



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Generación de un modelo knock-out del gen *SCN1A* en *Drosophila melanogaster* para el estudio del Síndrome de Dravet

Grado en Biotecnología

Curso 2016-2017

Valencia, junio 2017

Autor: Andrés Planells Cárcel

Tutor: Máximo Ibo Galindo

Co-tutor externo: Andrea Tapia González



GENERACIÓN DE UN MODELO KNOCK-OUT DEL GEN *SCN1A* EN *DROSOPHILA MELANOGASTER* PARA EL ESTUDIO DEL SÍNDROME DE DRAVET

Autor: D. Andrés Planells Cárcel

Tutor Académico: Prof. D. Máximo Ibo Galindo

Cotutor externo: Dña. Andrea Tapia González

Valencia, junio de 2017

RESUMEN

El Síndrome de Dravet (SD) es una enfermedad rara infantil que se manifiesta en crisis epilépticas a temprana edad y provoca un deterioro cognitivo y conductual. Esta enfermedad es causada por mutaciones dominantes en el gen *SCN1A*. Este trabajo se centra en la generación de un modelo knock-out (KO) del gen *paralytic* en *Drosophila melanogaster*, homólogo al gen *SCN1A* en humanos, para su aplicación en el estudio del SD. A la vez se ha estudiado la conducta de cepas sensibles a convulsiones tales como *paralytic bangsenseless (para)*, *easily shocked (eas)* y *slamdance (sda)* realizando ensayos de supervivencia, de comportamiento, de escalada y de capacidad de vuelo.

Se ha superado la etapa de biología molecular, obteniendo un plásmido efectivo para la recombinación homóloga que generará el KO, y también se ha conseguido obtener cepas transgénicas de *D. melanogaster* y mapear la localización del inserto en cada una de ellas. Estas cepas se utilizarán en un futuro para generar el KO de interés.

En los ensayos se ha comprobado que la cepa con la mutación en el gen *para* es la que presenta un fenotipo más afectado en mosca adulta en comparación con el control, mostrando menor tasa de supervivencia, necesitando más tiempo para recuperarse tras una convulsión y escalando menor distancia en las paredes del tubo que el resto de genotipos. El genotipo *eas* solo mostró un comportamiento atípico en el ensayo de supervivencia y el comportamiento, manteniéndose normal en los ensayos de actividad locomotora. La cepa con la mutación en *sda* fue la que menos diferencias tuvo respecto al control, solo manifestando convulsiones de corta duración como diferencia. Estos ensayos han permitido aprender su correcta ejecución y han generado valores de referencia sobre los que comparar los resultados que se obtendrán con la mosca KO. Además, han puesto de manifiesto el importante defecto que genera una mutación puntual en el gen *paralytic* para la homeostasis en mosca adulta.

Palabras clave: knock-out, *SCN1A*, Síndrome de Dravet, *Drosophila melanogaster*, epilepsia.

GENERATION OF A SCN1A KNOCK-OUT MODEL IN DROSOPHILA MELANOGASTER FOR STUDYING DRAVET SYNDROME

Author: Mr. Andrés Planells Cárcel

Tutor: Prof. Mr. Máximo Ibo Galindo

External Co-tutor: Ms. Andrea Tapia González

Valencia, June 2017

ABSTRACT

Dravet's Syndrome (DS) is a rare childhood disease that causes epileptic seizures at early age and permanent cognitive and behavioral deterioration. This disease is caused by dominant mutations in the *SCN1A* gene. This work is focused on the generation of a knock-out (KO) model of the *paralytic* gene, the homologous gene of *SCN1A* human gen, in *Drosophila melanogaster* to study DS. At the same time, the bang-sensitive strains *para*, *eas* and *sda* have been characterized through survival, behavior, climbing and flight capacity tests.

The stage of molecular biology for the obtaining of the KO has been achieved, obtaining an effective plasmid for homologous recombination. Moreover, different transgenic strains of *D. melanogaster* have been obtained and the location of the insert has been mapped in each one. These strains will be used in the future to generate the KO of interest.

The tests have revealed that the strain with the mutation in gene *para* presents the most affected phenotype in adult flies. It shows a lower survival rate, needs more time to recover after a seizure and has less locomotor capacity than other phenotypes. The *eas* genotype showed an atypical behavior in survival and behavior tests, but it did not present any difference with control flies in the locomotor capacity tests. The strain with the mutation in *sda* was the one that exhibited less differences respect to the control, showing only short seizures. These tests have allowed to know the correct way to execute them, since they have generated reference values, useful to compare with the future KO fly results. In addition, they have revealed the important defects that a point mutation in the *paralytic* gene causes in the homeostasis of adult flies.

Key words: knock-out, *SCN1A*, Dravet Syndrome, *Drosophila melanogaster*, epilepsy.

Agradecimientos

Me gustaría dedicar este trabajo a varias personas. En primer lugar, a Máximo Ibo Galindo, por acogerme en su laboratorio y abrirme las puertas al mundo de *Drosophila* que hay dentro de la investigación. Investigar en este campo no es algo que hubiera tenido en mente, pero después de estos meses creo que es una buena opción en la investigación del análisis de enfermedades.

Agradecer también a mis compañeros de laboratorio. Gracias Víctor, por transmitir tu conocimiento y tu pasión por el trabajo con ese carácter bondadoso que tienes ante a los demás. Gracias Pilar, por hacerme llevar más fácil mis quebraderos de cabeza y hacerme ver que no todo es tan complicado. Me alegra un montón haberos conocido y espero que el final de este trabajo no sea un adiós, sino un hasta luego.

Y Gracias Andrea por todo, por estar pendiente de mí, por las risas, por poner todo el empeño para que el trabajo saliera bien, por sacrificar tus fines de semanas para conseguir el trabajo, por aguantarme en nuestras discusiones diarias y no perder la paciencia conmigo, por ayudarme a relajarme cuando perdía los nervios y no veía la luz al final del túnel. Gracias a ti esta etapa en el laboratorio ha marcado una etapa en mi vida y espero que nos volvamos a ver en el futuro.

Gracias a mis compañeros de la universidad por haberme acompañado en esta etapa de mi vida, en especial a Tamara, David, Laura, Anto y Javi. Gracias a vosotros la universidad ha sido menos dura y ha tenido momentos felices y divertidos.

Gracias a mi familia por apoyarme siempre y creer en mí. No siempre es fácil seguir adelante, pero gracias a vuestro apoyo todo ha sido posible, porque vuestro apoyo y calor es fundamental para que continúe mi camino y supere todos los obstáculos. Gracias por aguantarme y cuidarme en todos los malos momentos y por hacerme disfrutar cada momento que paso con vosotros.

Y también gracias a mi otra pequeña familia con la que llevo desde los 3 años, mis amigos. Gracias por los ánimos, las bromas y la curiosidad que presentabais cuando os comentaba mi trabajo. Puede que el trabajo haya sido duro, pero gracias a vosotros podía desconectar por las noches en el bar y coger con más ganas el trabajo después. Porque sin vosotros “el señor de las moscas” no habría llegado hasta aquí. Os debo mucho más de lo que pueda escribir.

Índice

1. Introducción:	1
1.1. Síndrome de Dravet	1
1.2. El gen SCN1A	2
1.3. Drosophila melanogaster como modelo de epilepsia	3
1.4. El gen paralytic	5
1.5. Recombinación homóloga para generar knock-outs:	6
2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos:	11
3.1. Biología Molecular	11
3.1.1. Diseño del plásmido:.....	11
3.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa:.....	11
3.1.3. Clonación en TOPO:	13
3.1.4. Electroforesis:	13
3.1.5. Extracción de plásmidos en colonias:	13
3.1.6. Digestión enzimática:.....	14
3.1.7. Ligación:	14
3.1.8. Purificación:	15
3.1.9. Secuenciación:	15
3.1.10. Transformación bacteriana:.....	15
3.2. Caracterización de genotipos.	16
3.2.1. Stock:	16
3.2.2. Cruces para mapear el KO:	16
3.2.3. Ensayo de supervivencia:.....	16
3.2.4. Ensayo de comportamiento.....	16
3.2.5. Ensayo de geotaxis negativa	17
3.2.6. Ensayo de capacidad de vuelo:	17
3.2.7. Análisis de datos:	17
4. Resultados	18
4.1. Construcción del vector	18
4.2. Mapeo del gen	21
4.3 Optimización de ensayos de caracterización	22
4.3.1 Ensayo de supervivencia	23
4.3.2 Ensayo de comportamiento.....	24
4.3.3 Ensayo de geotaxis negativa	26
4.3.4 Ensayo de vuelo	27
5. Discusión	29
6. Conclusiones	32
7. Bibliografía	33

Índice de Figuras:

Figura 1 Esquema de la proteína Nav1.1.	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
Figura 3. Representación esquemática de las convulsiones en mutantes <i>bang sensitive</i>	4
Figura 4: Estructura del canal Nav1.1 del gen para.	5
Figura 5. Esquema de la generación de knock-out (KO) y Knock-in (KI) empleando la técnica del “gene targeting”	6
Figura 6. Esquema del vector pTVcherry.	7
Figura 7. Esquema de la inserción en el exón escogido y secuencias para la eliminación del marcador de selección.	7
Figura 8. Esquema de los cruces necesarios para la obtención de la mosca knock-out.	8
Figura 9. Esquema de la zona seleccionada para la recombinación homóloga.	18
Figura 10. Geles de comprobación de la PCR.	19
Figura 11. Gel de comprobación de la inserción del fragmento en el vector pTVcherry. En la Figura A se observan 3 carriles.....	20
Figura 12. Esquema de los cruces realizados para el mapeo de la inserción	21
Figura 13. Representación del porcentaje de moscas vivas en función del tiempo de vida para los 4 genotipos estudiados: Control, para, eas y sda.	23
Figura 14. Representación del porcentaje de moscas que convulsionan en función de genotipo y género.	24
Figura 15. Representación de la distribución poblacional de los diferentes tiempos de recuperación en función del genotipo y el género.	25
Figura 16. . Representación del porcentaje de escalada en función del tiempo para los diferentes genotipos estudiados: control, para, eas y sda.	27
Figura 17. Representación de la capacidad de volar en cada genotipo.....	28

Índice de Tablas

Tabla 1: Diferentes cepas “bang-sensitive” con el producto génico que es afectado.	4
Tabla 2. Secuencias de los cebadores junto a sus características y la técnica donde fueron empleados. .	11
Tabla 3. Enzimas de restricción junto a su secuencia de reconocimiento y procedencia.	11
Tabla 4. Protocolo para la PCR con el ADN polimerasa “Phusion”	12
Tabla 5 Protocolo para la PCR con el ADN polimerasa “Biotools”	12
Tabla 6. Instrucciones de los ciclos de amplificación.	12
Tabla 7. Protocolo de clonación en TOPO.....	13
Tabla 8. Protocolo de la digestión con enzimas de restricción.	14
Tabla 9. Cebadores para la secuenciación junto a la secuencia que contienen.	15
Tabla 10. Tipos de cepas de <i>D. melanogaster</i> utilizadas con su origen y genotipo.....	16

Abreviaturas

ANOVA- Análisis de varianzas

BS – bang-sensitive

DGRC- Drosophila Genomic Recourse Center

dNTP – desoxirribonucleótido trifosfato

eas- easily shocked

GABA- Ácido gamma-aminobutirato

iPSC – células madre pluripotentes inducidas

KO – Knock-out

LB -Luria Bertani

NCBI - National Center of Biotechnology Information

para- paralytic

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa

Rpm – revoluciones por minuto

SD – Síndrome de Dravet

sda- slamdance

1. Introducción

1. Introducción:

1.1. Síndrome de Dravet

El Síndrome de Dravet (SD) es un tipo de epilepsia con un conocido factor genético. Fue descrito como un síndrome infantil de epilepsias mioclónicas severas en 1978 por Charlotte Dravet (Dravet, 2003) y está considerada como una enfermedad rara con una incidencia menor a 1 por 40,000 (Hurst, 1990). En España hay unos 200 casos correctamente diagnosticados, pero se estima que puede haber más (<http://www.apoyodravet.eu/>). La tasa de mortalidad ronda el 16% (Dravet,2011) y suele ser por muerte súbita o accidentes relacionados con ataques.

Este síndrome se caracteriza por epilepsias severas mioclónicas durante la infancia que pueden comenzar a manifestarse después del primer mes de vida, pero mayoritariamente entre el quinto u octavo mes de vida, en niños aparentemente normales. Los síntomas que dan evidencias de tener esta enfermedad son estados epilépticos o convulsiones, a veces con fiebre, retraso del desarrollo cognitivo, signos neurológicos y resistencia a gran variedad de fármacos epilépticos. (Dravet, 2011)

Las primeras convulsiones son clónicas y activadas por la fiebre, pero más largas que las convulsiones por fiebre, durando unos 20 minutos. Hay casos en que no necesitan ser activadas por fiebre. En estos últimos casos suele suceder tras baños calientes o tras una infección o vacunación. Tras esta primera convulsión ocurren otras convulsiones afebriles poco tiempo después (de 2 semanas a 2 meses) que ocurren simultáneamente con un retraso en el desarrollo normal del niño. Estas convulsiones son de 5 tipos distintos y de intensidad variable, generando un retraso en el desarrollo psicomotor y del desarrollo neuronal del niño que le supone una dependencia total durante toda su vida (Dravet, 2011).

El retraso en el desarrollo se hace evidente tras el segundo año. Los niños comienzan a andar y hablar a la edad normal, pero necesitan más tiempo y el habla progresa más lentamente. Las habilidades motoras no se desarrollan bien, impidiendo, en ocasiones, dibujar o escribir. La pérdida de atención hace que sean inquietos y que no participen en actividades de grupo. No todos los pacientes tienen estos rasgos y disminuyen con un diagnóstico precoz (Dravet, 2011).

Los signos neurológicos aparecen progresivamente, pero no se observan en todos los pacientes. Estos signos consisten en ataxia, hipotonía (60%), signos piramidales (20%) y movimientos descoordinados. La ataxia tiende a atenuarse con la edad, pero puede reaparecer tras un estado epiléptico. Estos signos producen una manera peculiar de andar que les genera dificultades (Dravet, 2011).

La mayoría de los fármacos son infectivos y, aunque hay ensayos clínicos en fase uno que muestran eficacia en la combinación de stiripentol, valproate y clobazam (Chiron, et al., 2011), la gran diversidad entre los pacientes hace que no sea fácil encontrar un fármaco eficaz para todos ellos.

1.2. El gen *SCN1A*

En el año 2001 se descubrió que la principal causa genética de este síndrome es una mutación en el gen *SCN1A* (Claes et al., 2001). Este gen codifica para la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje en neurona ($Na_v1.1$) (Cleas, et al., 2001). Los canales de sodio se abren en respuesta a la despolarización de la membrana de las neuronas, permitiendo propagar el impulso nervioso hasta las terminaciones sinápticas. En humanos hay 9 subunidades α distintas codificadas por genes distintos y las proteínas $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$ son las más abundantes en el sistema nervioso central, cuyos genes han sido asociados a desórdenes epilépticos (Brunklau et al., 2014). En la Figura 1 se puede observar la estructura molecular de $Na_v1.1$, codificada por *SCN1A*.

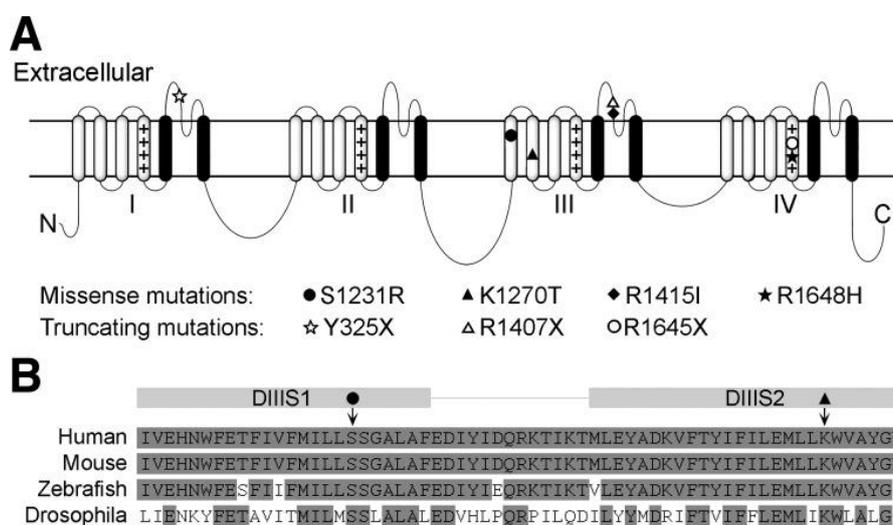


Figura 1 Esquema de la proteína *Nav1.1*. En la Figura 1A se observa la estructura de los 4 dominios formados por 6 regiones transmembranales y las mutaciones más usuales en esta proteína. En la Figura 1B se observan las secuencias homólogas del gen *SCN1A* en diferentes especies: humano, ratón, pez cebra y mosca de la fruta. (Schutte et al. 2016).

