes obtenidas del microscopio confocal mediante 15-20 proyecciones y seleccionando los píxeles de intensidad máxima. En las imágenes magnificadas, las flechas indican los puntos correspondientes a los anticuerpos a la Fosfohistona H3 y Caspasa 3. Las barras de escala representan 50 µm, siendo en el caso de las imágenes magnificadas, 20 µm.

En estas imágenes se pueden observar cuáles son los distintos puntos que se tendrán en cuenta para enumerarlos y obtener los porcentajes de Fosfohistona H3 y Caspasa 3, pero además, se observa también una ligera reducción en la zona del *dpp* (GFP positiva). Las distintas imágenes fueron de paso, analizadas para medir dicha área y comprobar esa diferencia (Figura 15).

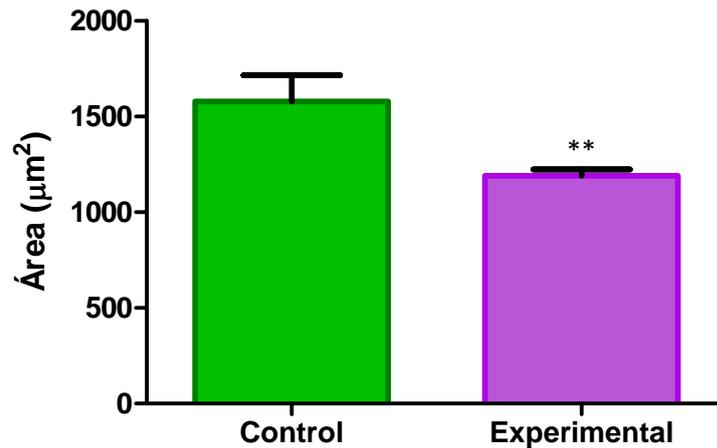


Figura 15. Comparación entre las áreas del *dpp* en discos control y con discos experimentales, con silenciamiento. Tratamiento de imágenes con el programa ImageJ para el cálculo de áreas en μm^2 . El T-test fue utilizado para observar la significancia entre los controles y el experimental. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Barra de error = SEM.

De acuerdo a los valores obtenidos, la zona del *dpp* de los discos de ala con silenciamiento, es significativamente menor ($p < 0,01$) que aquella que corresponde a los discos control, media de $1191,47 \mu\text{m}^2$ comparado con los $1578,64 \mu\text{m}^2$ del control. Esta reducción de superficie de tejido vista, corrobora lo observado en anteriores experimentos al silenciar el gen *PHF5a*. Su silenciamiento, por tanto, produce un efecto adverso en el desarrollo de disco imaginal de ala.

En cuanto al análisis de los puntos de Fosfohistona H3 de los discos de ala, se observa que el porcentaje de puntos que se encuentra en la zona del *dpp* con respecto al total entre el control y el experimental (Figura 16), no hay diferencia significativa entre ambos ($p > 0,05$). Por lo que estadísticamente no parece observarse cambios en las mitosis celulares debido al silenciamiento del gen *PHF5a*. Sin embargo, sí que se puede observar un ligero descenso en la media del porcentaje mitosis en las muestras experimentales, 14,30% control y 12,88% las muestras con silenciamiento.

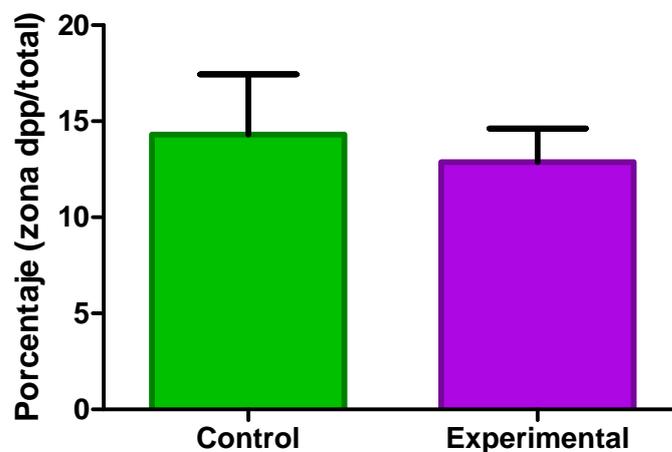


Figura 16. Porcentajes del número de puntos de Fosfohistona H3 contados en la zona *dpp*, respecto del total en los discos imaginales de ala. Comparación entre el control, cepa *dpp-Gal4, UAS-GFP/+*, y con silenciamiento GD. Barras de error = SEM.

