

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Análisis molecular del gen *longitudinals lacking* en *Drosophila melanogaster*

TRABAJO DE FIN DE GRADO
MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
CURSO 2015/2016



TUTORA: JULIA RUEDA MUÑOZ DE SAN PEDRO
ALUMNO: ELIGIO CORDOBÉS PADILA

Índice

Introducción	3
Material y métodos	6
Material	6
Métodos.....	6
Obtención de DNA genómico	6
Amplificación por PCR.....	6
Clonación del producto de PCR	9
Secuenciación	10
Extracción de RNA.....	10
RT y PCR con cebadores específicos de <i>lola</i>	10
Purificación de sondas	11
Marcaje de sondas.....	11
Hibridación <i>in situ</i>	12
Resultados	12
Análisis molecular del punto de inserción del elemento PlacW en el genoma de la línea 5D2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Estudio de expresión del gen <i>lola</i> en una línea silvestre de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Discusión	16
Análisis molecular del punto de inserción del elemento PlacW en el genoma de la línea 5D2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
Estudio de expresión del gen <i>lola</i> en una línea silvestre de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Conclusiones	20
Referencias bibliográficas.....	20

Resumen

El gen *longitudinals lacking* (*lola*) desempeña un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Se ha comprobado su implicación en un elevado número de procesos relacionados con el crecimiento y la orientación de los axones. En el presente trabajo se realizó un análisis molecular de *lola* en *D. melanogaster*; para ello, se localizó el punto exacto de una inserción de un elemento P modificado (PlacW) que caracteriza la línea 5D2, y se observó la expresión espacio-temporal del gen durante el desarrollo embrionario de la línea silvestre por hibridación *in situ*. La inserción de PlacW se encontró localizada en un intrón de *lola*. Dicha inserción, pese a localizarse en DNA no codificante, podría afectar a los procesos de *splicing* del gen, lo que produciría el fenotipo mutante. Se observó la expresión espacio-temporal de *lola* durante diferentes estadios embrionarios en el SNC y SNP y, además, se pudo observar mRNA de *lola* de origen materno en estadios muy tempranos del desarrollo.

Palabras clave

5D2, desarrollo embrionario, expresión espacio-temporal, *lola*, PlacW

Abstract.

Longitudinals lacking (*lola*) gene has an important role in the *Drosophila melanogaster* nervous system development. Also, it has been shown that this gene participate in multiple axon growth and guidance decisions. In the study, we performed a molecular analysis of *lola* in *D. melanogaster*. To this end, we identificated the exact location of a modified P element (PlacW) insertion that characterizes the 5D2 allele. Further, we analyzed the spatiotemporal expression of the gen during the embryonic development of the wild type by *in situ* hybridization. PlacW insertion was found in a *lola* intron and, in spite of being located in noncoding DNA, it could affect splicing processes, producing a mutant phenotype. We studied the *lola* spatiotemporal expression during different embryonic stages in the CNS and PNS and the maternal mRNA of *lola* in early stages of development.

Key words.

5D2, embryonic development, spatiotemporal expression, *lola*, PlacW

Introducción

El DNA contiene toda la información vital que requieren las células para su desarrollo en cualquier organismo. Todo el proceso, desde el DNA hasta la proteína funcional, está regulado por diferentes procesos, como pueden ser la transcripción, la formación de RNA mensajero (mRNA) funcional, el *splicing* de RNA, la traducción, etc. (Orphanides & Reinberg, 2002).

Aislar mutaciones en un gen permite responder preguntas concretas acerca de su función en el organismo, esta técnica ha permitido estudiar diversos genes en una serie de organismos modelo (Beumer *et al.*, 2006).