La proteína que codifica *SCN1A* se trata de un canal de sodio con cuatro dominios que contiene 6 regiones transmembranales en cada dominio. El poro es formado por la organización colectiva de los segmentos 5 y 6 de cada dominio.

Las mutaciones de *SCN1A* que aparecen en SD incluyen mayoritariamente mutaciones truncadas y mutaciones en sitios de empalme alternativo o “*alternative splicing*”, aunque hay casos de pequeñas deleciones y duplicaciones intragénicas (Madina, et al, 2006). La hipótesis actual es que SD está causado por una haploinsuficiencia o “pérdida de función” (Cleas, et al., 2001). La explicación es que *SCN1A* está más expresado en interneuronas inhibitorias y una pérdida de función resultaría en una pérdida de inhibición, pudiendo generar una hiperexcitabilidad del sistema nervioso.

La mayoría de las mutaciones son *de novo* por lo que tienen una alta variabilidad genotípica. La variabilidad de mutaciones en *SCN1A* podría explicar la variabilidad fenotípica pero también se cree que hay una importante variabilidad debida a otros factores genéticos o ambientales (Guerrini, 2012).

Debido a que los fármacos anti-epilepsia no funcionan bien contra el SD es necesario realizar nuevos estudios y diferentes enfoques para poder entender los mecanismos celulares que causan las convulsiones y así poder desarrollar nuevas terapias. Actualmente, hay cinco sistemas modelo donde explorar el mecanismo celular, siendo estos los sistemas de expresión heteróloga, el ratón, el pez cebra, las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de neuronas y la mosca de la fruta (Schutte et al. 2016).

1.3. *Drosophila melanogaster* como modelo de epilepsia

Drosophila melanogaster, conocido comúnmente como mosca de la fruta, es un modelo muy habitual para enfermedades genéticas humanas. Se estima que un 75% de los genes humanos implicados en enfermedades que tienen genes ortólogos en *D. melanogaster*, por lo es un modelo muy útil para descubrir los mecanismos moleculares de la enfermedad e incluso para probar tratamientos (Pandey & Nichols, 2011). En la Figura 2 se puede observar un esquema de su ciclo vital.

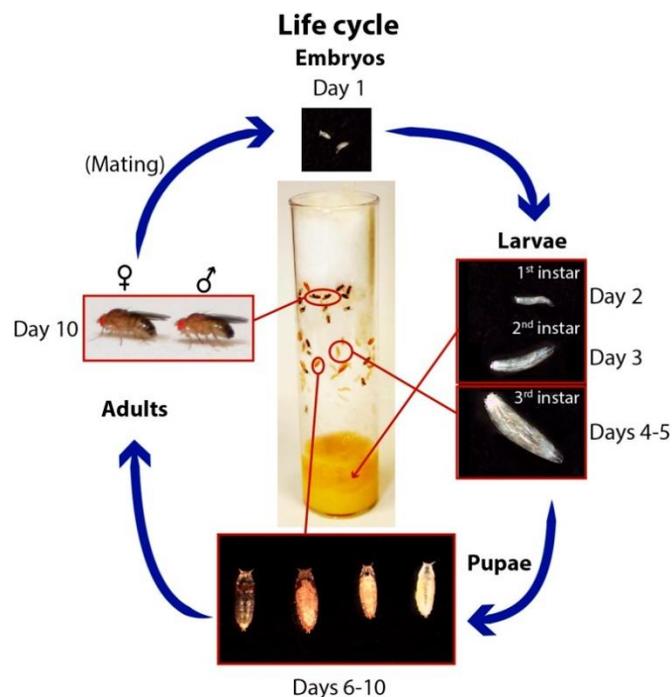


Figura 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. *D. melanogaster* tiene cuatro etapas vitales: embrión, larva, pupa y adulto. Dentro de larva existen tres periodos. Para pasar de embrión a larva tarda 2 días, de larva a pupa entre 3-4 días, de pupa a adulto 4 días, generando una mosca adulta en una media de 10 días (Hales et al., 2015).

Este organismo presenta diversas ventajas que la convierten en un buen modelo biológico para el estudio de ciertas enfermedades humanas. Su ciclo de vida es relativamente corto, de 10 días, con una longevidad de 40 a 120 días dependiendo de la dieta y el estrés (Hales et al., 2015). Esto permite estudiar la formación y progresión de una enfermedad desde las etapas más tempranas hasta la adultez o vejez.

También genera un gran número de descendientes, lo cual es útil a la hora de tener más datos poblacionales al realizar estudios estadísticos y reducir el error por variabilidad. Su mantenimiento en el laboratorio es relativamente económico comparando con otros animales, como los cordados, y es sencillo de manipular debido a su pequeño tamaño. Además, actualmente existen diversas herramientas para la manipulación genética en *D. melanogaster*

que permiten estudiar y conocer mejor los mecanismos moleculares de las enfermedades para poder abordar nuevos tratamientos (Hales et al., 2015).

D. melanogaster tiene similitudes a nivel celular y subcelular con el sistema nervioso de mamíferos, teniendo canales de membrana dependientes de voltaje y de ligando para el sodio, potasio, calcio y receptores de acetilcolina, glutamato y el ácido gamma-aminobutirato (GABA). Pero también tiene diferencias, destacando la organización del sistema nervioso central entre ellas (Song & Tanouye, 2009).

La utilización de *D. melanogaster* como modelo para convulsiones surgió tras la caracterización de cepas llamadas “bang-sensitive” (BS). Estas cepas responden con convulsiones a estímulos mecánicos, de temperatura e incluso de luz y tienen fenotipos variables en duración e intensidad (Song & Tanouye, 2009). En la Tabla 1 se recogen 11 mutantes BS que han sido utilizadas como modelo para las convulsiones.

Tabla 1: Diferentes cepas “bang-sensitive” junto el gen afectado y el producto génico (Song & Tanouye, 2009).

Mutante sensible a convulsiones	Gen afectado	Producto génico
Bang senseless (<i>para^{bss1}</i>)	<i>paralytic</i>	Canal de Na ⁺ dependiente de voltaje
Easily shocked (<i>eas</i>)	<i>easily shocked</i>	Etanolaminakinasa
Slamdance (<i>sda</i>)	<i>slamdance</i>	Aminopeptidasa N
Bang sensitive (<i>bas1, bas2</i>)	Desconocido	Desconocida
Technical knockout (<i>tko</i>)	<i>technical knockout</i>	Proteína ribosomal S12
Jitterbug (<i>jbug</i>)	<i>jitterbug</i>	Desconocido
Couchpotato (<i>cpo</i>)	<i>couch potato</i>	Proteína de unión a RNA
Kazachoc (<i>kcc</i>)	<i>kazachoc</i>	K ⁺ Cl ⁻ Cotransportador
Knockdown (<i>kdn</i>)	<i>knockdown</i>	Citrato sintetasa
Stress-sensitive (<i>sesB</i>)	<i>stress-sensitive B</i>	Adenina nucleótido translocasa

Las convulsiones varían según el genotipo, la edad y la temperatura, pero pueden ser caracterizadas por varias etapas como se muestra en la Figura 3.

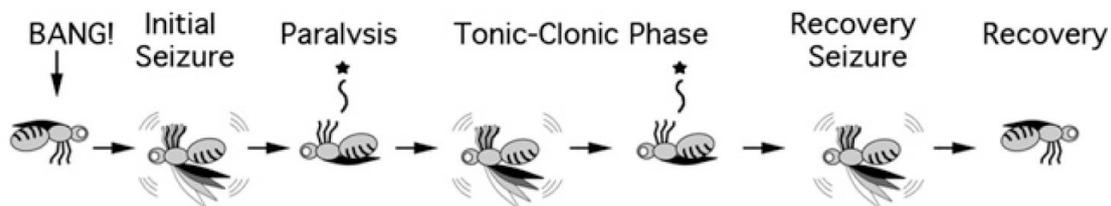


Figura 3. Representación esquemática de las convulsiones en mutantes “bang sensitive”. La primera etapa consiste en una convulsión, caracterizadas por el aleteo incontrolado o sacudidas en las patas. Después se produce una fase de parálisis de duración variable según el genotipo. Por último, se produce una convulsión de recuperación antes de que se produzca la fase de recuperación final. En el caso del genotipo *parabss1* se produce una fase intermedia, la fase clónica, correspondiente a otra etapa de convulsión y parálisis antes de la convulsión de recuperación (Parker et al. 2011).

Primero tienen una convulsión inicial, caracterizada por sacudidas en las patas, contracciones del músculo abdominal y un aleteo incontrolado. Después se genera una parálisis que los inmoviliza y finalmente una convulsión antes de la recuperación total. En el caso de las *para^{bss1}*

se observa una fase más intermedia, fase tónica-clónica, donde se producen convulsiones seguidas de parálisis una vez más (Parker et al. 2011). Inmediatamente después de haber sufrido un ataque epiléptico las moscas pierden la sensibilidad a convulsionar temporalmente durante un periodo llamado “tiempo de refracción” (Ganetzky & Wu, 1982). Este periodo también es variable en función del genotipo analizado.

1.4. El gen *paralytic*

D. melanogaster tiene el gen *paralytic* (*para*) que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje similar a Nav1.1, por lo que sería el homólogo al gen *SCN1A* en humanos. Aunque en humanos hay varias subunidades, el empalme alternativo del transcrito del gen *para* genera gran variabilidad de canales de sodio con distintas propiedades biofísicas (O'Dowd et al. 1995; Lin et al. 2009). La estructura del canal de sodio es muy similar a la de los vertebrados y las regiones críticas muestran una alta conservación (Loughney et al., 1989).

Las mutaciones en este gen generan distintos modelos de estudio para enfermedades epilépticas. En la Figura 4 se pueden observar distintas mutaciones en el canal junto a las cepas que las contienen. Un modelo interesante para estudiar enfermedades epilépticas como el SD es el mutante “*bang-senseless*” (*para^{bss1}*), que contiene la mutación L1676F (Parker et al., 2011). El L1676 se corresponde con un residuo altamente conservado en el tercer fragmento de inserción a la membrana del cuarto dominio del canal de sodio (Parker, et al., 2011).

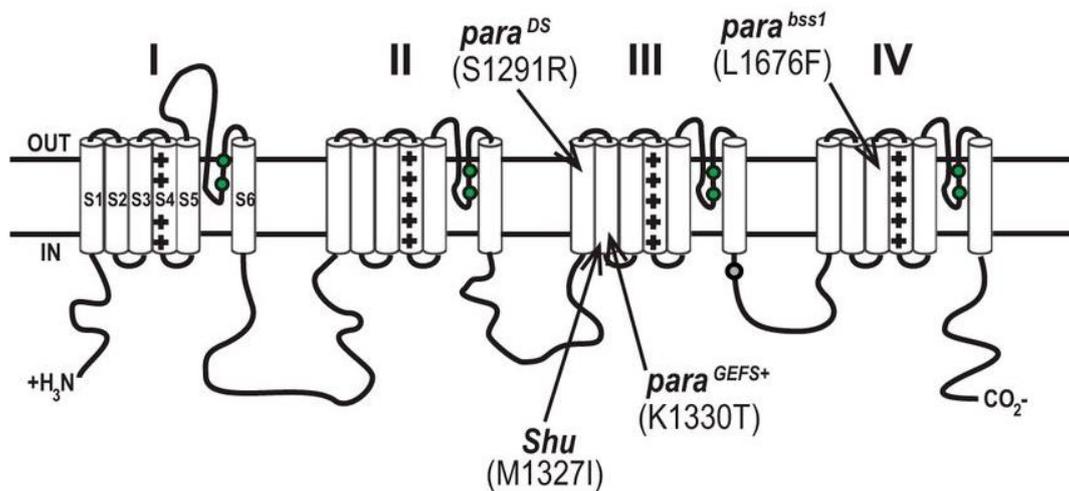


Figura 4: Estructura del canal Nav1.1 del gen *para*. En la Figura se muestran los cuatro dominios formados por seis motivos transmembrana. Se indican con flechas las localizaciones de las mutaciones para cada cepa de *Drosophila melanogaster* con un fenotipo *bang-sensitive* (Kaas et al., 2016).

Esta cepa de *D. melanogaster* exhibe convulsiones tras generarle un estrés mecánico, aunque la localización de las mutaciones no corresponde con las mutaciones conocidas en *SCN1A* causantes de epilepsias. Curiosamente, otras mutaciones en el gen *para* son alelos de pérdida de función que generan mayor resistencia a las convulsiones y que pueden funcionar como mutaciones supresoras de las convulsiones en otras cepas BS (Song et al., 2007). Por lo tanto, el alelo *para^{bss1}* se trata del único alelo de *para* que produce una ganancia de función.

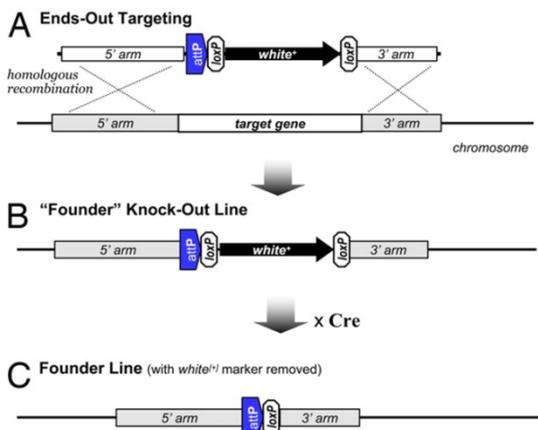
Diferentes estudios han generado líneas knock-in (KI) en *D. melanogaster* con las mutaciones encontradas en pacientes de enfermedades epilépticas como SD o epilepsia generalizada con convulsiones febriles (GEFS+), y han conseguido mostrar fenotipos más similares a los de las enfermedades humanas, llegando a tener convulsiones inducidas por calor que se asemejan a las convulsiones con fiebre es estas enfermedades (Sun et al., 2012).

1.5. Recombinación homóloga para generar knock-outs

“Gene targeting” es la modificación de un gen endógeno utilizando la recombinación homóloga. Normalmente se ha empleado esta técnica en levadura o ratón, pero recientemente se ha mejorado la técnica para su utilización en *D. melanogaster* (Rong & Golic, 2000). Esta técnica se ha utilizado tanto para la eliminación de fragmentos génicos como para la inserción de secuencias exógenas con gran precisión (Huang et al., 2008; Liu et al., 2012). En la Figura 5 se puede ver un esquema de cómo obtener un knock-out (KO) y un KI utilizando esta técnica.

Genomic engineering by targeted site-specific DNA integration.

(1) Generating “founder” knock-out line



(2) Creating engineered mutant allele

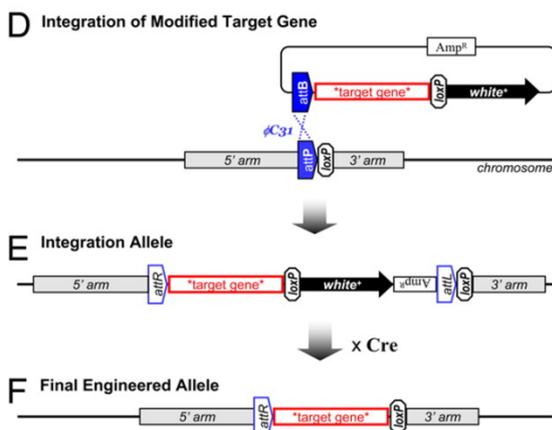


Figura 5. Esquema de la generación de knock-out (KO) y Knock-in (KI) empleando la técnica del “gene targeting”. En la Figura 5A, B y C se muestra cómo eliminar un gen por recombinación homóloga seguido de la eliminación del marcador empleando la proteína Cre. En la Figura D, E y F se muestra como insertar un gen en la misma zona donde se eliminó anteriormente. Para ello se emplea el sistema del fago PhiC31 y el sistema de recombinación mediado por la proteína Cre para eliminar el marcador (Huang et al., 2009).