En el caso de la Caspasa 3 (Figura 17), los porcentajes tampoco muestran tener una diferencia significativa ($p > 0,05$). De la misma manera, se aprecia ligeramente un aumento en el porcentaje del número de apoptosis, 26,67% control y 28,18% el experimental.

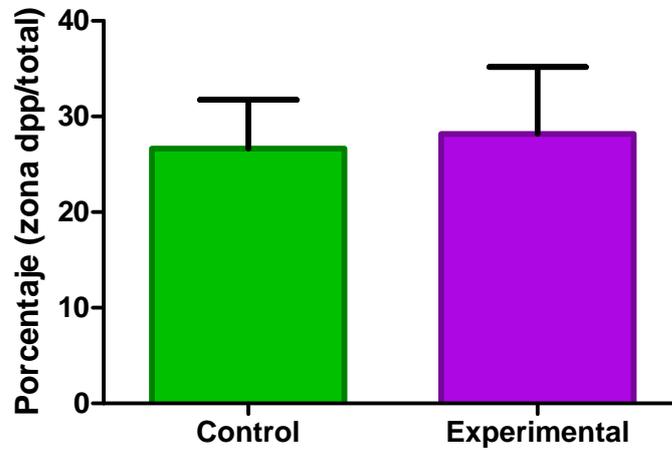


Figura 17. Porcentajes del número de puntos de Caspasa 3 contados en la zona *dpp*, respecto del total en los discos imaginales de ala. Comparación entre el control, cepa *dpp-Gal4, UAS-GFP/+*, y muestra experimental con silenciamiento GD. Barras de error = SEM.

En este experimento, por tanto, no se han obtenido los resultados que se esperaban. Sí que es cierto que se aprecia tanto una ligera reducción del número de mitosis, como un aumento en el número de apoptosis, lo que explicaría esa reducción de células en los discos de ala al silenciar la proteína PHF5a.

5. Discusión

En este Trabajo de Final de Grado, se han evaluado diversos aspectos relacionados con la alteración de la expresión de la proteína PHF5a en *D. melanogaster*, para intentar elucidar más información acerca de la función de esta molécula.

El primer cupo de experimentación se centró en el silenciamiento de la proteína de forma ubicua o de manera más restringida, utilizando distintos promotores específicos. El primero de ellos consiste en un silenciamiento en todo el organismo. En estos individuos con silenciamiento del gen *PHF5a* tanto débil (cepa KK) como fuerte (cepa GD), se comprobó que no llegaban a edad adulta. Concretamente, el 9,2% (11 de 120) de los individuos con silenciamiento con KK, llagaban sólo hasta el estado de pupa, mientras que el resto moría en estado de larva. En el caso de individuos con silenciamiento con GD, todos ellos morían en el estadio III de larva.

De acuerdo a la función biológica de PHF5a como factor en el complejo espliceosomal (Herold *et al.*, 2009), mutaciones con pérdida de función y silenciamiento de genes que se encuentran en el espliceosoma, se han relacionado con numerosas patologías (Visconte *et al.*, 2011; Tsuiji *et al.*, 2013; Makishima *et al.*, 2015). De hecho, Chandra *et al.* (2013) establecen que el factor espliceosomal CTNNBL1 es letal en embriones de ratón cuando éste se encuentra en deficiencia. De este modo, el fenotipo visto con el silenciamiento de PHF5a, se asemeja con las distintas deficiencias vistas con la alteración de otros factores del complejo espliceosomal. Los estudios sobre el silenciamiento en concreto de PHF5a son muy escasos, sólo se encuentran en cribados de RNAi del genoma completo como el de Neumeier (2008) o el de Dietzl *et al.* (2007). En ellos se acredita que esta proteína es esencial para la supervivencia de *Drosophila*, aunque esta información no se extiende más allá.