Drosophila melanogaster es un organismo modelo muy atractivo por diversos motivos: el análisis de los fenotipos mutantes puede llevarse a cabo en un tiempo relativamente corto, existe una amplia gama de tecnologías que permite hacer manipulaciones genéticas sofisticadas con el fin de estudiar la función de diversos genes, entre las cuales se incluyen la transgénesis mediada por elementos P (Rubin & Spradling, 1982) o el sistema de sobreexpresión (Brand & Perrimon, 1993) entre otras. Por otra parte, la secuenciación del genoma completo de *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000) y la disponibilidad de numerosos recursos, incluyendo bases de datos en línea, como Flybase (<http://flybase.org/>), han facilitado en gran medida los estudios funcionales de genes específicos en diversos campos, como pueda ser la biología del desarrollo (Greenspan, 2004).

La identificación de nuevos genes y su caracterización funcional *in vivo* depende en gran medida del desarrollo de herramientas genéticas, y muchas de las investigaciones hoy en día se basan en el avance de la tecnología de la genética inversa, como el etiquetado de genes (Zhongsheng & Renjie, 2010).

Una de las etiquetas más frecuentes deriva de los transposones, elementos genéticos que son capaces de moverse de un lugar a otro dentro del genoma de un organismo. La mayoría de los transposones llevan un gen que codifica para la transposasa, que cataliza la escisión y reinserción del transposón en el genoma, sin embargo, algunos transposones que carecen del gen que codifica para la transposasa utilizan la enzima transposasa producida por otros transposones para moverse. Bajo condiciones en las que no hay una fuente externa de transposasa, estos transposones, que no pueden producir su propia transposasa, se fijan en su lugar y son genéticamente estables (Marcus & Hughes, 2009). Este tipo de transposones que carecen de transposasa serían los que se utilizan como etiquetas.

Los elementos P son transposones que se conocen desde hace mucho tiempo en *Drosophila*, por lo que se tiene un amplio conocimiento sobre ellos. En un elemento P típico encontramos una repetición invertida en cada uno de los extremos y un gen que codifica la transposasa específica del elemento P, que le permite moverse de un lugar a otro en el genoma. Controlar los procesos de transposición de los elementos P eliminando la transposasa permite crear nuevas etiquetas. De este modo, los elementos P típicos han sido modificados mediante la eliminación del gen de la transposasa, y su sustitución por uno o varios genes de interés. Estos elementos P modificados ya no son capaces de catalizar su propio movimiento, y requieren una fuente externa de transposasa para moverse (Marcus & Hughes, 2009).

Este es el caso del elemento PlacW (Figura 1.), se trata de un elemento P modificado en el cual el gen de la transposasa fue sustituido por el gen *lacZ*, el gen *mini-white* (alelo silvestre del locus *white*), un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a ampicilina (*amp*). El gen *mini-white* es importante como marcador genético, el gen *lacZ* permite caracterizar distintas líneas, y el resto de elementos facilitan los procesos de clonación del DNA adyacente al punto de inserción (*plasmid rescue*) (Cooley et al. 1988).

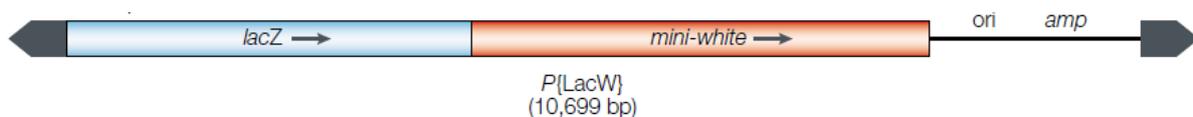


Figura 1. Estructura del elemento PlacW (Adams & Sekelsky, 2002).

Cuando se pretende caracterizar un gen insertando un elemento P al azar es necesario que este se inserte en un lugar que interfiera con la función de dicho gen. Un transposón puede interferir un gen de diferentes maneras, pero la más fácil de entender es cuando el transposón se inserta dentro de la secuencia que codifica el gen, de modo que puede interferir con la transcripción y evitar la producción del mensajero. Muchos genes han sido interrumpidos molecularmente y caracterizados por secuenciación del DNA a ambos lados de la inserción del transposón (Marcus & Hughes, 2009).