Para realizar esta recombinación se utilizan vectores específicos diseñados para este propósito. En la Figura 6 se puede ver el esquema de pTVcherry, que fue empleado en este trabajo (Baena-López et al., 2013).

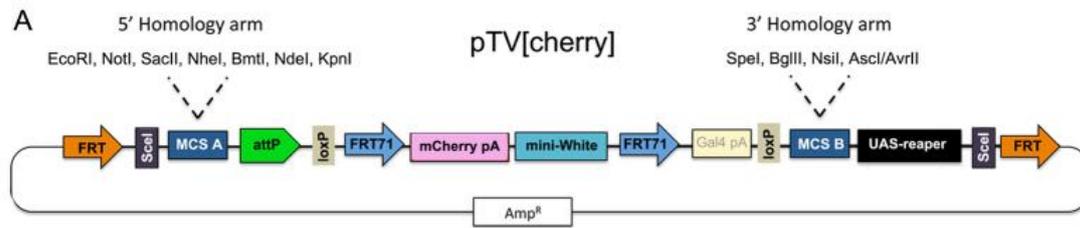


Figura 6. Esquema del vector pTVcherry. Este plásmido contiene 2 sitios de clonación múltiple donde incorporar los brazos de homología de la región que queremos modificar. Además, contiene los elementos las regiones FRT y Scel para liberar el fragmento interno y linealizarlos, permitiendo aumentar las probabilidades de la recombinación homóloga en la región deseada. Contiene 2 marcadores para el seguimiento de la inserción flanqueados por una región loxP para eliminarlos. La región attP permite la inserción de un nuevo fragmento a la zona de recombinación anterior mediante el sistema del fago PhiC31. La secuencia UAS-reaper se expresa ante la presencia de Gal4, permitiendo la eliminación de falsos positivos debido a una recombinación al azar (Baena-López et al., 2013).

Este vector contiene secuencias 3' y 5' de P-element para la transformación mediada por P-element. Además, contiene dianas de recombinación para FLP (FRT) y sitios de restricción de I-SceI. Esto permitirá que, una vez integrado el fragmento al azar en el genoma este pueda linealizarse y ganar acceso para poder recombinar en el sitio específico que queremos, gracias a la homología de los brazos que hemos clonado. Estos brazos de homología se deben diseñar para eliminar todos o el mayor exón codificante, para así romper la pauta de lectura y que no genere proteínas aberrantes (Huang et al., 2009). Además, el vector contiene un marcador genético (*mini-White*) que da color rojo a los ojos y un gen reportero (Cherry) para seguir la expresión génica del sitio de inserción. El vector contiene otras secuencias para la inserción de genes exógenos. En este caso, como se muestra en el Figura 7, contiene los sitios loxP entre los dos marcadores para eliminarlos mediante la proteína Cre y la secuencia attP que sirve para la inserción de secuencias medidas por la integrasa del fago PhiC31.

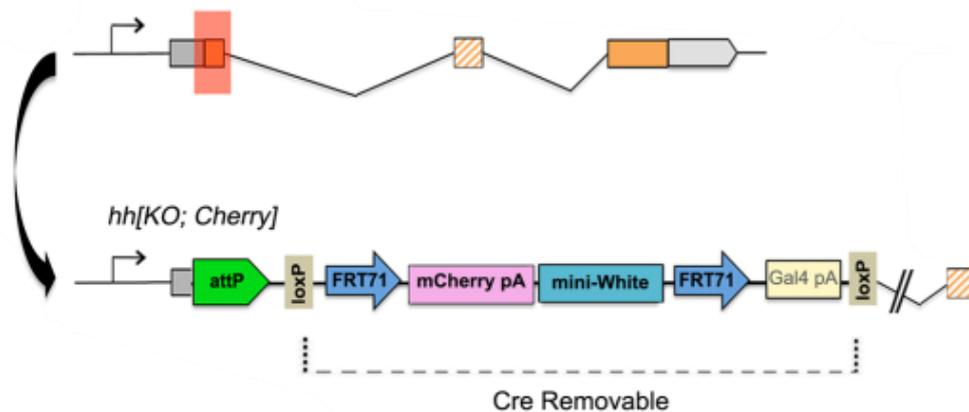


Figura 7. Esquema de la inserción en el exón escogido y secuencias para la eliminación del marcador de selección. En la imagen se muestra cómo se ha insertado la secuencia del plásmido en la parte codificante del primer exón de un gen. Utilizando el sistema de recombinación mediado por Cre se puede eliminar los marcadores (Baena-López et al., 2013).

Otras secuencias que podemos encontrar en el vector son los sitios de recombinación de FLP (FRP) y los sitios de restricción de I-SceI. Al introducir la proteína FLP esta cataliza una recombinación entre los dos sitios FRP, generando un ADN circular. Si se rompe esta cadena circular se activan los mecanismos de reparación por homología y se consigue que la secuencia recombine en el sitio indicado gracias a los brazos de homología que se ha insertado. Para ello

debe introducirse también la enzima de restricción I-SceI. Ambas proteínas transgénicas se consiguen introducir mediante un cruce con cepas *hs-Flp* y *hs-SceI*, como se muestra en la Figura 8.

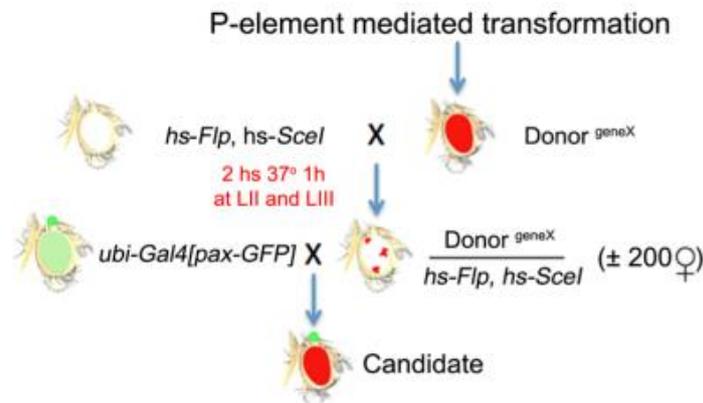


Figura 8. Esquema de los cruces necesarios para la obtención de la mosca knock-out. El primer cruce se realiza por cepas *hs-Flp* y *hs-SceI* para que, mediante un choque térmico, se consiga la linealización del fragmento para que pueda recombinar en las regiones adecuadas. La descendencia será una quimera donde algunas células habrán integrado el fragmento en la zona correspondiente. Para eliminar falsos positivos se cruza con una cepa *ubi-Gal4* para eliminar todas aquellas inserciones que lleven la secuencia del *UAS-reaper*. El segundo cruce necesita de unas 200 hembras para llegar a conseguir una mosca candidata a ser knock-out (Baena-López et al., 2013).

Para mejorar la selección y eliminar falsos positivos de la inserción, el vector contiene la secuencia *UAS-reaper*, que en presencia de *Gal4* expresa el gen *reaper* que es letal para la mosca. Para introducir la proteína *Gal4* se emplean cepas *ubi-Gal4*. Esto elimina falsos positivos que pueden generarse por que se haya insertado toda la secuencia lineal y no la región interna a los brazos de homología.

El esquema a seguir para la realización de un KO por esta técnica se resume en estos pasos:

1. En primer lugar, clonar en el vector los brazos de homología de la región genómica que queremos modificar. Estos fragmentos deben tener un tamaño entre 0,5-2kb y corresponderán a las regiones 5' y 3' de la región que queremos eliminar. Normalmente se suelen elegir secuencias flanqueantes al primer exón codificante para romper la pauta de lectura y no generar proteínas truncadas.
2. Una vez construido el vector con los brazos homólogos, se inyecta en embriones de moscas para que se produzca la recombinación mediada por P-element y se inserte al azar. En este paso no se observan moscas con los ojos rojos, aunque hayan incorporado el inserto, ya que no se incorpora en todas las células por igual, sino que genera una mosca quimérica. Es necesario que se produzca la inserción en células de la línea germinal para que pase a la descendencia.
3. El siguiente paso es cruzar con cepas equilibradoras para encontrar moscas que tengan el inserto en células de la línea germinal y, a la vez, mapear en qué cromosoma se ha insertado el fragmento. Para ello se realizan cruces con cepas que tienen 4 cromosomas

equilibradores, 2 en cada cromosoma, y permiten hacer un seguimiento de la inserción. Se necesitan 2 cruces para determinar su localización, tales como se indican en el Anexo I.

4. Una vez obtenidas moscas con el inserto se cruzan con cepas *hs-Flp*, *hs-Scel* para provocar la recombinación en los brazos homólogos insertados. En este paso ocurre lo mismo que en el paso 2, se genera una quimera donde se espera que la integración haya ocurrido en células de la línea germinal.
5. Para eliminar falsos positivos se cruzan las moscas mosaico con *ubi-Gal4[pax-GFP]*, de manera que la descendencia exprese *UAS-reaper* y produzca la muerte en los falsos positivos. Solo nos quedaremos con las moscas que expresen el gen *mini-White* mostrando ojos rojos.
6. Por último, se cruza con una cepa *hs-Cre* para quitar los marcadores que hay entre las secuencias loxP para tener un KO sin marcador y poder usar marcadores se quiere producir un KI. El KO candidato debe ser confirmado por PCR con cebadores específicos de la región donde se debe insertar y con una PCR cuantitativa para confirmar que la expresión de ese gen es nula.

2. Objetivos

2.Objetivos

Los objetivos de este trabajo consisten en:

- Construcción del vector que permita la generación del modelo *KO* del gen *para* en *D. melanogaster*.
- Obtención de líneas estables del modelo *KO*.
- Optimización de ensayos para la caracterización de moscas con genotipos sensibles a convulsionar.

3. Material y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Biología Molecular

3.1.1. Diseño del plásmido

El plásmido objetivo se construyó a partir del vector pTVcherry (Obtenido del Dr. Baena-López). Los cebadores empleados durante todo el proceso de manipulación genética vienen determinados en el Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores junto a sus características y la técnica donde fueron empleados.

Secuencia del cebador (5'→3')	Tm	Enzima	Dirección	Uso
GCATCCGTAGTCACTGCAACT	58,9 °C	-	Directo	Nested PCR
CAGTTACTGATACAGATACAGAA	49,6 °C	-	Inverso	Nested PCR
AGAGGCTAGCCAGTATTCGGGCAACTGCTG	69,1 °C	KpnI	Directo	PCR Brazo A
AGAGAGGTACCTGTCTATGCGGCCAACGATGA	68,5 °C	NheI	Inverso	PCR Brazo A
AGAGAACTAGTTCCGACTCGATATCTGAGGAAG	62,9 °C	Spe I	Directo	PCR Brazo B
GTGGACATATGCTGTTCTAGT	52,6 °C	Bgl II	Inverso	PCR Brazo B

En la Tabla 3 se muestra las enzimas que utilizaron, sus sitios de corte y su procedencia.

Tabla 3. Enzimas de restricción junto a su secuencia de reconocimiento y procedencia.

Enzima	Sitio de corte	Procedencia
Kpn I	5'-GGTAC C-3' 3'-C CATGG-5'	New England Biolabs
Nhe I	5'-G CTAGC-3' 3'-CGATC G-5'	New England Biolabs
Spe I	5'-A CTAGT-3' 3'-TGATC A-5'	ThermoScientific™, California
Bgl II	5'-A GATCT-3' 3'-TCTAG A-5'	ThermoScientific™, California

Durante todo el proceso de manipulación de ADN se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (ThermoScientific™, California) como reservorio. Esta cepa se caracteriza por tener mutaciones en endonucleasas *endA/recA* que aumentan la estabilidad del plásmido.

Para determinar las secuencias a insertar y las enzimas de restricción necesarias para la construcción del vector se empleó el programa *Seqbuilder* (ADNSTAR, Inc., Madison, Wisconsin).

3.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Para la generación y amplificación de los segmentos génicos extremos al gen que nos interesa se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para los fragmentos necesarios para la clonación con TOPO se empleó el ADN polimerasa "Biotools" (Biotools B & M Labs S.A, Madrid). Para las PCR convencionales se empleó el ADN polimerasa "Phusion High Fidelity" (ThermoFisher, Wilmington) que genera productos más específicos y tiene menor tasa

de error. Las condiciones de la PCR vienen descritas en la Tabla 4 y 5 según el ADN polimerasa utilizada.

Tabla 4. Protocolo para la PCR con el ADN polimerasa "Phusion".

Componentes	Volumen (μ l)
Tampón de mezcla x5	5
10mM desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)	0,5
10 μ M Cebador Directo	0,5
10 μ M Cebador Inverso	0,5
ADN Polimerasa Phusion (2 unidades/ μ l)	0,5
ADN molde	1*
Agua	Hasta 25
Total	25

Tabla 5 Protocolo para la PCR con el ADN polimerasa "Biotools".

Componentes	Volumen (μ l)
Tampón de mezcla x10	2,5
50mM MgCl ₂	1
10mM dNTPs	0,5
10 μ M Cebador Directo	0,5
10 μ M Cebador Inverso	0,5
ADN Polimerasa Biotools (1 unidad/ μ l)	0,5
ADN molde	1*
Agua	Hasta 25
Total	25

*El ADN molde debe estar entre 1 pg hasta 10 ng. Usualmente se emplea 1 μ l dado que la concentración obtenida está dentro de este rango.

Para la amplificación se utilizó un termociclador Veriti (AppliedBiosystems, California) y se usó el programa descrito en la Tabla 6.

Tabla 6. Instrucciones de los ciclos de amplificación.

Pasos	Temp.	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturización inicial	94°C	4 min	1
Desnaturización	94°C	30 min	35
Anillamiento	-	30 min	
Extensión	72°C	-	
Extensión final	4°C	∞	1

La temperatura de anillamiento se varió en función del tamaño del cebador y el tiempo de extensión va en función del tipo de polimerasa utilizada y del fragmento a amplificar. En el caso del ADN polimerasa “Phusion” es de 30 s /kb y en “Biotools” de 60 s /kb.

3.1.3. Clonación en TOPO

Se siguió el protocolo del kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen™, ThermoFisher, Wilmington). Este sistema se basa en una estrategia de clonaje de productos de PCR de forma rápida y eficiente sin la necesidad de utilizar la ligasa. La amplificación de los fragmentos por PCR se debe realizar con la polimerasa Taq para generar en el extremo 3’ una adenina. La reacción consiste en generar la mezcla descrita en la Tabla 7 e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.

Tabla 7. Protocolo de clonación en TOPO.

Reactivo	Volumen (µl)
Producto de PCR	0,5
Solución salina	1
Agua	Completar hasta 5
Vector TOPO	1
Total	6

Tanto el vector TOPO como la solución salina adecuada vienen incorporados con el kit comercial.

3.1.4. Electroforesis

Para la comprobación de los distintos fragmentos de ADN producidos se utilizó una electroforesis sólida en gel de agarosa. El porcentaje de agarosa del gel era del 0,8% y su mantenimiento se realizaba en la estufa a 55°C. Para la tinción del ADN se utilizó Gel Red (Biotium, Fremont, California) en una relación de 15 µl por 100 ml de agarosa. Las muestras fueron cargadas en el gel añadiéndoles el tampón de carga 6x “LoadingDye” (ThermoScientific™, Wilmington). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 100 V durante 20-30 min. Como marcador molecular se empleó Thermo Scientific GeneRuler ADN 1kb (ThermoScientific™, Wilmington).

3.1.5. Extracción de plásmidos en colonias

Para extraer el ADN plasmídico de las colonias utilizamos un kit comercial “GeneJETPlasmid miniprep” (ThermoFisher, Wilmington). La extracción se realiza sobre un cultivo bacteriano previamente crecido en Luria Bertani (LB) con ampicilina durante toda la noche a 37°C. El protocolo de extracción se describe a continuación:

1. Colocar 1 ml de cultivo en dos tubos eppendorf de 1,5ml. Centrifugar durante 90 s a 800 revoluciones por minuto (rpm). Eliminar el sobrenadante.
2. Añadir 300 µl de la solución de resuspensión celular y resuspender el pellet.
3. Añadir 250 µl de la solución de lisis celular y mezclar inmediatamente 4 veces el tubo por agitación.
4. Añadir 350 µl de la solución de neutralización y agitar 4 veces. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min.

5. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a las columnas azules del kit. Evitar tocar el pellet viscoso formado al fondo.
6. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min. Desechar sobrenadante.
7. Añadir 700 µl de la solución de lavado. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min. Eliminar sobrenadante. Realizar este paso 2 veces.
8. Centrifugar el tubo vacío a 13000 rpm durante 1 min para eliminar posibles restos de etanol.
9. Añadir de 20-40 µl de agua a 65°C y centrifugar a 13000 rpm durante 1 min.

Todas las soluciones vienen incluidas en el kit. Al final de la extracción se realizó la cuantificación del ADN mediante el NanoDrop Spectrophotometer ND 1000 (ThermoScientificTM, Wilmington).

3.1.6. Digestión enzimática

Para obtener fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios se utilizaron varias enzimas de restricción en digestiones dobles. Para su digestión se realizó la reacción mostrada en la Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de la digestión con enzimas de restricción.

Reactivos	Volumen (µl)
ADN	10*
Enzima 1	1
Enzima 2	1
Tampón de digestión 10x	2
Agua	Hasta 20
Total	20

**Se calcula el volumen en función de la concentración para obtener del orden de 1-1,5 µg.*

El volumen de ADN utilizado dependerá de la concentración de partida y determinará el volumen total al que llevar la reacción, así como el volumen del tampón de digestión necesario en función del volumen final. El tiempo de incubación es desde 4 h hasta toda la noche, siempre que se compruebe la falta de actividad estrella de las enzimas empleadas. Todo ello a una temperatura de 37°C. El tampón de digestión deberá ser compatible para ambas enzimas para que funcione correctamente la digestión.

3.1.7. Ligación

Se utilizó el ADN ligasa T4 (ThermoScientificTM, Wilmington). Se deben introducir de 20 a 100 ng de vector lineal. En este caso se utilizaron 50 ng. La cantidad de ADN del fragmento está determinada por el tamaño del vector y del propio inserto como se muestra en la ecuación. Además, se pueden aplicar diferentes proporciones de inserto: vector, usando en este caso una relación 3:1.

$$\frac{3}{1} * \frac{\text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} = \frac{\text{peso del inserto (ng)}}{\text{peso del vector (ng)}}$$

Tras calcular las cantidades de inserto y vector necesarias mezcla todo en un tubo junto a una unidad de ligasa y tampón de ligación al 1x y se deja incubar a 22°C durante mínimo 1 h.

3.1.8. Purificación

Para la purificación se empleó el kit comercial “GeneJET PCR Purification” (ThermoScientific™, Wilmington) y se siguió el protocolo descrito a continuación:

- Añadir 1 volumen de tampón de unión igual al volumen de la mezcla de la PCR. Mezclar vigorosamente. Asegurarse de que la mezcla se vuelve de color amarillo.
- Transferir la mezcla a una columna de purificación “GeneJET” y centrifugar 13000 rpm durante 1 min. Descartar el sobrenadante.
- Añadir 700 µl de tampón de lavado y centrifugar a 13000 rpm durante 1 min. Descartar el sobrenadante.
- Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto con el tubo vacío para eliminar restos de etanol. Descartar sobrenadante.
- Colocar la columna sobre un tubo eppendorf de 1,5ml y añadir 50 µl de Agua a 65°C o tampón de elución y centrifugar a 13000 rpm durante 1 min.

Tras cada purificación se cuantificó el ADN usando el NanoDrop Spectrophotometer ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington). Las muestras pueden conservarse a -20°C.

3.1.9. Secuenciación

Para la secuenciación se enviaron las secuencias a un servicio externo (Servicio de genética y genómica transcripcional del Centro de Investigación Príncipe Felipe). En la Tabla 9 se muestran los cebadores empleados para la secuenciación.

Tabla 9. Cebadores para la secuenciación junto a la secuencia que contienen.

Secuencia	Nombre
5'-CTGTTGCCGAGCACCAATTCCG-3'	Cebador Directo Brazo A
5'-TATACGAAGTTATGGTACAC-3'	Cebador Inverso Brazo A
5'-TGTCAGGGAGTGAGTTTCGT-3'	Cebador Directo Brazo B
5'-CTCCGTAGACGAAGCGCCTC-3'	Cebador Inverso Brazo B

Para la secuenciación hay que enviar 3 µl de la muestra de ADN a 200 µg/µl y 2 µl de cada cebador a una concentración de 10 µg/µl. La técnica de secuenciación empleada fue la secuenciación Sanger.

3.1.10. Transformación bacteriana

Se realizó una transformación por choque térmico para introducirles el plásmido de interés. El protocolo de transformación consiste en añadir 2-3 µl de ADN de vector a 70 µl de células competentes e incubar durante 20-30 min en hielo. Posteriormente se les da un choque térmico introduciéndolas en un termobloque a 42°C durante 30 s. Luego se colocan de nuevo en hielo y se añade 300 µl de medio de cultivo LB. Se les deja crecer a temperatura ambiente durante 1 h para después plaquear unos 150µl en una placa de agar con resistencia a antibiótico. En este caso el vector tiene resistencia a ampicilina, por lo que fue el antibiótico utilizado en las placas de cultivo.

3.2. Caracterización de genotipos

3.2.1. Stock

Para los experimentos se usaron diferentes genotipos. En la Tabla 10 se muestra el nombre de la cepa, de donde se obtuvo y su genotipo.

Tabla 10. Tipos de cepas de *D. melanogaster* utilizadas con su origen y genotipo.

Nombre de la cepa	Origen	Genotipo
Control	Bloomington Drosophila Stock Center	OrR (Wild type)
White	Bloomington Drosophila Stock Center	W ¹¹¹⁸
Para	M. A. Tanouye	para ^{bss1}
Eas	M. A. Tanouye	eas ¹
Sda	M. A. Tanouye	sda ^{iso7.8}
Cepa equilibradora	Dept. Zoology, Universidad de Cambridge	w; lf/Cyo; TM6B/MKRS

Las cepas se conservaron a 17,5°C y las moscas utilizadas en los experimentos se mantuvieron a 25°C. Todas ellas fueron almacenadas en tubos transparentes con alimento estándar producido según el Anexo II.

3.2.2. Cruces para mapear el KO

Para tener una línea estable y conocida del genotipo KO se realizaron una serie de cruces con la cepa equilibradora para así determinar en qué cromosoma se ha realizado la inserción del fragmento (Anexo I).

La cepa equilibradora contiene 4 cromosomas equilibradores. Estos cromosomas son marcadores dominantes y letales en homocigosis que presentan un fenotipo conocido y reconocible. Además, en la descendencia se evitan ciertos productos de recombinación en la meiosis. Gracias a estos marcadores se consigue una fácil selección por discriminación de donde se encuentra el gen insertado en función de los marcadores que observemos (Hales et al., 2015).

3.2.3. Ensayo de supervivencia

El ensayo de supervivencia consiste en controlar el tiempo de vida de cada genotipo. Para ello se introducen las moscas de los genotipos control, *para*, *eas* y *sda* en tubos con la alimentación necesaria y se anota el número de fallecimientos por día. En los tubos se introdujeron alrededor de 15-20 moscas y la alimentación fue cambiándose cada 3-4 días. El número total de moscas utilizadas fue entre 60-88.

3.2.4. Ensayo de comportamiento

Se utilizaron moscas de 5 días de vida. Se utiliza un número de moscas entre 5-10 por cada tubo vacío. Después de dormir las moscas con CO² se deja un tiempo de espera de mínimo 2 h para que se recuperen. También es importante dejar un margen de tiempo de unos 15-20 min al traspasarlas al tubo por si se produjese alguna convulsión en el cambio y luego no reaccionaran, debido al “tiempo de refracción”. Se coge cada tubo y se agita vigorosamente en el córtex durante 10 s. Luego se grabaron en video y se contabilizó el número de moscas que sufrieron convulsiones y los segundos que tardaron en recuperarse de las convulsiones.

Cuando la mosca es capaz de ponerse de pie y andar se contabiliza como recuperada. Se emplearon alrededor de 40 moscas en cada ensayo.

3.2.5. Ensayo de geotaxis negativa

El ensayo se modificó a partir del previamente ya descrito (Benzer, 1967). El experimento se basa en que las moscas presentan geotaxis negativa, presentando tendencia a trepar por la superficie de los tubos. En cada ensayo se pasaron 15 moscas de cada genotipo a tubos vacíos sin comida con una marca a 8 cm desde la base del tubo. Tras esto se golpeaban los tubos contra la superficie para forzar que todas las moscas partieran desde la base del tubo y se contabilizó cuántas moscas eran capaces de pasar la marca del tubo en un intervalo de 15s. Los experimentos fueron grabados y se produjeron 5 repeticiones por cada condición y genotipo, dejando un margen de 5min entre ellas. Las condiciones que se estudiaron fueron a los 10, 20 y 30 días de vida. Se emplearon unas 20 de media moscas por ensayo

3.2.6. Ensayo de capacidad de vuelo

El ensayo de capacidad de vuelo es similar al descrito en otros estudios (Benzer, 1973). Consiste en cuantificar la capacidad de volar de las moscas. Se durmieron las moscas con CO² y se colocaron individualmente en placas Petri vacías. Se les dejó reposar durante 20-30 min para que se recuperasen de la anestesia. Utilizando un matraz de 47,7cm de altura, se colocaron las moscas encima y fueron golpeadas para que se despegaran de la placa. Se contabilizó la distancia respecto a la altura del tubo donde se depositaban al volar. Este ensayo se realizó a los 10 días de vida para los genotipos a estudiar. Se emplearon 30 moscas de media para cada ensayo.

3.2.7. Análisis de datos

Para las representaciones gráficas y los análisis estadísticos empleados se utilizó el programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc, California) y el Excel (Microsoft, Albuquerque). En el ensayo de geotaxis negativa y capacidad de vuelo se realizó un análisis ANOVA en conjunto y Bonferroni para la comparación entre pares de columnas. Para los datos sin una distribución normal se aplicó el test Kruskal-Wallis ANOVA. El análisis de t-student de dos colas se llevó a cabo para ver diferencias en el tiempo de recuperación entre distintos sexos o distintos genotipos en los casos con igual varianza. Cuando las varianzas no eran iguales se aplicó Mann Whitney test. Para los experimentos de supervivencia se utilizó el método Mantel-Cox. Para conocer si las distribuciones eran normales se aplicó el test Kolmogorov-Smirnov con el P-value Dallal-Wilkinson-Lilliefor. La significancia estadística de todos los análisis se midió con el parámetro P-value, tomando como referencia el valor de alfa 0,05 (95% de intervalo de confianza) para determinar su significación estadística.

4.Resultados

4. Resultados

4.1. Construcción del vector

Como se ha comentado anteriormente, nuestro primer objetivo se centra en la generación de un modelo KO del gen *para* en *D. melanogaster* utilizando la técnica de la recombinación homóloga dirigida o “*gene targeting*”. Para ello, se empleó el plásmido pTVcherry cedido amablemente por el Dr. Baena (Universidad de Cambridge, Reino Unido), un plásmido construido específicamente para generar deleciones o inserciones dirigidas (Baena-López et al., 2013). Para generar el KO hay que interrumpir la estructura del gen, en especial las secuencias con regiones codificantes, para asegurarse que no se transcriba. En este caso, se eligió como zona para la recombinación las secuencias flanqueantes al codón de inicio de la región codificante. Estas secuencias deben tener un tamaño aproximado de 0,5 a 1kb para que funcione la recombinación homóloga.

Lo primero que se realizó fue determinar los fragmentos que se iban a clonar en el plásmido pTVcherry. Para ello, se descargaron de las bases de datos pública “Drosophila Genomics Resource Center” (DGRC) y “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) la secuencia del vector (<https://dgrc.bio.indiana.edu/product/View?product=1338>) y la secuencia del gen *para* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/32619>), respectivamente.

Con la ayuda del programa *Seqbuilder* se hizo el diseño experimental *in silico*. En la Figura 9 se puede ver cómo se seleccionaron las secuencias flanqueantes al codón de inicio ATG (marcado con un recuadro rojo) del tamaño adecuado para la recombinación homóloga, entre 0,5-1kb. En este caso, los fragmentos a insertar fueron de un tamaño de 800pb el brazo A y 1000pb el brazo B.

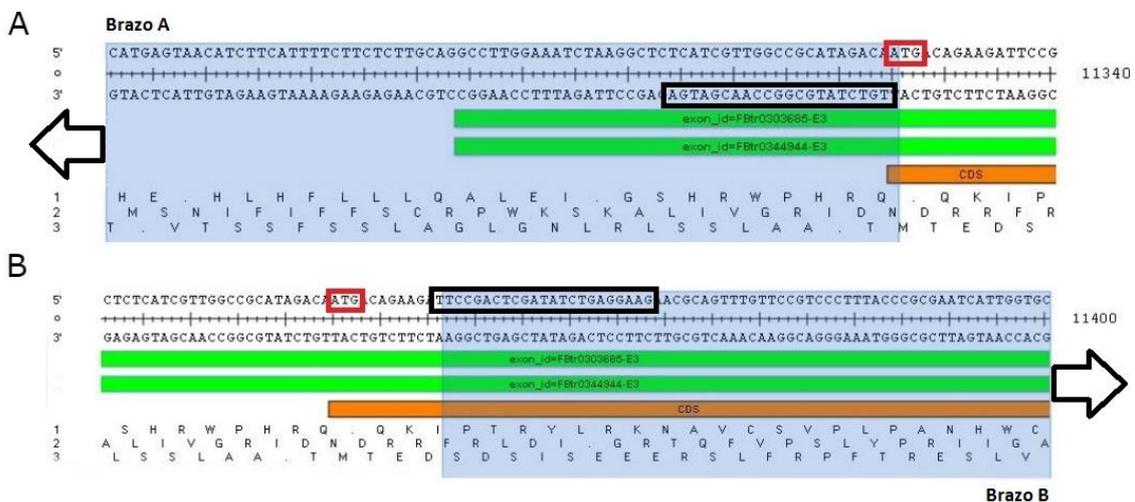


Figura 9. Esquema de la zona seleccionada para la recombinación homóloga. En la Figura A se observa parte de la secuencia del brazo A, finalizando justo antes del codón ATG de inicio. En la Figura B se observa la secuencia del principio del brazo B. La secuencia de los cebadores, 5' en el caso del brazo A y 3' en el caso del brazo B, están marcados por un recuadro negro.

Debido a que los brazos deben flanquear la secuencia ATG, los cebadores que correspondían a esta zona estaban restringidos y no se podía buscar sitios de corte naturales. Por lo tanto, se crearon cebadores con adaptadores, tanto para el cebador inverso del brazo A como en el cebador directo del brazo B, que incorporarían los sitios de corte al fragmento genómico

amplificado. En la Figura 9 se pueden observar las secuencias de estos cebadores, marcados con un recuadro negro, a las que se les añadió los sitios de corte artificial.

Para seleccionar los otros extremos de los brazos se buscaron sitios de corte naturales presentes en la secuencia que estuvieran a una distancia menor de 1kb respecto a los otros extremos. Esto solo fue posible en el brazo B, debido a que en el brazo A se intentó utilizar un sitio natural pero generó muchos problemas en la clonación, teniendo que repetir el proceso creando un sitio de corte artificial en el cebador. Una vez escogidas las secuencias de los brazos se insertó cada brazo consecutivamente en el vector. Se utilizaron las mismas técnicas y métodos explicados a continuación, salvo algunas excepciones indicadas debidas a la propia naturaleza del fragmento a clonar.

El plásmido pTVcherry fue enviado por el Dr. Baena y se transformó en la cepa DH5 α para su mantenimiento y como reservorio. Mediante un kit de extracción de plásmidos se extrajeron grandes cantidades del plásmido y se cuantificaron antes de trabajar con él.