Para comprobar si la sobreexpresión de PHF5a resultaba en alguna característica fenotípica, se utilizaron dos cepas de mosca con una copia adicional del gen, 3M y 4M. En ambos casos, no se encontraron diferencias visibles en los distintos órganos y estructuras tisulares. Para tener una primera aproximación acerca de algún cambio que no sea apreciable a simple vista, se realizó una curva de supervivencia para verificar si existe algún efecto sobre la viabilidad a largo plazo. A expensas de que finalice completamente el ciclo de vida, en los 60 días contabilizados hasta ahora, los resultados son algo contradictorios entre las curvas del control y las líneas de sobreexpresión. La curva control se localiza entre las curvas con sobreexpresión, 3M queda por encima, con mayor porcentaje de supervivientes, y 4M por debajo, con menor porcentaje. Las cepas 3M y 4M contienen una copia extra de PHF5a en distintos lugares del genoma que están todavía por determinar, de forma que es posible que la sobreexpresión no esté bien lograda y, por ello, den tendencias de supervivencia distintas. Ahora mismo se está a la espera de llevar a cabo la PCR y observar los niveles de expresión de PHF5a en las moscas de este experimento.

Si se piensa en el papel que desempeña PHF5a como componente en el complejo espliceosomal, el efecto esperado cuando se encuentra en exceso sería nulo. Al formar parte de un complejo, la cantidad de proteína que es funcional es la que forma parte del complejo, el resto carece de utilidad y simplemente no ejercería ningún efecto ni beneficioso ni adverso al organismo, siendo eliminada por los sistemas de

degradación de proteínas (revisión de Inobe y Matouschek, 2014). Sin embargo, PHF5a también ha sido relacionado con la expresión génica en ciertos tejidos y células de otros organismos, de manera que es posible que un exceso de PHF5a concorra en algún tipo de cambio específico en un tejido concreto de *Drosophila* y que modifique la fisiología normal del organismo, aún no afectando a la longevidad. Para elucidar información sobre esta hipótesis, se puede recurrir a un estudio transcriptómico en determinados tejidos como músculo, sistema nervioso, cuerpo graso, etc. y comprobar si existe alguna alteración en la expresión génica. Otro efecto que podemos destacar como posibilidad de la sobreexpresión de PHF5a, es un desequilibrio en el complejo del que forma parte, debido al secuestro de otros factores del complejo. Este suceso fue observado en algunos ensayos con proteínas que intervienen en complejos del tráfico endocítico (Arlt *et al.*, 2011). En cualquier caso, nuevos experimentos deben de llevarse a cabo, para determinar el posible efecto que pueda tener un aumento en la expresión de PHF5a.

Una característica interesante observada al silenciar el PHF5a de manera ubicua en *Drosophila*, fue la desaparición de los discos imaginales tanto de ala, patas y halterios. Este efecto sobre los discos, se demostró mediante el silenciamiento de PHF5a, únicamente en la parte posterior mediante el promotor del gen *engrailed* (*en*). En los discos imaginales de ala visualizados, se observa como la línea que delimita perfectamente la parte anterior de la posterior, está distorsionada y se aprecia una reducción en el área del *en*. En diversos trabajos, este gen ha sido silenciado en embriones (Kennerdell and Carthew, 2000) o neuronas (Albéri *et al.*, 2004) en *Drosophila*, observándose una reducción de la superficie del *en* o en el número de neuronas. Estos fenotipos observados son semejantes a los obtenidos en los discos imaginales de ala en este estudio, de modo, que el silenciamiento de PHF5a supone un efecto adverso en aquellas células *en* y, por ello, se observa una degeneración marcada en esa zona de los discos. También hay que señalar, que los discos imaginales llevan a cabo su etapa de desarrollo casi exclusivamente en 4 días durante el estado larvario, pasando de unas 50 a 50000 células (Neto-Silva *et al.*, 2009). Un defecto sobre esta capacidad de crecimiento en los discos imaginales, resulta especialmente crítica y, como se ha observado, conduce a una pérdida considerable de tejido, en el caso de silenciamiento con *en*, e incluso llegan a desaparecer, si el silenciamiento es mediante el promotor ubicuo de actina.