Giniger *et al.* (1994) caracterizaron diversas líneas de *D. melanogaster* con inserciones de elementos P en el gen *longitudinals lacking* (*lola*), además mapearon la posición aproximada de esas inserciones de elementos P en el gen *lola*, entre las cuales se encontraba la inserción que caracteriza la línea 5D2 de *D. melanogaster*. Según Giniger *et al.* (1994), en esa línea, el elemento PlacW se encontraba en lo que ellos denominaron *exón γ* (Figura 2.), que no es más que el DNA genómico que codifica para el extremo 5' del cDNA de un mensajero de 4.7 kb de *lola* que ellos llaman *lola 4*.

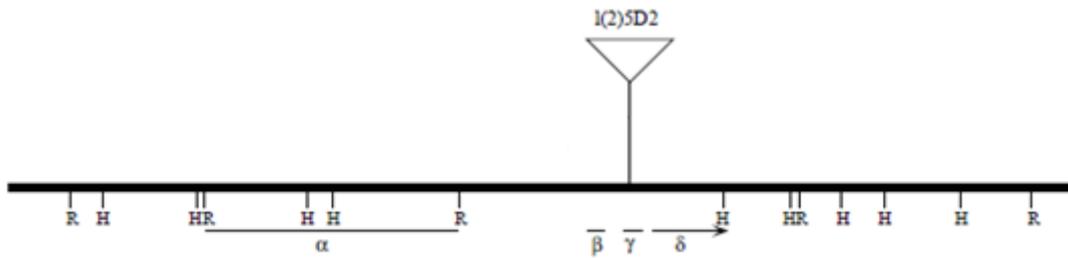


Figura 2. Región genómica que rodea inserciones de elementos P en el gen *lola* (Modificado de Giniger *et al.*, 1994).

Otras inserciones de elementos P fueron encontradas en lo que ellos denominaron *exón β* (Figura 2.), DNA genómico que codifica el extremo 5' del cDNA de un mensajero de 3.8 kb del gen *lola* que ellos denominaron *lola 8*. Por el contrario el *exón δ* (Figura 2.) representa el DNA genómico que codifica para el exón compartido por los distintos RNAs de *lola*. Ambos cDNAs (*lola 4* y *lola 8*) tienen una zona común en el centro (*exón δ*), mientras que hacia el extremo 5' de *lola 4* aparece el *exón γ* y hacia el extremo 5' de *lola 8* aparece el *exón β*. Esto es una prueba inequívoca de que *lola* tiene procesamiento alternativo y que se forman, por lo menos, estos 2 mRNAs.

El gen *lola* codifica un factor de transcripción que está implicado en una variedad de decisiones relacionadas con el crecimiento y la orientación de los axones del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* (Crownier *et al.*, 2002; Giniger *et al.*, 1994; Madden *et al.*, 1999; Seeger *et al.*, 1993). Esas decisiones dependen de la proteína que se genere, pues se sabe que *lola* sufre *splicing* alternativo, pudiendo generar hasta 20 isoformas de proteína diferentes. Está demostrado que diversas mutaciones en *lola* producen una serie de fenotipos que van desde defectos en el crecimiento y orientación de los axones hasta defectos en la orientación de algunos órganos sensoriales. Durante el desarrollo embrionario es cuando dicho papel es más importante, ya que las distintas isoformas de *lola* se expresan con un patrón complejo en los tejidos embrionarios (Goeke *et al.* 2003).