Para obtener los fragmentos se realizó una PCR convencional usando como molde ADN genómico extraído de hembras del genotipo White-(w-), la cepa salvaje de *D. melanogaster* que se utilizará para la generación del KO. Para determinar si los productos de PCR coincidían con el tamaño esperado se realizó una electroforesis en gel. En la Figura 10 se puede observar como las bandas corresponden al tamaño de fragmento esperado en cada caso. En el caso del brazo A, la PCR convencional generaba problemas de inespecificidad y generaba varios fragmentos de distintos tamaños. Para solucionarlo se generó una PCR anidada, donde se clonó un fragmento de mayor tamaño, que incluyese la región del brazo A, en el vector TOPO. Este vector comercial se escogió debido a que permite una clonación fácil, rápida y altamente eficiente sin necesidad de enzimas de restricción o ligasas. Una vez clonado en el vector, se utilizó este vector como molde para la PCR convencional para obtener el brazo A, utilizando el procedimiento anteriormente descrito. Al final de cada proceso se purificó y se cuantificó la cantidad de fragmento de cada brazo.

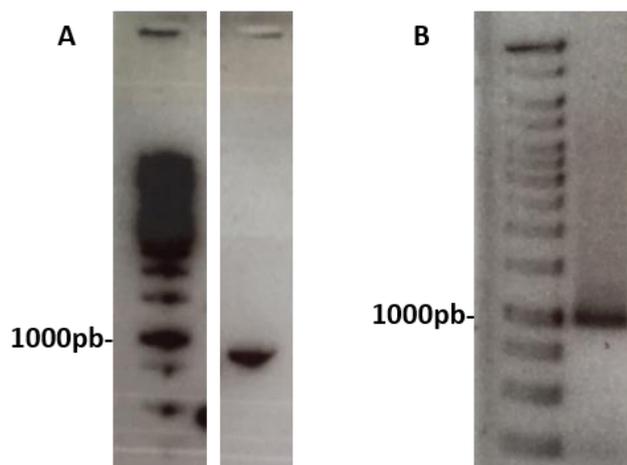


Figura 10. Geles de comprobación de la PCR. En la Figura A se observan dos carriles, el primer carril con el marcador molecular y segundo con el producto de PCR para obtener el brazo A, donde se observa una banda de 800pb. En la Figura B se observan dos carriles, el primero con el marcador molecular y el segundo el producto de PCR para obtener el brazo B, con una banda a la altura de 1000pb.

Una vez obtenidos los fragmentos y el vector, se realizó una digestión doble tanto en el producto de PCR como en el vector pTVcherry para después hacer una ligación. Para la clonación del brazo A se emplearon las enzimas de restricción NheI y KpnI y para la clonación

del brazo B, las enzimas *SpeI* y *BglIII*. Se comprobó si el vector se había abierto mediante una electroforesis en gel, esperando una única banda del tamaño esperado para demostrar que las enzimas habían cortado correctamente. De este modo se buscaba evitar falsos positivos en la transformación debidos a que la cepa DH5 α incorpore el vector sin digerir y no con la construcción.

Una vez digeridos el fragmento y el vector se purificó para eliminar las enzimas y se procedió a realizar la ligación entre ambos. Tras la purificación se cuantificó para poder realizar los cálculos y poner una relación 3:1 de fragmentos:vector en la ligación. Como ambos han sido digeridos con enzimas de restricción, que producen extremos cohesivos, al añadirlos al mismo tubo, y en condiciones específicas de temperatura, pueden hibridar sus extremos complementarios y juntarse. Añadiendo la ligasa se consiguió que los extremos se unan de forma estable y conseguimos obtener un nuevo vector con el fragmento deseado incorporado.

El siguiente paso es introducir este vector en una cepa de *E. coli* para aumentar su número de copias y tener un reservorio. Para ello se realizó una transformación por choque térmico en células DH5 α . Las bacterias que capten el plásmido conseguirán resistencia a ampicilina, debido a que el marcador de selección del plásmido pTVcherry es ese gen, por lo que cultivando estas bacterias en placas de agar con ampicilina se consiguió aislar las cepas transformantes.

Para descartar falsos positivos y ver qué colonias habían incorporado o no el fragmento se realizó una primera comprobación mediante digestión y electroforesis. Como se observa en la Figura 11 al digerir los plásmidos extraídos de las colonias positivas aparecen dos bandas, una correspondiente al vector abierto, de 13kb, y la otra al fragmento insertado de interés, siendo de 800pb en el caso del brazo A y de 1kb en el caso del brazo B.

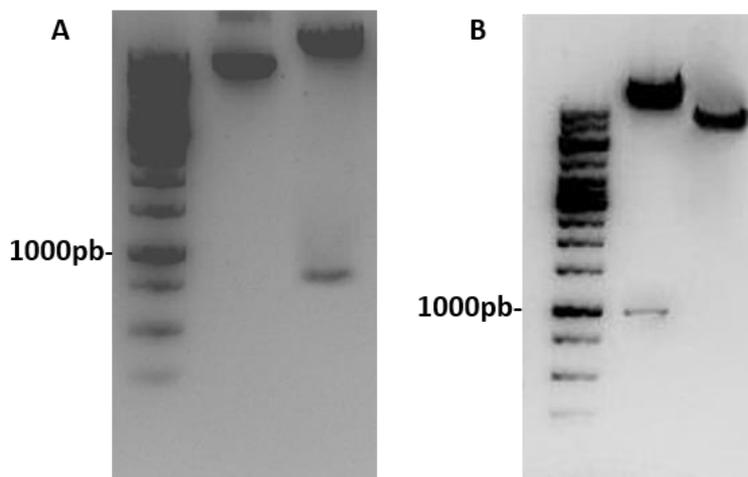


Figura 11. Gel de comprobación de la inserción del fragmento en el vector pTVcherry. En la Figura A se observan 3 carriles. El primero corresponde al marcador molecular; el segundo es un control de plásmido sin digerir purificado de la bacteria transformante; el tercero corresponde con el plásmido digerido con *NheI* y *KpnI*, donde se observan 2 bandas. La banda por encima del marcador corresponde con el plásmido digerido, de 13kb. La banda a la altura de 800pb corresponde al brazo A liberado. En la Figura B se observan 3 carriles: el primero corresponde al marcador molecular, el segundo corresponde al plásmido digerido con *SpeI* y *BglIII*, y el tercero al plásmido sin digerir. En el segundo carril se ven 2 bandas, una de 13kb correspondiente al vector digerido y otra a la altura de 1kb que corresponde a la liberación del brazo B.

Luego se realizó una segunda comprobación mediante secuenciación del fragmento utilizando cebadores que hibridan en regiones del vector flanqueantes a la zona de inserción del

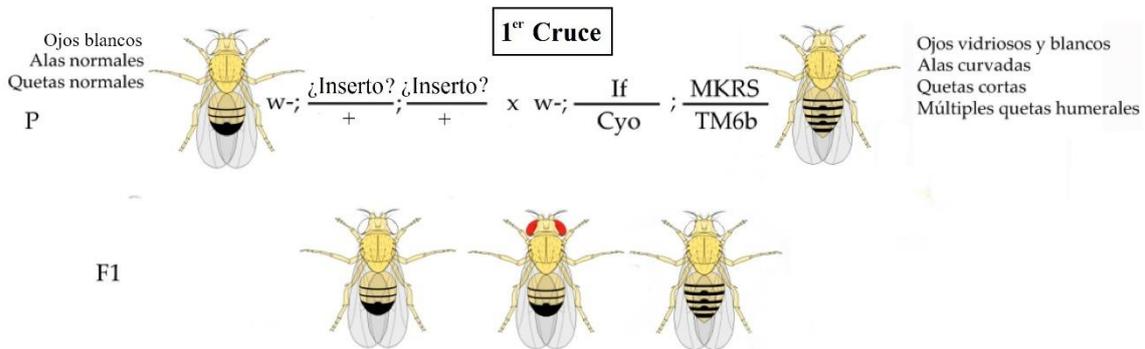
fragmento. La secuenciación se encargó al Servicio de Genética y Genómica Transcripcional del CIPF. (<http://www.cipf.es/web/portada/genomica-y-genetica-traslacional>). En nuestro caso no importa si se ha generado alguna mutación puntual en el fragmento porque lo importante es que mantenga una gran homología de secuencia con las regiones flanqueantes del gen *para* donde debe producir la recombinación homóloga.

Una vez se insertaron ambos brazos en el vector y se comprobó su correcta inserción en el vector, se procedió a inyectar el vector en embriones de moscas. Este proceso fue realizado por un servicio externo, el Servicio de Inyección CBM (<http://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/index.php/es/servicios/servicios-cientificos/servicio-de-transgenesis-de-drosophila?id=1529>).

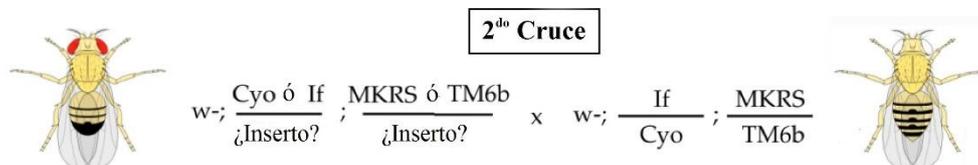
4.2. Mapeo del gen

Una vez realizada la inyección en los embriones, se procedió al crecimiento de los mismos y a su cruce con la cepa equilibradora. En la Figura 12 se puede observar un esquema general de los cruces que se realizaron para el mapeo del inserto. Los cruces en detalle se encuentran en el Anexo I.

-Las moscas inyectadas no tienen el inserto en todas sus células, sino que son una quimera.



-Las moscas rojas llevarán el inserto al azar en el genoma.



- F2
- Si la inserción está en el cromosoma II: Las moscas con ojos rojos solo tienen uno de los 2 marcadores de este cromosoma (If y Cyo), en cambio las moscas con ojos blancos muestran los 2 a la vez.
 - Si la inserción está en el cromosoma III: Las moscas con ojos rojos solo tienen uno de los 2 marcadores de este cromosoma (MKRS y TM6b), en cambio las moscas con ojos blancos muestran los 2 a la vez.

Figura 12. Esquema de los cruces realizados para el mapeo de la inserción. Los puntos y comas separan los cromosomas los diferentes I, II y III. Las siglas If, Cyo, MKRS y TM6b hacen referencia a los cromosomas equilibradores que sirven para seguir y mapear la inserción. En el primer cruce, la mosca inyectada tendrá el inserto en uno de los cromosomas. Al cruzarlo por la cepa equilibradora seleccionaremos solo las moscas con ojos rojos, que indicarán que tienen el inserto. Luego, se realiza un segundo cruce con la cepa equilibradora para determinar en qué cromosoma está, si en el II o el III, según los marcadores que aparezcan en la descendencia. Los cruces detallados se encuentran en el Anexo I. Imagen modificada. Fuente: Tesis doctoral del Dr. Víctor López del Amo.

De los embriones inyectados, 68 llegaron al estado de pupa, pero solo 56 nacieron. Del total de moscas nacidas se obtuvieron 21 hembras y 35 machos. En el primer cruce se puso a cada hembra de la cepa inyectada con tres machos de la cepa equilibradora y a cada macho de la cepa inyectada con 3 hembras de la cepa equilibradora. Del primer cruce se hizo un pase a otro tubo, generando 2 replicados para así tener más descendencia. Las hembras y machos se recolectaron en estado de pupa para garantizar que fueran vírgenes y controlar la segregación de los apareamientos. De todas las moscas que se cruzaron, 4 machos fueron estériles.

Se contabilizaron alrededor de 3000 moscas donde se obtuvieron 2 moscas machos que mostraban los ojos rojos, indicando que habían integrado el fragmento inyectado. El siguiente paso fue volver a cruzar estas 2 moscas por la cepa equilibradora para poder determinar en qué cromosoma se había insertado. El segundo cruce se realizó con el mismo procedimiento anterior, tal y como se observa en el Figura 12. En la descendencia del primer macho se obtuvieron moscas con los ojos rojos y otras con los ojos blancos. Las moscas con el fenotipo ojos rojos tenían uno de los dos cromosomas equilibradores del cromosoma II, o bien *Cyo* o *If*. En cambio, la descendencia de ojos blancos presentaba ambos equilibradores del cromosoma II a la vez, demostrando que el fragmento se insertó en el cromosoma II. En el caso de la segunda mosca ocurrió lo contrario, la descendencia con ojos rojos tenía uno de los cromosomas equilibradores del cromosoma III, o bien *TM6B* o *MKRF*, y la descendencia de ojos blancos tenían ambos cromosomas equilibradores, lo que indica que la inserción se produjo en el cromosoma III.

La generación de un modelo KO es un trabajo largo de varios meses. En este trabajo se ha conseguido llegar hasta los primeros pasos para la obtención de una cepa KO en el gen *para*. Una vez superada la fase molecular y rastreado la localización de la inserción, el siguiente paso es cruzar por moscas *hs-Flp* y *hs-Scel* para generar linealizar el inserto y generar la recombinación homóloga para obtener definitivamente el KO. También hay un cruce posterior por cepas *ubi-Gal4* para eliminar falsos positivos por inserciones al azar no deseadas. Estos siguientes pasos no se recogen en el trabajo debido a que la generación del KO sigue, a fecha de hoy, en proceso.

4.3 Optimización de ensayos de caracterización

Tras explicar el proceso de generación del KO se procede a mostrar los ensayos realizados para la caracterización de moscas BS. Estas moscas muestran fenotipos de estado epiléptico con diferentes genotipos y son empleadas en el estudio de enfermedades relacionadas con las convulsiones, como es en el caso del SD. En este trabajo se emplearon 3 cepas BS: *para*^{*bss1*}, *eas*¹, y *sda*^{*ISO7.8*}. En este apartado serán nombradas como los genotipos *para*, *eas* y *sda* respectivamente. Con estas cepas se realizaron diferentes ensayos: supervivencia, comportamiento, y análisis de la actividad locomotora (geotaxis negativa y capacidad de vuelo). El objetivo de estos ensayos es conocer el comportamiento de los genotipos BS y familiarizarse con ellos para controlar mejor la metodología de los ensayos y poder optimizarlos al aplicarlos posteriormente a la cepa KO que se está generando.

4.3.1 Ensayo de supervivencia

Los genes que causan el fenotipo BS son distintos y tienen implicaciones a nivel del metabolismo muy diferentes. El gen *para* codifica para un canal de sodio importante en la transmisión del impulso eléctrico en el sistema nervioso. En cambio, el gen *eas* codifica para una etanolamina kinasa, que interviene en la ruta de la síntesis de fosfatidiletanolamina (Pavlidis et al., 1994). El gen *sda* codifica la aminopeptidasa N y se expresa en el sistema nervioso central en ciertos estados del desarrollo (Zhang et al., 2002). Como se puede apreciar, estos genes realizan funciones muy distintas, por lo que su efecto en la vida media de *D. melanogaster* puede ser distinto. En este ensayo se pretende observar cómo afectan las mutaciones en estos genes a la vida media de *D. melanogaster* y si la variación es significativamente distinta con respecto a la cepa control. En la Figura 13 se observan las diferentes curvas de los fenotipos estudiados.

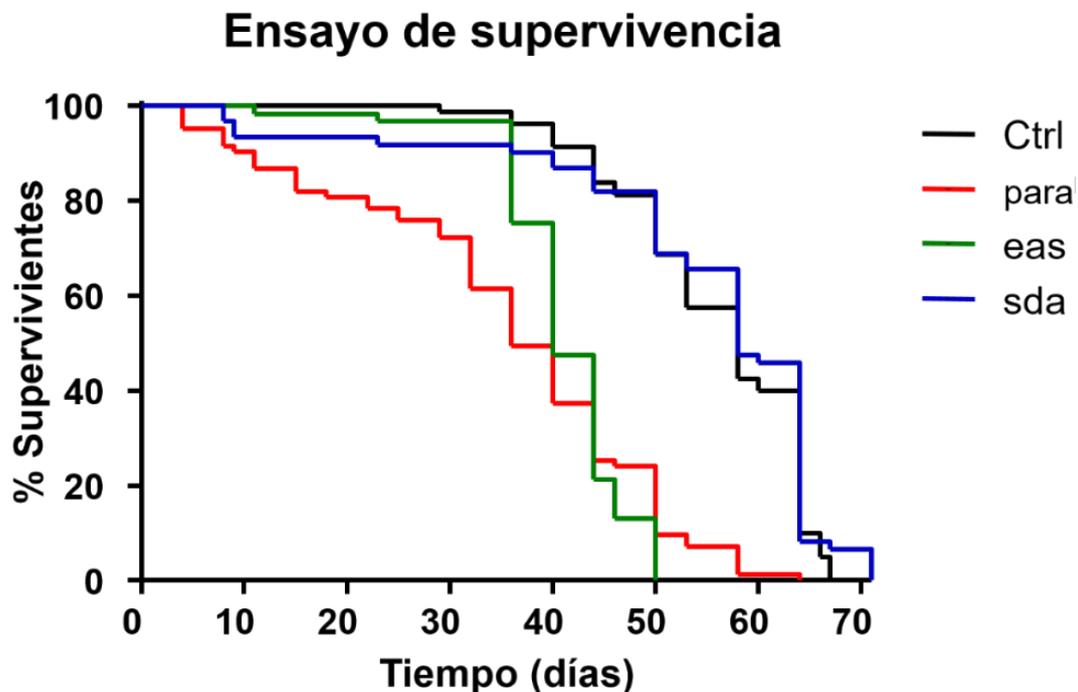


Figura 13. Representación del porcentaje de moscas vivas en función del tiempo de vida para los 4 genotipos estudiados: Control, *para*, *eas* y *sda*. Las moscas fueron mantenidas en grupos de 15. Los datos corresponden al porcentaje de moscas vivas total. El número de moscas de cada genotipo es de 80 para el control y *para* y de 60 para *eas* y *sda*. La vida media del control y *sda* fue de 58 días, 36 días para el *para* y 40 días para el *eas*. Las curvas muestran diferencias significativas aplicando el test Mantel-Cox, con un P-value < 0,001.