Cabe destacar que en los discos con silenciamiento con *en*, la estructura general parece mantenerse, a pesar de verse afectada la zona del *en*. Esto hace suponer que existe algún tipo de regeneración, sin embargo, no es posible una regeneración de la parte posterior a través de la anterior, puesto que una vez que ciertos genes selectores se han establecido (*engrailed*, *wingless* o *apterous*), las células se quedan fijadas en ese segmento y sus descendientes quedan “determinados” de igual manera en ese segmento (revisión de Lawrence y Struhl, 1996). De modo, que ese efecto de integridad del disco, parece simplemente un efecto visual y de alcanzar un estado más maduro, la parte posterior se encontraría en muy mal estado y parte desaparecida y, en consecuencia, la estructura general también estaría afectada.

Los individuos con silenciamiento en *en* no son capaces de alcanzar el estado adulto, mueren en estado de pupa. El deterioro visto en las estructuras de los discos imaginales y junto con una supuesta degeneración de otros tejidos como el tejido

nervioso donde se expresa *en* (Kumar, 2009), hacen suponer que sea lógico una pérdida de la viabilidad del organismo, que en este caso, sucede en el estado de pupa. A modo de comprobación, compañeros del mismo grupo de laboratorio donde se ha desarrollado este trabajo, realizaron un silenciamiento de PHF5a en la parte anterior mediante el promotor del gen *cubitus interruptus*. Aunque no analizaron los discos imaginales de ala, sí que observaron que las moscas no llegaban a la etapa adulta, morían en estado de pupa. Esto comprueba nuevamente, que el silenciamiento de PHF5a, aunque sea en la parte posterior o anterior, es letal para *Drosophila* y que es crítico para el desarrollo de los discos imaginales de ala.

Tras observar la pérdida de tejido al silenciar PHF5a, queda por preguntarse cuál es el mecanismo implicado en el defecto causado. Son posibles dos tipos de sucesos, una reducción en el número de mitosis y/o una activación de la apoptosis. Para determinar el impacto que tiene cada proceso, cada uno fue evaluado en la zona central de los discos imaginales donde se expresa el gen decapentaplégico (*dpp*). Se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos que marcaban los puntos de apoptosis (anti-Caspasa 3) y de mitosis (anti-Fosfohistona H3) en los discos imaginales. Además, también fue analizada dicha región para cuantificar de alguna manera la reducción de tejido.

Los análisis de las imágenes mostraron que la zona del *dpp* sufría una reducción significativa con respecto a los controles, media de 1191,47 μm^2 comparado con los 1578,64 μm^2 del control. En cuanto a los análisis de Fosfohistona H3 y Caspasa 3, ninguno de ellos mostró diferencias significativas en los porcentajes de los puntos en la región del *dpp* con respecto al total del ala, entre controles y el experimental. Aunque bien es cierto, que se observa una tendencia en la reducción del porcentaje de mitosis en la zona del *dpp* y, de la misma manera, también aparece un ligero aumento en los puntos de apoptosis.

La reducción de la región del *dpp* en aquellos discos de ala con silenciamiento, comprueba nuevamente el efecto producido al silenciar PHF5a, corroborando los resultados obtenidos anteriormente. Semejante resultado fue obtenido por Repiso *et al.* (2013) al silenciar el gen *dpp* y obtener la desaparición de la región central. De algún modo, PHF5a es requerido para llevar a cabo el desarrollo de ala de igual manera que se requieren ciertos genes como *dpp* (Basler y Struhl, 1994). Al silenciar esta proteína provoca que en aquella región donde se haya silenciado, se produzca una desaparición del tejido, por tanto, la conclusión extraída es que PHF5a es un factor esencial para *Drosophila* y, concretamente, para el desarrollo del disco imaginal de ala.