En todos los genotipos se puede observar como la población de moscas se mantiene constante hasta los 30-40 días de vida, a excepción del genotipo *para* que está afectado desde los primeros días. A partir de esa edad comienzan a aumentar su mortalidad hasta llegar a su vida máxima. El control y el genotipo *sda* llegan a 70 días de vida máxima. En cambio, el genotipo *para* alcanza los 63 días de vida y el genotipo *eas* hasta los 50 días, siendo el que menor esperanza de vida tiene. La vida media del control y del genotipo *sda* es de 58 días, del genotipo *para* es de 36 días y del genotipo *eas* es de 40 días.

El genotipo *para* es el más destacado ya que la mortalidad sigue una tendencia casi lineal desde los primeros días de vida, siendo una tendencia continua que contrasta con el control, que se mantiene constante hasta los 30 días de vida. Aun así, la vida máxima es muy similar a la del control, siendo solamente 10 días menor a la máxima del control. Al realizar el Test Mantel-Cox se obtuvo un P-value<0,0001, demostrando que son curvas significativamente distintas.

Al comparar el genotipo *eas* con el control, también observamos una diferencia estadística significativa (P-value<0,0001) frente al control. El genotipo *eas*, aunque en los primeros días de vida se mantiene constante como el control, comienza a descender mucho más rápido a partir de los 30 días de vida y el 100% de la población muere 20 días antes que el control.

En el caso de las curvas de supervivencia del control y el genotipo *sda* no parece haber diferencias entre ellas. Al realizar el test Mantel-Cox se obtuvo un P-value de 0,292, determinando que no había diferencias significativas entre los genotipos.

4.3.2 Ensayo de comportamiento

Al estar estudiando cepas BS, donde la característica común entre ellas es el estado de epilepsia, un ensayo muy común para caracterizarlas es un ensayo de comportamiento (Pavlidis et al., 1994; Zhang et al., 2002; Parker, et al., 2011). El ensayo consiste en contabilizar el porcentaje de moscas que sufren convulsiones tras un estrés mecánico y la duración de estado epiléptico de las moscas que lo sufran. Con este ensayo se pretende medir como afectan sus mutaciones a propiciar las convulsiones.

En la Figura 14 se observa el porcentaje de moscas que sufre convulsiones en cada genotipo.

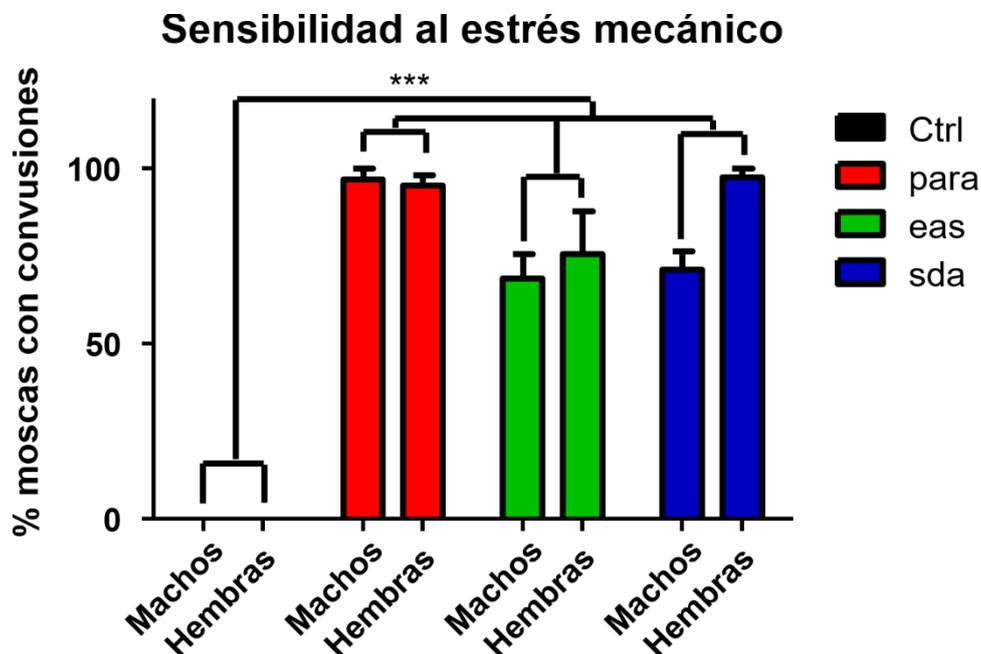


Figura 14. Representación del porcentaje de moscas que convulsionan en función de genotipo y género. Las moscas se mantuvieron en grupos de 10. Cada tubo fue agitado mecánicamente durante 10 s y luego se contabilizó el número de moscas que presentaba convulsiones. El número de moscas contabilizadas por cada genotipo fue de ~40. Los datos representan el porcentaje medio de cada tubo junto a su error estándar. En análisis de varianza de dos vías (ANOVA two-ways) mostró la diferencia significativa respecto al control (P-value<0.001).

Como se puede observar, las diferencias entre los genotipos BS y el control son altamente significativas. Ninguna de las moscas control sufrió convulsiones. En cambio, se observa que los genotipos BS tiene sensibilidad a convulsionar. El genotipo *para* es el que mayor porcentaje tiene de moscas que sufren convulsiones, siendo muy cercano al 100% de la población muestreada. En cambio, se observa como el genotipo *eas* tiene un impacto en las convulsiones medio de 72,35%, sufriendo convulsiones 3 de cada 4 moscas analizadas. En cuanto al genotipo *sda* se observa un porcentaje cercano al 100% en las hembras y un porcentaje del 70% en los machos. En los otros genotipos, la diferencia entre géneros dentro de un mismo genotipo no presenta una diferencia significativa. El análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores demostró que había diferencias significativas frente al control (P-value<0,001).

Seguidamente se analiza el tiempo de recuperación, es decir, cuánto tardan las moscas que sufrieron convulsiones en recuperarse, pudiendo volver a caminar dentro del tubo. En la Figura 15 observamos la distribución de los diferentes tiempos de recuperación en función de genotipo y género.

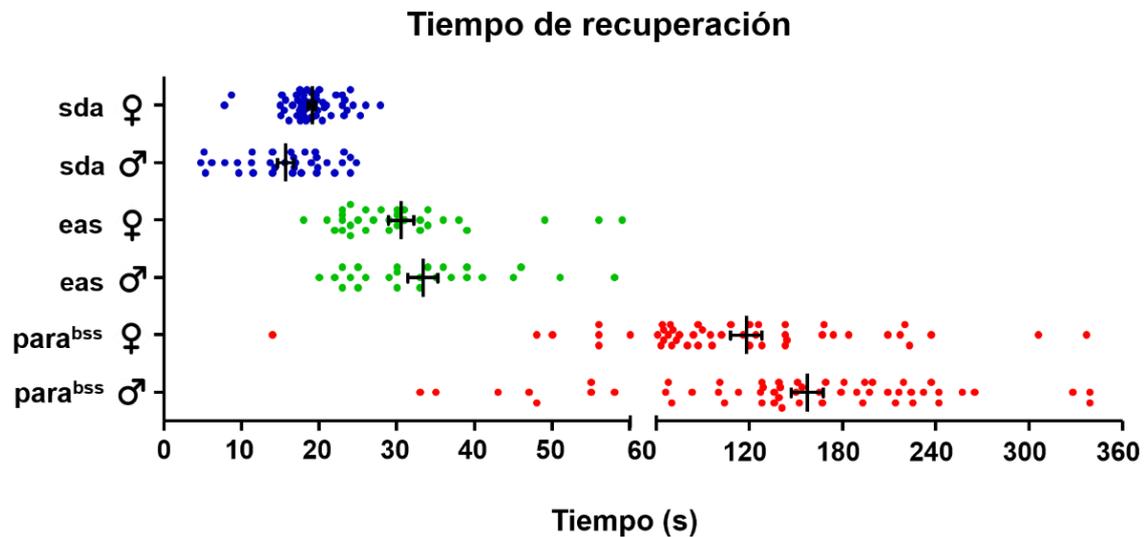


Figura 15. Representación de la distribución poblacional de los diferentes tiempos de recuperación en función del genotipo y el género. Las moscas se agruparon en tubos de 10. Se midió el tiempo que tardaban en volver a ponerse de pie tras un choque mecánico de 10 s. El número de moscas de cada ensayo es de ~40. Los datos muestran la distribución poblacional del tiempo de recuperación de cada genotipo. Para comparar todos los genotipos se realizó un ANOVA de un factor, mostrando diferencias significativas (P-value<0.001). Para comparar entre géneros se realizó un test t-student para los datos que cumplían una distribución normal. Los genotipos para y sda mostraron diferencias significativas entre sexos (P-value<0.01) pero el genotipo eas no (P-value>0.2).

Como se puede observar, la distribución muestral es muy diversa. El genotipo *eas* abarca un rango entre 20 s y 50 s, el genotipo *sda* tiene todavía un rango menor, desde 5 s hasta 28 s. Estos rangos son mucho más pequeños comparados con el del genotipo *para*, que abarca desde los 14 s hasta los 339 s, cerca de los 6 min. Esto es debido a que el genotipo *para* tiene una fase más dentro de sus convulsiones, la fase tónico-clónica (Parker, et al., 2011) que le genera una nueva convulsión seguida de otra parálisis antes de generar la convulsión de recuperación final. La media de tiempo que tardan en recuperarse es de 123 s para el genotipo *para*, de 31 s para el genotipo *eas* y de 17,75 s para el genotipo *sda*. El genotipo más agravado es el *para*, sacando una diferencia de unos 100 s con respecto al menos perjudicado, el genotipo *sda*. El análisis ANOVA de un factor mostró una diferencia significativa entre todos los genotipos (P-value<0,001).

A continuación, se procede a analizar cada genotipo por separado para determinar si hay diferencias entre género, ya que algunos de los genes estudiados (*para* y *eas*), están sobre el cromosoma sexual de *D. melanogaster* y podría influir.

En el caso del genotipo *para*, podemos ver como hay una desviación en la media de ambos géneros, dando lugar a un menor tiempo de convulsión en las moscas hembras que en los machos. El F test dio un P-value de 0,442, indicando que las varianzas no son diferentes significativamente. Haciendo un análisis estadístico t-student se obtuvo un P-value de 0,0077, siendo, por lo tanto, significativamente distintas. Los tiempos medios de cada tienen una diferencia de 30 s.

En el caso del genotipo *eas* no se observa una gran diferencia entre sexos. La diferencia en los tiempos medios es de 4 s. El P-value en el t-student de dos colas fue de 0,2756 y en el F test de 0,9168, por lo que las medias y las varianzas de ambos no son significativamente diferentes.

Sin embargo, para el genotipo *sda* se encontraron diferencias respecto a la media y respecto a su varianza. Para la varianza, en el F test ocurrió algo similar, se obtuvo un valor de 0,0013, mostrando diferencias entre varianzas significativas. En el caso de la media, el Mann Whitney test generó un P-value de 0,007, siendo significativa la diferencia. La diferencia en los tiempos medios de machos y hembras es de 4 s. En la gráfica podemos observar cómo en el caso de las hembras se concentran mucho más los puntos sobre la media. En cambio, en los machos, la distribución es mucho más homogénea a lo largo de todo el rango, pudiendo generar esta diferencia significativa estadísticamente.

De todos los genotipos analizados, el genotipo *para* es el que mayor tiempo de recuperación necesita, tardando varios minutos de media, y hay una diferencia entre sexos, necesitando las hembras menos tiempo. En cambio, el genotipo *eas* y *sda* no alcanzan los 60 s y solo se ha visto diferencia entre los sexos del genotipo *sda*.

4.3.3 Ensayo de geotaxis negativa

Un fenómeno particular que presentan las moscas es la geotaxis negativa: una tendencia a escalar por las paredes del tubo en sentido ascendente cuando se les hace caer a la base del tubo con un pequeño golpe. Este ensayo se ha empleado en diferentes estudios para caracterizar cepas de *D. melanogaster* en modelos de neurodegeneración (Barone et al., 2013; M'Angale et al. 2016). Con este ensayo se quiere estudiar cómo afectan las mutaciones causantes de fenotipos BS a la locomoción de las moscas en su escalada. Tras pasar por un estado epiléptico, las moscas BS ya recuperadas tienen ciertos espasmos caracterizados por aleteo espontáneo o agitación de una pata trasera. Por ello, estos ensayos se llevaron a cabo con especial cuidado de no generar un estrés mecánico que activara el estado de epilepsia y pudiera influir en los resultados.

En la Figura 16 se representa el porcentaje de moscas que escalan en función de su genotipo a 3 edades distintas: 10, 20 y 30 días.

Geotaxis negativa

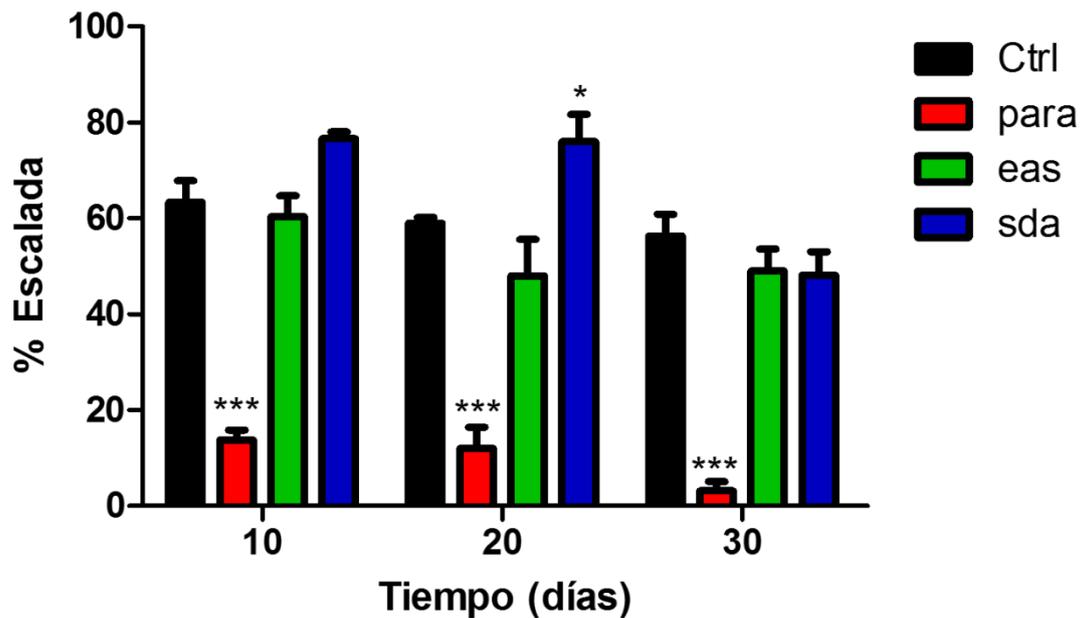


Figura 16. Representación del porcentaje de escalada en función del tiempo para los diferentes genotipos estudiados: control, para, eas y sda. Se agruparon las moscas en tubos de 10. Se colocaron en tubos vacíos y se midió la cantidad de moscas que era capaz de subir 8cm en 15 s tras recibir un golpe. El ensayo se realizó a los 10, 20 y 30 días. El número total de moscas por cada ensayo es de ~20. Los datos representados son el porcentaje medio de moscas que consiguieron escalar junto al error estándar. Se realizó un análisis ANOVA de dos factores para medir diferencias significativas. El genotipo para mostró en todos los días diferencias significativas respecto al control (P-value<0,001). El genotipo sda mostro diferencias significativas a los 20 días, pero de baja significancia (P-value<0,05).