En el análisis de los puntos de mitosis y de apoptosis, el resultado no fue el esperado, pero se apreciaban tendencias de aumento de apoptosis y de disminución de mitosis, por tanto, que estos datos explican, de forma preliminar, la desaparición de tejido observada en la zona del *dpp*. De este modo, PHF5a es un factor necesario para el desarrollo del organismo y, a falta de concretarlo mediante nuevos experimentos, estaría involucrado en diversos procesos celulares como son la mitosis o la apoptosis. En caso de no estar presente esta proteína, se observa una reducción en el número de mitosis y un aumento en el número de apoptosis, que resulta en una pérdida de tejido.

En diversos experimentos, se han encontrado que algunos componentes del complejo espliceosomal como el U4snRNP (Chinen *et al.*, 2009) o el U6snRNP (Potashkin *et al.*, 1998), resultan en una parada del ciclo de división normal en levadura. De igual forma, en Oltra *et al.* (2004), el silenciamiento de PHF5a produce la parada de la división en la fase S tardía o fase G2 del ciclo celular también en levadura. De manera que a la vista de todos estos resultados, es esperable que en el análisis de mitosis y apoptosis en los discos de ala, sea la reducción en el número de mitosis lo que más contribuye a la pérdida de tejido. Sin embargo, en este trabajo no se ha llegado a esa conclusión. Un aumento en el número de muestras tanto en el control como en el experimental, podría finalmente inclinar la balanza hacia uno de los procesos analizados, presumiblemente a una disminución de las mitosis. Para demostrar verdaderamente si es así, se ha pensado en utilizar la tecnología del RNA-seq. Con ello, se podrá determinar qué transcritos presentan retención de intrones como consecuencia del silenciamiento de PHF5a y si éstos están relacionados con el proceso de mitosis.

Los resultados mostrados, son en general preliminares, desde el punto de vista de que requieren de repeticiones que muestren la reproducibilidad de las observaciones. También resulta absolutamente necesario comprobar los niveles de expresión de PHF5a en cada experimento mediante técnicas de PCR cuantitativa. Además, sería conveniente otro sistema de silenciamiento, que permitiera una cuantificación mucho más robusta y fiable que un análisis de imagen subjetivo a cada persona. A pesar de algunas dificultades en el desarrollo de este trabajo, se han logrado obtener resultados contundentes sobre el funcionamiento de esta proteína.

6. Conclusión

- La proteína PHF5a resulta esencial para la supervivencia de *Drosophila melanogaster*. Su silenciamiento en todo el organismo, conlleva la muerte prematura del organismo en las etapas de larva o pupa.
- La sobreexpresión de PHF5a en todo el organismo no es concluyente en estos momentos. Se está a la espera, de obtener cuál es el efecto en el largo de vida de mosca. Si esta sobreexpresión se traduce en una disminución de la longevidad o en caso contrario, un aumento.
- El silenciamiento de esta proteína mediante el uso de sistemas de expresión más restrictivos (promotores de los genes *engrailed* y *dpp*), provoca un efecto severo de reducción de tejido en los discos imaginales de ala.
- Por último, el mecanismo el cual está implicado en esta reducción de tejido, está todavía por determinarse. Sin embargo, sí que se observa tanto una reducción en el número de mitosis como un aumento en el número de apoptosis, lo que explicaría el resultado observado.

7. Bibliografía

- ALBÉRI, L., SGADÒ, P., and SIMON, H.H. (2004). Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development*, 131(13), 3229-3236.
- ANAND, P. KUNNUMAKARA, A. SUNDARAM, C. HARIKUMAR, K. THARAKAN, S. LAI, O. SUNG, B. and AGGARWAL, B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical research*. 25(9), 2097-2116.
- ARLT, H., PERZ, A., and UNGERMANN, C. (2011). An overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies novel genes that affect endocytic protein trafficking. *Traffic*, 12(11), 1592-1603.
- Artrosfera, *Drosophila* mosca de la fruta. Consultado el 30 Junio de 2015: <http://www.artrosfera.com/art%C3%ADculos/alimento-vivo/cr%C3%ADa-de-drosophila-mosca-de-la-fruta/>
- BASLER, K., and STRUHL, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature*, 368, 208-214.
- BERTET, C. SULAK, L. and LECUIT, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature*. 429(6992), 667-671.
- BIENZ, M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends in biochemical sciences*, 31(1), 35-40.
- CHANDRA, A., van MALDEGEM, F., ANDREWS, S., NEUBERGER, M.S., and RADA, C. (2013). Deficiency in spliceosome-associated factor CTNNB1 does not affect ongoing cell cycling but delays exit from quiescence and results in embryonic lethality in mice. *Cell Cycle*, 12(5), 732-742.
- CHINEN, M., MORITA, M., FUKUMURA, K., and TANI, T. (2010). Involvement of the spliceosomal U4 small nuclear RNA in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromeres. *Journal of Biological Chemistry*, 285(8), 5630-5638.
- DI LEO, A., CURIGLIANO, G., DIÉRAS, V., MALORNI, L., SOTIRIOU, C., SWANTON, C., THOMPSON, A., TUTT, A. and PICCART, M. (2015). New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *The Breast*.
- DIETZL, G., CHEN, D., SCHNORRER, F., SU, K.C., BARINOVA, Y., FELLNER, M., GASSER, B., KINSEY, K., OPPEL, S., SCHEIBLAUER, S., COUTO, A., MARRA, V., KELEMAN, K., and DICKSON, B.J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448(7150), 151-156.
- DiNARDO, S., KUNER, J.M., THEIS, J., and O'FARRELL, P.H. (1985). Development of embryonic pattern in *D. melanogaster* as revealed by accumulation of the nuclear engrailed protein. *Cell*, 43(1), 59-69.

- ELLISEN, L.W., BIRD, J., WEST, D.C., SORENG, A.L., REYNOLDS, T.C., SMITH, S.D., and SKLAR, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4), 649-661.
- FALCK, E., & KLINGA-LEVAN, K. (2013). Expression patterns of Phf5a/PHF5A and Gja1/GJA1 in rat and human endometrial cancer. *Cancer cell international*, 13:43.
- GO, M.J., EASTMAN, D.S., and ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development*, 125(11), 2031-2040.
- HAN, J., XIONG, J., WANG, D., and FU, X.D. (2011). Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends in cell biology*, 21(6), 336-343.
- HANAHAH, D., and WEINBERG, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- HEROLD, N., WILL, C.L., WOLF, E., KASTNER, B., URLAUB, H., and LÜHRMANN, R. (2009). Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. *Molecular and cellular biology*, 29(1), 281-301.
- HERTEL, K.J., and GRAVELEY, B.R. (2005). RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly. *Trends in biochemical sciences*, 30(3), 115-118.
- HUBERT, C.G., BRADLEY, R.K., DING, Y., TOLEDO, C.M., HERMAN, J., SKUTT-KAKARIA, K., GIRARD, J., DAVISON, J., BRERNDT, J., CORRIN, P., HARDCASTLE, J., BASOM, R., DELROW, J., WEBB, T., POLLARD, S.M., LEE, J., OLSON, J.M., and PADDISON, P.J. (2013). Genome-wide RNAi screens in human brain tumor isolates reveal a novel viability requirement for PHF5A. *Genes & development*, 27(9), 1032-1045.
- INADA, S., ZHANG, H., TELLEZ, J. O., SHIBATA, N., NAKAZAWA, K., KAMIYA, K., KODAMA, I., MITSUI, K., DOBRZYNSKI, H., BOYETT, R.M., and HONJO, H. (2014). Importance of gradients in membrane properties and electrical coupling in sinoatrial node pacing. *PloS one*, 9(4), e94565.
- INOBE, T., and MATOUSCHEK, A. (2014). Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current opinion in structural biology*, 24, 156-164.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M.M., FERLAY, J., WARD, E., and FORMAN, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.
- JONES, L.A., CHILTON, J.A., HAJEK, R.A., IAMMARINO, N.K., and LAUFMAN, L. (2006). Between and within: international perspectives on cancer and health disparities. *Journal of clinical oncology*, 24(14), 2204-2208.
- KENNERDELL, J.R., and CARTHEW, R.W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature biotechnology*, 18(8), 896-898.
-

KORNBERG, T., SIDÉN, I., O'FARRELL, P., and SIMON, M. (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell*, 40(1), 45-53.