A los 10 días de vida se observa que el porcentaje medio de escalada en el control y el genotipo *eas* son similares, cerca del 65%, y el del genotipo *sda* superior, sin ser significativo, de 76%. En cambio, en el genotipo *para* la media está en 11%, muy inferior al resto. Tras un análisis ANOVA de dos factores se determinó que el genotipo *para* era distinto estadísticamente respecto al control (P-value<0,001) pero los otros dos genotipos no (P-value>0,05). A los 20 días se produce una disminución ligera de estos porcentajes medios en todos los genotipos, fruto del envejecimiento. En el genotipo *eas* se observa una disminución más acusada, un 12% menos, con respecto los demás genotipos, que tiene una disminución no superior al 5%. El genotipo *para* mantiene su diferencia significativa (P-value<0,001) y genotipo *sda* llega a ser significativamente distinto del control a los 20 días (P<0.05). A los 30 días los genotipos vuelven a mostrar una disminución debida a la edad. En este caso el genotipo *sda* es quien tiene la mayor disminución, casi de un 30%, llegando al nivel del control. En este caso, solo el genotipo *para* muestra diferencia significativas respecto al control (P-value<0.001).

En resumen, las moscas *para* presentan una menor capacidad locomotora muy destacada respecto al control. Por lo que se refiere al genotipo *eas*, solo se detectó una disminución más pronunciada a los 20 días. El genotipo *sda* no presentó ningún defecto de escalada hasta los 30 días y presentó una mayor capacidad de escalar el tubo a los 20 días respecto las moscas control.

4.3.4 Ensayo de vuelo

Otro ensayo utilizado para la caracterización de la actividad locomotora de las moscas, es cuantificar su capacidad de estabilizar el vuelo. Este tipo de ensayo se ha utilizado en la

caracterización en estudios de neurodegeneración (Pesah et al. ,2004; Zhu et al., 2015). El ensayo consiste en precipitar las moscas desde lo alto de un tubo, de 47,7cm y 8cm de diámetro, y observar cuántos centímetros caen hasta estabilizar el vuelo. A más centímetros significa que las moscas tienen una menor capacidad de estabilizar el vuelo.

En la Figura 17 se representa el porcentaje de moscas que no vuelan y el número de moscas que vuelan frente a los centímetros de distancia que cayeron hasta controlar el vuelo y reposar en las paredes.

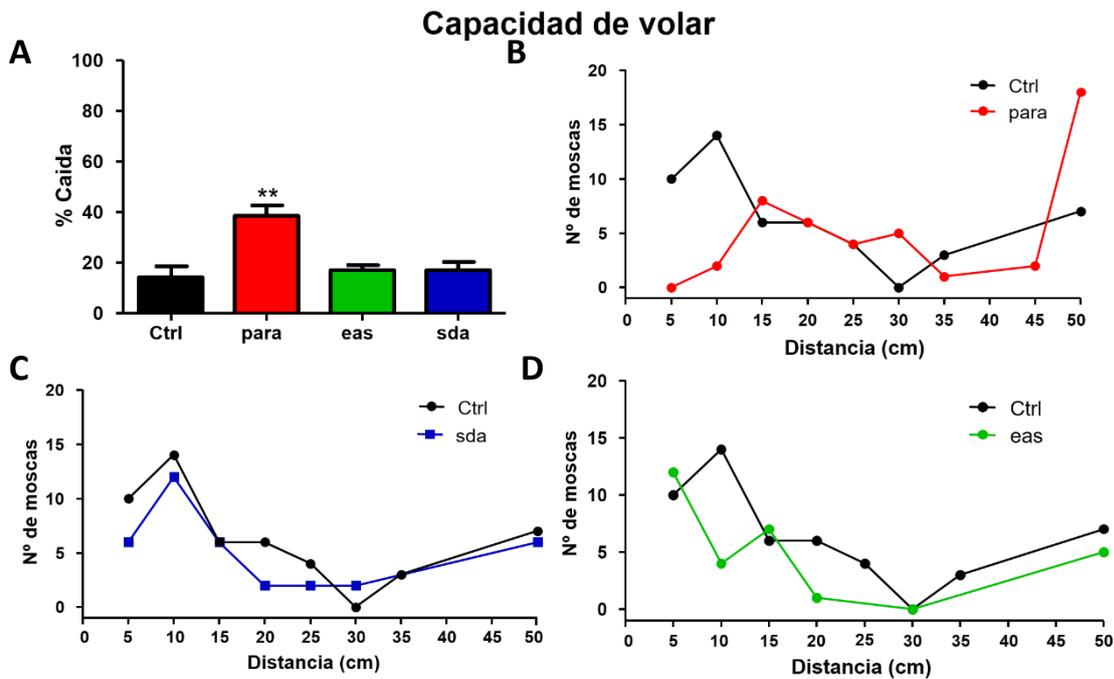


Figura 17. Representación de la capacidad de volar en cada genotipo. En la Figura A se representa la distancia media recorrida por cada genotipo antes de volar en porcentaje sobre el valor total de la longitud del tubo, 47.7cm. Se contabilizó la distancia de caída de cada mosca por separado. El número total de moscas por genotipo fue de ~40. La diferencia estadística entre los genotipos se determinó con un ANOVA de un factor. El genotipo *para* mostró diferencia significativa con los demás genotipos ($P\text{-value} < 0.001$). En las figuras B, C y D se representa la distribución poblacional en función de la distancia en la que caen antes de volar en los genotipos *para*, *sda* y *eas* respectivamente. Se contabilizó el número de moscas que había por intervalo. Los intervalos fueron de 5cm.

Como se puede observar en la Figura 17A, el genotipo *para* tiene una mayor tendencia a caer al fondo del tubo, ya que el 38% no son capaces de estabilizar el vuelo y caen a la base del tubo en los ensayos. Esta diferencia es significativa ($P\text{-value} < 0,001$) al realizar un análisis ANOVA de un factor. El porcentaje de caída de los genotipos *eas* y *sda* es similar al control, no mostrando una diferencia con significancia estadística ($P\text{-value} > 0,05$). En la Figura 17B se puede ver cómo el genotipo *para* tiene tendencia a caer más lejos del principio del tubo. Esto puede estar relacionado con la falta de locomoción observada en el ensayo de geotaxis negativa. En la Figura 17C y D se observa que la distribución de los genotipos *sda* y *eas*. En el genotipo *sda* la mayor parte de las moscas tiene tendencia a volar antes de caer 10 cm del tubo. En cambio, el genotipo *eas* tiene su mayor número a los 5cm de la longitud del tubo. La distribución de las curvas de estos genotipos se asemeja a la curva del control. En cambio, la curva del genotipo *para* es opuesta al control, mostrando cómo la mayoría de las moscas caen después de los 10-15 cm.

5. Discusión

5. Discusión

En este trabajo se ha iniciado la generación de un modelo KO del gen *para* en *D. melanogaster* que, hasta la fecha, no existe. Se ha conseguido clonar los brazos de homología del gen de *para* para obtener el constructo que ha servido para inyectar los embriones de *D. melanogaster*. Tras la inyección, se han obtenido líneas estables (en concreto dos líneas) que contienen el constructo insertado en puntos aleatorios del genoma. Dichas líneas han sido mapeadas para localizar la ubicación de los insertos, como se explica anteriormente, y se ha comprobado que una línea presenta el inserto en el cromosoma II, mientras que la otra lo contiene en el cromosoma III. Dichas líneas son el punto de partida para iniciar la liberación del inserto y posterior recombinación que dará lugar al KO, siguiendo el protocolo descrito por Baena y colaboradores (Baena et al., 2013).

El fenotipo esperado tras la generación de un KO no es predecible y depende fundamentalmente de la función del gen eliminado. En algunos casos no se muestra ningún fenotipo detectable a simple vista (datos no publicados del laboratorio), y en algunos casos puede generar letalidad (Yamamoto et al., 2014). En ratón se han generado modelos KO de *SCN1A* (Frank et al., 2006) y se ha conseguido que presenten convulsiones si se conserva una copia sana del gen. Pero en caso de que las dos copias resulten mutadas, los ratones presentan ataxia y baja esperanza de vida, demostrando que los canales Nav1.1 son importantes durante el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis en estado adulto.

En *D. melanogaster* se ha generado un modelo KI donde se ha mutado un aminoácido conservado el gen original *para*, correspondiendo dicha mutación a la más común en *SCN1A* en los enfermos con SD (Schutte et al., 2014). En este modelo se observó que la mosca presentaba convulsiones ligadas a choque térmico, mostrando un comportamiento similar a lo que ocurre en pacientes de SD (Dravet, 2011).

El gen *para* tiene 117 alelos (Kroll et al., 2015), donde se recogen una variabilidad fenotípica muy dispar. Unos alelos desarrollan sensibilidad a la parálisis con la temperatura (Suzuki et al., 1971), otros con el estrés mecánico (Parker et al. 2011) y otros son mutaciones supresoras de las convulsiones (Kuebler et al., 2001), por lo que predecir qué puede producir la eliminación del gen *para* es muy arriesgado.

En los ensayos de comportamiento se observó que el genotipo *para* es el que mayor tasa de convulsiones presenta. Además, también mostró el mayor tiempo de recuperación. En comparación con el genotipo *eas*, donde la función afectada es la etanolamina kinasa (Pavlidis et al., 1994), y el genotipo *sda*, donde la función afectada es una aminopeptidasa N (Zhang et al., 2002), el genotipo *para* tiene afectado el canal dependiente de voltaje de sodio Nav1.1 (Parker et al., 2011). Esta proteína está más directamente relacionada con la transmisión del impulso nervioso que las otras dos, debido a que su función principal es controlar el potencial de membrana en las neuronas (Parker et al., 2011), por lo que es más probable que una modificación de su función tenga consecuencias más drásticas a nivel de las crisis epilépticas comparadas con los otros genotipos. En el caso del genotipo *sda* la duración de las convulsiones es mucho menor, lo que sugiere que la implicación de la aminopeptidasa N en el impulso nervioso debería ser menor. En anteriores estudios se muestran unos resultados similares a los de este trabajo (Zhang et al., 2002). Actualmente no se conoce el papel de la aminopeptidasa N en el sistema nervioso, pero se ha sugerido que interviene en la alteración del sistema nervioso mediante la señalización por Ca^{+2} (Santos et al., 2000). El genotipo *eas*

muestra un menor número de convulsiones y su tiempo de recuperación es también menor al genotipo *para*. Este ensayo se ha realizado en otros estudios (Parker et al., 2011; Zhang et al., 2002) y se han contemplado tiempos medios similares a los obtenidos en este trabajo. Se conoce que la etanolamina kinaasa juega un papel importante en la síntesis de los fosfolípidos, en concreto la fosfoetanolamina, influyente en el correcto desarrollo del sistema nervioso (Pascual et al. 2005). Aun así, las causas que hacen que un defecto en esta proteína genere un funcionamiento anormal en las neuronas y produzca convulsiones frente a ciertos estreses no están aclaradas aún.

En los ensayos de supervivencia se puede observar cómo el genotipo *para* es el que más afecta a la vida media de los genotipos estudiados, generando un descenso continuo durante todo su rango de vida. Esto puede estar relacionado con la persistencia de las convulsiones que se observaron en el ensayo de comportamiento. Este genotipo es el más sensible a sufrir una convulsión y éstas tienen una duración mucho mayor que otros genotipos, pudiendo quedar secuelas que afecten a su desarrollo normal y provoquen una degeneración del sistema nervioso, que ocasionaría la muerte más temprana. En el genotipo *eas* la población desciende mucho más rápido a partir de su vida media que los otros genotipos estudiados, generando la esperanza de vida del genotipo *eas* sea 20 días menor la del control. Esto puede ser debido a que la función del gen mutado tenga mayor relevancia en las etapas más tardías de la mosca y eso genere una mortalidad más brusca llegado a dichas etapas. En las bases de datos de expresión no se encontró información en las etapas adultas, por lo que un ensayo de cuantificación de la expresión en diferentes etapas y tejidos podría ayudar a obtener más información al respecto para dilucidar la respuesta. En el caso de *sda*, la curva de supervivencia no muestra diferencias significativas respecto a la del control, demostrando que el defecto en la aminopeptidasa N no genera un aumento de la mortalidad en este genotipo. Esto puede estar correlacionando con el menor número de convulsiones comentado en el ensayo de comportamiento. Este gen tiene 2 transcritos que se expresan en los tres niveles (embrionario, larva y adulto) pero las cepas mutadas de *sda* no expresan el primero (Zhang et al., 2002). Es posible que este segundo transcrito sea suficiente para el mantenimiento vital de la mosca y sólo se manifieste un defecto (convulsiones) frente a un estrés mecánico, permitiendo que la mosca tenga una vida normal el resto del tiempo. En otros estudios se muestran unos resultados semejantes a los obtenidos en este trabajo para el genotipo *para* y *eas*. (Fergestad et al. 2008). No se han encontrado ensayos de supervivencia realizados el genotipo *sda*, por lo que estos datos podrían servir para caracterizar mejor esta cepa en futuros ensayos.

Respecto a los ensayos de vuelo y geotaxis negativa, estos están relacionados con la actividad locomotora (M'Angle & Staveley, 2016; Barone & Bohmann, 2013). En la bibliografía no se han encontrado ensayos de este tipo en las cepas BS de este trabajo, por lo que la información obtenida podría servir de ayuda para caracterizar mejor estos genotipos. En el caso del genotipo *para* se muestran una disminución de la actividad locomotora muy evidente respecto al control y los demás genotipos. En estos ensayos se demuestra que la capacidad de volar y trepar está deteriorada. Esto implicaría que el gen *para* puede estar implicado en la transmisión del impulso nervioso en neuronas motoras, generando deficiencia en la actividad locomotora si el gen está mutado. En el genotipo *sda*, los datos de los ensayos de vuelo y geotaxis negativa muestran un comportamiento no muy distinto respecto la cepa control, aunque en el caso de la geotaxis negativa se observa una mejor actividad locomotora a los 20 días. Una explicación es que la pérdida de la actividad locomotora con la edad afecte antes al control que al genotipo *sda*, lo que generaría una diferencia significativa a los 20 días, cuando

el genotipo *sda* no habría perdido actividad, pero no a los 30 días, cuando el genotipo *sda* ya habría perdido actividad y se igualaría a los porcentajes del control. En otros estudios se habla de un comportamiento normal en cuanto al vuelo y la geotaxis-negativa (Zhang et al., 2002). En cuanto al papel del gen *eas* en la actividad locomotora, no se muestran datos que demuestren una alteración de esta actividad en los ensayos de geotaxis negativa y de vuelo. Esto puede explicarse debido a que no es una proteína de canal, como en el caso de *para* (Parker et al. 2011), que pueda estar directamente relacionada con la estimulación de las neuronas motoras, sino que esta enzima interviene en la generación de ciertos fosfolípidos, en concreto la fosfatidiletanolamina (Pavlidis et al., 1994). Se ha observado en moscas *eas* que el fallo en la estimulación del sistema nervioso se produce en la sinapsis de las interneuronas del músculo dorsal longitudinal destinado al vuelo, mientras las uniones neuromusculares se mantienen funcionales (Pavlidis & Tanouye, 1995). Esto podría explicar el hecho de que mantengan su actividad locomotora normal pero también sufran convulsiones tras un estrés mecánico.

Estos ensayos son útiles para la caracterización de moscas BS, pues están relacionados con síntomas o características comunes en enfermedades epilépticas. En el SD el síntoma más común es el estado epiléptico, pero también desarrollan dificultades en el aparato locomotor, mostrando ataxia o hipotonía muscular y su esperanza de vida es menor (Dravet, 2011). Por ello, se han escogido estos ensayos para la caracterización de las cepas BS. Otros ensayos interesantes serían el de electrofisiología, siendo muy empleado para caracterizar estas cepas (Parker et al., 2011; Pavlidis et al., 1994; Zhang et al., 2002) y el de respuesta a choque térmico, el cual sería interesante ya que en los pacientes de SD suele relacionarse las convulsiones con fiebre (Dravet, 2011).