KUMAR, A. (2009). Analysis of the *engrailed*-expressing neuroblast lineages in *Drosophila* brain development. Tesis Doctoral, Universidad de Basilea.

LAWRENCE, P.A., and STRUHL, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*?. *Cell*, 85(7), 951-961.

MAKISHIMA, H., VISCONTE, V., SAKAGUCHI, H., JANKOWSKA, A. M., KAR, S. A., JEREZ, A., PRZYCHODZEN, B., BUPATHI, M., GUINTA, K., AFABLE, M.G., SEKERES, M.A., PADGETT, R.A., TIU, R.V., and MACIEJEWSKI, J.P. (2012). Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*, 119(14), 3203-3210.

MCLACHLAN, E., SHAO, Q., WANG, H.L., LANGLOIS, S., and LAIRD, D.W. (2006). Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer research*, 66(20), 9886-9894.

MOJARDÍN, L., BOTET, J., QUINTALES, L., MORENO, S., and SALAS, M. (2013). New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. *PloS one*, 8(11), e78172.

MORGAN TH. (1917). The theory of the gene. *American Naturalist*, 51:513–544.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012. Types of treatment cáncer. Visto en 3 de mayo de 2015: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>

NETO-SILVA, R.M., WELLS, B.S., and JOHNSTON, L.A. (2009). Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing. *Annual review of cell and developmental biology*, 25, 197-220.

NEUMEIER, H. (2008). A genome wide RNAi screen in *D. melanogaster* for the identification of genes involved in border cell migration. Tesis Doctoral, Master en Biología Molecular, Universidad de Viena.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C., and WIESCHAUS, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795-801.

OLTRA, E., PFEIFER, I., and WERNER, R. (2003). Ini, a small nuclear protein that enhances the response of the connexin43 gene to estrogen. *Endocrinology*, 144(7), 3148-3158.

OLTRA, E., VERDE, F., WERNER, R., and D'URSO, G. (2004). A novel RING-finger-like protein Ini1 is essential for cell cycle progression in fission yeast. *Journal of cell science*, 117(6), 967-974.

OLTRA, E., SÁNCHEZ-MARES, M.T., OVEJERO, T., ESPEJO-OLTRA, J.A., PRZYKUCKA, A., and GALINDO, M.I. (2014). Role of the evolutionarily conserved CG9548 *Drosophila melanogaster* gene in fly development. Congreso: Transcriptional Regulation in Development. Ed. *Cell*, en días 13-16 de Julio de 2014, Chicago (USA).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2015. Fact sheet nº297, Cancer. Visto el 28 de abril de 2015: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

OZGUR, O.K., YIN, V., CHOU, E., BALL, S., KIES, M., WILLIAM, W.N., MIGDEN, M., THURO, B.A., and ESMAELI, B. (2015). Hedgehog pathway inhibition for locally advanced periocular basal cell carcinoma and basal cell nevus syndrome. *American journal of ophthalmology*.

PALLAVI, S.K., HO, D.M., HICKS, C., MIELE, L., and ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (2012). Notch and Mef2 synergize to promote proliferation and metastasis through JNK signal activation in *Drosophila*. *The EMBO journal*, 31(13), 2895-2907.

PANDEY, U.B., and NICHOLS, C.D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2), 411-436.

POTASHKIN, J., KIM, D., FONS, M., HUMPHREY, T., and FRENDEWEY, D. (1998). Cell-division-cycle defects associated with fission yeast pre-mRNA splicing mutants. *Current genetics*, 34(3), 153-163.

RAMPLING, R., JAMES, A., and PAPANASTASSIOU, V. (2004). The present and future management of malignant brain tumours: surgery, radiotherapy, chemotherapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75(suppl 2), ii24-ii30.

READ, R.D., CAVENEE, W.K., FURNARI, F.B., and THOMAS, J.B. (2009). A *drosophila* model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma. *PLoS genetics*, 5(2), e1000374.

REITER, L.T., POTOCKI, L., CHIEN, S., GRIBSKOV, M., and BIER, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome research*, 11(6), 1114-1125.

REPISO, A., BERGANTIÑOS, C., and SERRAS, F. (2013). Cell fate respecification and cell division orientation drive intercalary regeneration in *Drosophila* wing discs. *Development*, 140(17), 3541-3551.

RZYMSKI, T., GRZMIL, P., MEINHARDT, A., WOLF, S., and BURFEIND, P. (2008). PHF5A represents a bridge protein between splicing proteins and ATP-dependent helicases and is differentially expressed during mouse spermatogenesis. *Cytogenetic & Genome Research*, 121:232-244

SCHINDLER, U., BECKMANN, H., and CASHMORE, A. R. (1993). HAT3. 1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *The Plant Journal*, 4(1), 137-150.

TANNER, N.K., and LINDER, P. (2001). DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Molecular cell*, 8(2), 251-262.

TIPPING, M., and PERRIMON, N. (2014). *Drosophila* as a Model for Context-Dependent Tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 229(1), 27-33.

TONG, D., LU, X., WANG, H.X., PLANTE, I., LUI, E., LAIRD, D.W., BAI, D., and KIDDER, G.M. (2009). A dominant loss-of-function GJA1 (Cx43) mutant impairs parturition in the mouse. *Biology of reproduction*, 80(6), 1099-1106.

TRAPPE, R., AHMED, M., GLÄSER, B., VOGEL, C., TASCOU, S., BURFEIND, P., and ENGEL, W. (2002a). Identification and characterization of a novel murine multigene family containing a PHD-finger-like motif. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(2), 816-826.

TRAPPE, R., SCHULZE, E., RZYMSKI, T., FRÖDE, S., and ENGEL, W. (2002b). The *Caenorhabditis elegans* ortholog of human PHF5a shows a muscle-specific expression domain and is essential for *C. elegans* morphogenetic development. *Biochemical and biophysical research communications*, 297(4), 1049-1057.

TSUIJI, H., IGUCHI, Y., FURUYA, A., KATAOKA, A., HATSUTA, H., ATSUTA, N., TANAKA, F., HASHIZUME, Y., AKATSU, H., MURAYAMA, S., SOBUE, G., and YAMANAKA, K. (2013). Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO molecular medicine*, 5(2), 221-234.

VAN ROON, A.M.M., LOENING, N.M., OBAYASHI, E., YANG, J.C., NEWMAN, A.J., HERNÁNDEZ, H., NAGAI, K., and NEUHAUS, D. (2008). Solution structure of the U2 snRNP protein Rds3p reveals a knotted zinc-finger motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9621-9626.

VISCONTE, V., MAKISHIMA, H., JANKOWSKA, A., SZPURKA, H., TRAINA, F., JEREZ, A., O'KEEFE, C., ROGERS, H.J., SEKERES, M.A., MACIEJEWSKI, J.P., and TIU, R.V. (2012). SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*, 26(3), 542-545.

VOCKLEY, J.G., and NIEDERHUBER, J.E. (2015). Diagnosis and treatment of cancer using genomics. *BMJ*, 350, h1832.

WILL, C.L., and LÜHRMANN, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), a003707.

WILL, C.L., URLAUB, H., ACHSEL, T., GENTZEL, M., WILM, M., and LÜHRMANN, R. (2002). Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *The EMBO journal*, 21(18), 4978-4988.

XU, K., BOGERT, B.A., LI, W., SU, K., LEE, A., & GAO, F.B. (2004). The fragile X-related gene affects the crawling behavior of *Drosophila* larvae by regulating the mRNA level of the DEG/ENaC protein pickpocket1. *Current biology*, 14(12), 1025-1034.

XU, H., GU, S., RIQUELME, M.A., BURRA, S., CALLAWAY, D., CHENG, H., GUDA, T., SCHMITZ, J., FAJARDO, R.J., WERNER, S.L., ZHAO, H., SHANG, P., JOHNSON, M.L., BONEWALD, L.F., and JIANG, J.X. (2014). Connexin 43 Channels are Essential for Normal Bone Structure and Osteocyte Viability. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(3), 550-562.