Este trabajo está dentro de un proyecto mayor. El objetivo final del proyecto es generar modelos KI del gen *SCN1A* humano en *D. melanogaster* con las mutaciones de pacientes con SD. Para ello, se empleará la secuencia de ADNc humano con dos objetivos distintos. Primero se utilizará para el rescate del KO y, por otra parte, se utilizará para realizar mutagénesis dirigida por PCR convencional y originar las mutaciones de cada uno de los pacientes. Con el ADNc mutado se procederá a crear modelos de precisión en *D. melanogaster*. Su función es poder estudiar con mayor profundidad las alteraciones que producen las mutaciones de este gen, y poder emplearlo como modelo de medicina personalizada para el cribado de nuevos fármacos. Este modelo sería más preciso a la hora de evaluar fármacos que los anteriores ya que la proteína del canal de sodio sobre la que el fármaco debe actuar sería exactamente la misma que en humanos, generando datos más extrapolables que los anteriores modelos. El modelo KO que se está generando y los siguientes modelos KI procedentes del mismo tendrán una serie de características que deberán ser estudiadas y analizadas. Los ensayos generados en cepas BS permiten comprender cuales son los comportamientos más comunes de cepas con ataques epilépticos y así familiarizarse con las técnicas que más tarde se emplearán con el modelo KO.

6. Conclusión

6.Conclusiones

En este trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido completar la fase molecular de la generación de un modelo KO del gen *para* y se ha llegado a obtener moscas transgénicas y localizar la posición de su inserto a nivel de cromosoma. Los siguientes 2 cruces que quedan y el cribado de positivos permitirán que en un par de meses la obtención del modelo KO.
- Los ensayos de caracterización han proporcionado información interesante sobre la importancia del gen *para* en la calidad de vida de *D. melanogaster*, mostrando una menor esperanza de vida y una deficiencia en su actividad locomotora más pronunciada que los otros genotipos ensayados.
- La aplicación de los ensayos ha permitido coger destreza y ponerlos a punto en cuanto a su correcta ejecución, precisión y reproducibilidad. Esto permitirá caracterizar moscas sensibles a convulsionar como las que se espera obtener con el KO y los posteriores modelos de medicina de precisión derivados del KO
- Gracias a este trabajo, se ha avanzado en la creación de un modelo KO que ayude al estudio del síndrome de Dravet y permita la creación de modelos de medicina de precisión, dando esperanzas a los familiares y afectados de una mejora en su calidad de vida.

7. Bibliografía

7. Bibliografia

- BAENA-LOPEZ, L. A., ALEXANDRE, C., MITCHELL, A., PASAKARNIS, L., & VINCENT, J. P. (2013). Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development*, *140*(23), 4818-4825.
- BARONE, M. C., & BOHMANN, D. (2013). Assessing neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (74), e50339-e50339.
- BENZER, S. (1967). Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *58*(3), 1112-1119.
- BENZER, S. (1973). Genetic dissection of behavior. *Scientific American*.
- BRUNKLAUS, A., ELLIS, R., REAVEY, E., SEMSARIAN, C., & ZUBERI, S. M. (2014). Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *Journal of medical genetics*, jmedgenet-2014.
- CATTERALL, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, *26*(1), 13-25.
- CHIRON, C., & DULAC, O. (2011). The pharmacologic treatment of Dravet syndrome. *Epilepsia*, *52*(s2), 72-75.
- CLAES, L., DEL-FAVERO, J., CEULEMANS, B., LAGAE, L., VAN BROECKHOVEN, C., & DE JONGHE, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(6), 1327-1332.
- DRAVET, C. (2011). The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia*, *52*(s2), 3-9.
- DRAVET, C., & OGUNI, H. (2013). Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). *HandbClinNeurol*, *111*, 627-633.
- DRAVET, C., BUREAU, M., OGUNI, H., FUKUYAMA, Y., & COKAR, O. (2005). Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*, *4*, 89-113.
- FERGESTAD, T., OLSON, L., PATEL, K. P., MILLER, R., PALLADINO, M. J., & GANETZKY, B. (2008). Neuropathology in *Drosophila* mutants with increased seizure susceptibility. *Genetics*, *178*(2), 947-956.
- FRANK, H. Y., MANTEGAZZA, M., WESTENBROEK, R. E., ROBBINS, C. A., KALUME, F., BURTON, K. A. & CATTERALL, W. A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature neuroscience*, *9*(9), 1142-1149.
- GANETZKY, B., & WU, C. F. (1982). Indirect suppression involving behavioral mutants with altered nerve excitability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *100*(4), 597-614.

- GUERRINI, R. (2012). Dravet syndrome: the main issues. *European Journal of Paediatric Neurology*, *16*, S1-S4.
- HALES, K. G., KOREY, C. A., LARRACUENTE, A. M., & ROBERTS, D. M. (2015). Genetics on the fly: a primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*, *201*(3), 815-842.
- HUANG, J., ZHOU, W., DONG, W., WATSON, A. M., & HONG, Y. (2009). Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(20), 8284-8289
- HUANG, J., ZHOU, W., WATSON, A. M., JAN, Y. N., & HONG, Y. (2008). Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics*, *180*(1), 703-707.
- HURST, D. L. (1990). Epidemiology of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia*, *31*(4), 397-400.
- Kaas, G. A., Kasuya, J., Lansdon, P., Ueda, A., Iyengar, A., Wu, C. F., & Kitamoto, T. (2016). Lithium-responsive seizure-like hyperexcitability is caused by a mutation in the *Drosophila* voltage-gated sodium channel gene paralytic. *eneuro*, *3*(5), ENEURO-0221.
- KROLL J.R., SARAS A., TANOUYE M.A. (2015) *Drosophila* sodium channel mutations: contributions to seizure-susceptibility. *Experimental neurology*. 2015;274(0 0):80-87. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.06.018.
- KUEBLER, D., ZHANG, H., REN, X., & TANOUYE, M. A. (2001). Genetic Suppression of Seizure Susceptibility in *Drosophila*. *Journal of Neurophysiology*, *86*(3), 1211-1225.
- LIN, W. H., WRIGHT, D. E., MURARO, N. I., & BAINES, R. A. (2009). Alternative splicing in the voltage-gated sodium channel DmNav regulates activation, inactivation, and persistent current. *Journal of neurophysiology*, *102*(3), 1994-2006.
- LIU, J., LI, C., YU, Z., HUANG, P., WU, H., WEI, C., ...& DENG, W. M. (2012). Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *Journal of genéticas and genómicas*, *39*(5), 209-215.
- LOUGHNEY, K., KREBER, R., & GANETZKY, B. (1989). Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, *58*(6), 1143-1154.
- M'ANGALE, P. G., & STAVELEY, B. E. (2016). The Bcl-2 homologue Buffy rescues α -synuclein-induced Parkinson disease-like in phenotypes *Drosophila*. *BMC neuroscience*, *17*(1), 24.
- MADIA, F., STRIANO, P., GENNARO, E., MALACARNE, M., PARAVIDINO, R., BIANCHERI, R., ...& MINETTI, C. (2006). Cryptic chromosome deletions involving *SCN1A* in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology*, *67*(7), 1230-1235.
- O'DOWD, D. K., GEE, J. R., & SMITH, M. A. (1995). Sodium current density correlates with expression of specific alternatively spliced sodium channel mRNAs in single neurons. *Journal of Neuroscience*, *15*(5), 4005-4012.

- PANDEY, U. B., & 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.
- PARKER, L., PADILLA, M., DU, Y., DONG, K., & TANOUYE, M. A. (2011). *Drosophila* as a model for epilepsy: *bss* is a gain-of-function mutation in the para sodium channel gene that leads to seizures. *Genetics*, *187*(2), 523-534.
- PASCUAL, A., CHAMINADE, M., & PRÉAT, T. (2005). Ethanolamine kinase controls neuroblast divisions in *Drosophila* mushroom bodies. *Developmental biology*, *280*(1), 177-186.
- PAVLIDIS, P., & TANOUYE, M. A. (1995). Seizures and failures in the giant fiber pathway of *Drosophila* bang-sensitive paralytic mutants. *Journal of Neuroscience*, *15*(8), 5810-5819.
- PAVLIDIS, P., RAMASWAMI, M., & TANOUYE, M. A. (1994). The *Drosophila* easily shocked gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell*, *79*(1), 23-33.
- PESAH, Y., PHAM, T., BURGESS, H., MIDDLEBROOKS, B., VERSTREKEN, P., ZHOU, Y. & MARDON, G. (2004). *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development*, *131*(9), 2183-2194.
- RONG, Y. S., & GOLIC, K. G. (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *science*, *288*(5473), 2013-2018.
- SANTOS, A. N., LANGNER, J., HERRMANN, M., & RIEMANN, D. (2000). Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cellular immunology*, *201*(1), 22-32.
- SCHUTTE, R. J., SCHUTTE, S. S., ALGARA, J., BARRAGAN, E. V., GILLIGAN, J., STABER, C. & O'DOWD, D. K. (2014). Knock-in model of Dravet syndrome reveals a constitutive and conditional reduction in sodium current. *Journal of neurophysiology*, *112*(4), 903-912.
- SCHUTTE, S. S., SCHUTTE, R. J., BARRAGAN, E. V., & O'DOWD, D. K. (2016). Model systems for studying cellular mechanisms of *SCN1A*-related epilepsy. *Journal of neurophysiology*, *115*(4), 1755-1766.
- SONG, J., & TANOUYE, M. (2007). Role for para sodium channel gene 3' UTR in the modification of *Drosophila* seizure susceptibility. *Developmental neurobiology*, *67*(14), 1944-1956.
- SONG, J., & TANOUYE, M. A. (2009). The Genetics and Molecular Biology of Seizure Susceptibility in *Drosophila*. *Animal models of epilepsy: Methods and innovations*, 27-43.
- SUN, L., GILLIGAN, J., STABER, C., SCHUTTE, R. J., NGUYEN, V., O'DOWD, D. K., & REENAN, R. (2012). A knock-in model of human epilepsy in *Drosophila* reveals a novel cellular mechanism associated with heat-induced seizure. *Journal of Neuroscience*, *32*(41), 14145-14155.
- SUZUKI, D. T., GRIGLIATTI, T., & WILLIAMSON, R. (1971). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*, VII.A mutation (*parats*) causing reversible adult paralysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *68*(5), 890-893.

YAMAMOTO, S., JAISWAL, M., CHARNG, W. L., GAMBIN, T., KARACA, E., MIRZAA, G. & ZHANG, K. (2014). A *Drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*, 159(1), 200-214.

ZHANG, H., TAN, J., REYNOLDS, E., KUEBLER, D., FAULHABER, S., & TANOUYE, M. (2002). The *Drosophila* slamdance gene: a mutation in an aminopeptidase can cause seizure, paralysis and neuronal failure. *Genetics*, 162(3), 1283-1299.

ZHU M, LI X, TIAN X, WU C. Mask loss-of-function rescues mitochondrial impairment and muscle degeneration of *Drosophila pink1* and *parkin* mutants. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(11):3272-3285. doi:10.1093/hmg/ddv081.

Páginas Web:

Apoyo Dravet. (2017). Inicio | Apoyo Dravet. [online] Disponible en: <http://www.apoyodravet.eu/> [Consultado el 11 mayo de 2017].

Dgrc.bio.indiana.edu. (2017). *Drosophila* Genomics Resource Center. [online] Disponible en: <https://dgrc.bio.indiana.edu/Home> [Consultado el 11 enero de 2017].

Ncbi.nlm.nih.gov. (2017). National Center for Biotechnology Information. [online] Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Consultado el 11 de enero de 2017].

Anexo I

Las moscas inyectadas con el vector incorporarán el fragmento al azar en el genoma. Aquí se describen las posibles inserciones en el cromosoma II y III, los cruces y descendencia que se produciría en cada caso.

Cromosoma II:

Posibilidades del 1º Cruce

$$P \quad w^{-}; \frac{Inserto}{+}; \frac{+}{+} \times w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b}$$

$$F1 \quad 1. w^{-}; \frac{Inserto}{If}; \frac{MKRS}{+}$$

$$2. w^{-}; \frac{Inserto}{Cyo}; \frac{MKRS}{+}$$

$$3. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{MKRS}{+}$$

$$4. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{MKRS}{+}$$

$$5. w^{-}; \frac{Inserto}{If}; \frac{TM6b}{+}$$

$$6. w^{-}; \frac{Inserto}{Cyo}; \frac{TM6b}{+}$$

$$7. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{TM6b}{+}$$

$$8. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{TM6b}{+}$$

Cromosoma III:

$$P \quad w^{-}; \frac{+}{+}; \frac{+}{Inserto} \times w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b}$$

$$F1 \quad 1. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{MKRS}{Inserto}$$

$$2. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{MKRS}{Inserto}$$

$$3. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{MKRS}{+}$$

$$4. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{MKRS}{+}$$

$$5. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{TM6b}{Inserto}$$

$$6. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{TM6b}{Inserto}$$

$$7. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{TM6b}{+}$$

$$8. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{TM6b}{+}$$

Los genotipos con el recuadro rojo son los que mostrarán fenotipo de ojos rojos y se emplearán para el segundo cruce.

Posibilidades del 2º Cruce

Cromosoma II:

$$\text{F1} \quad w^{-}; \frac{+}{If \text{ ó } Cyo}; \frac{Inserto}{MKRS \text{ ó } TM6B} \times w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b}$$

$$\text{F2} \quad \begin{array}{l} \boxed{1. w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{Inserto}{TM6b}} \\ \boxed{2. w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{Inserto}{MKRS}} \end{array} \quad \begin{array}{l} 3. w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{+}{TM6b} \\ 4. w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{+}{MKRS} \\ 5. w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b} \end{array}$$

Cromosoma III:

$$\text{F1} \quad w^{-}; \frac{Inserto}{If \text{ ó } Cyo}; \frac{+}{MKRS \text{ ó } TM6B} \times w^{-}; \frac{If}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b}$$

$$\text{F2} \quad \begin{array}{l} \boxed{1. w^{-}; \frac{Inserto}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b}} \\ \boxed{2. w^{-}; \frac{Inserto}{If}; \frac{MKRS}{TM6b}} \end{array} \quad \begin{array}{l} 3. w^{-}; \frac{+}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6b} \\ 4. w^{-}; \frac{Cyo}{If}; \frac{MKRS}{TM6b} \\ 5. w^{-}; \frac{+}{If}; \frac{MKRS}{TM6b} \end{array}$$

Solo existen 5 posibles genotipos en cada cruce debido a que los cromosomas equilibradores (If, Cyo, MKRS y TM6b) generan letalidad en homocigosis. De esta manera se observa como solo las moscas que no llevan el inserto pueden presentar todos los marcadores.

-Si el inserto está en el cromosoma II: Solo se observarán en moscas rojas uno de los 2 marcadores equilibradores del cromosoma II.

-Si el inserto está en el cromosoma III: Solo se observarán en moscas rojas uno de los 2 marcadores equilibradores del cromosoma III.

Anexo II

Para la preparación de la comida se hacían tandas de 2L según el siguiente procedimiento:

1. Mezclar los siguientes ingredientes en alícuotas:
 - a. 20 g de agar
 - b. 20 g de harina integral de soja
 - c. 120 g de harina de maíz
 - d. 100 g de azúcar
2. Calentar alrededor de 1,2L de agua estéril (tipo II) durante 5 min.
3. Mezclar la alícuota con el agua recién calentada.
4. Pesar 60 g de levadura y añadirsele a la mezcla. Mezclar con una batidora hasta que este uniforme.
5. Tapar la mezcla con papel de aluminio e introducir en el autoclave a 120°C durante 30 min.
6. Una vez esterilizado, dejar enfriar un poco. Añadir 10ml de ácido propiónico y 20ml Nipagin como antibacteriano y antifúngico, respectivamente.
7. Calentar 700ml de agua estéril (tipo II) durante 5 min. Una vez caliente, añadir a la mezcla.
8. Mezclar bien con la batidora hasta que quede homogéneo.
9. Dispensar la comida, utilizando una bomba peristáltica, añadiendo alrededor de 10ml en cada tubo.
10. Tapar los tubos y dejar reposar durante toda la noche. Al día siguiente, colocar los tapones en los tubos y guardar a 4°C.