En el presente trabajo se pretende hacer un análisis molecular de algunos aspectos gen *lola*. Por un lado se pretende definir el punto exacto de inserción de un elemento P modificado dentro del gen *lola* en una de las líneas descrita por Giniger *et al.* (1994), puesto que desconocían la posición exacta de esas inserciones dentro de *lola*, y por otro lado estudiar la expresión espacio-temporal de *lola* en el desarrollo embrionario de una línea silvestre de *D. melanogaster*. Es por ello que se pueden distinguir dos objetivos:

- Análisis molecular del punto de inserción del elemento PlacW en el genoma de la línea 5D2 de *Drosophila melanogaster*. Para ello se realizará una PCR sobre el DNA

genómico de la línea 5D2 de *D. melanogaster*, usando los cebadores adecuados se amplificará la parte del genoma donde debería estar la inserción, la secuencia amplificada se multiplicará clonándola en un vector con el que se transformarán bacterias. Una vez confirmada la presencia del fragmento amplificado en las bacterias se procederá a la secuenciación de los vectores para determinar el punto exacto de la inserción de PlacW en el genoma de la línea 5D2 de *D. melanogaster*.

- Estudio de expresión del gen *lola* en una línea silvestre de *Drosophila melanogaster* que realizaremos a través de dos etapas:
 - Comprobar que *lola* se transcribe y es activo durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, para ello se debe detectar la presencia del mRNA de *lola* en el embrión. Se hará una PCR con cebadores específicos de *lola* sobre cDNA obtenido por RT del RNA total extraído de los embriones de *D. melanogaster*.
 - Determinar expresión espacio-temporal (en qué tipos celulares se expresa *lola* y en qué momentos del desarrollo) por hibridación *in situ* sobre embriones WT.

Material y métodos

Material

En la determinación del punto de inserción de PlacW se trabajó con individuos adultos de la línea 5D2 de *D. melanogaster*, mientras que para los estudios de expresión de *lola* se trabajó tanto con embriones como con individuos adultos de la línea silvestre de *D. melanogaster*.

Métodos

Obtención de DNA genómico

Se extrajo el DNA genómico de 10-15 individuos adultos de la línea 5D2 de *D. melanogaster* según el método descrito por Roberts (1998) con una modificación, no se hizo extracción de proteínas con fenol. Se analizó el estado del DNA extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, y se cuantificó tomando distintas medidas de absorbancia. Se obtuvo una concentración de 112,6 ng/ μ l, con una relación A_{260}/A_{280} de 1,88.

Amplificación por PCR

Se amplificó por PCR la región del DNA genómico donde se esperaba encontrar la inserción del elemento PlacW según Giniger *et al.* (1994), era necesario un conocimiento previo de la secuencia para así poder utilizar la pareja de cebadores adecuada, por ello el diseño de la PCR

es de vital importancia a la hora de determinar de forma exacta el punto de inserción del elemento PlacW.

El diseño de los cebadores se realizó empleando la herramienta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como *PCR Template* se introdujo una secuencia mixta, que puede no existir como tal en la línea 5D2 de *D. melanogaster*, formada por el extremo 3' del elemento PlacW, el *exón γ* descrito por Giniger *et al.* (1994) donde se describe que está insertado el elemento PlacW, y el intrón situado en 3' de dicho *exón γ*. De esta manera se buscó el cebador *forward* (Fw) en el extremo 3' del elemento PlacW, y el cebador *reverse* (Rv) en el extremo 5' del intrón. La inclusión de la secuencia completa del *exón γ* aumenta la especificidad de los cebadores y reduce la probabilidad de obtener falsos positivos. Luego era necesario conocer las tres secuencias que formaban la secuencia mixta.

- La secuencia del elemento PlacW fue proporcionada por el profesor.
- Para conocer la secuencia del *exón γ* se tomaron los números de accesión de los cDNAs *lola 4* (U07607) y *lola 8* (U07606) facilitados por Giniger *et al.* (1994) y se obtuvieron ambas secuencias nucleotídicas en la base de datos de nucleótidos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con dichas secuencias se realizó un alineamiento utilizando la herramienta *Align Sequences Nucleotide BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y como se esperaba se encontró homología en la región intermedia de ambas (se correspondería al *exón δ*). Hacia el extremo 5' esa homología comenzaba en el par de bases 180, lo que significa que los 179 primeros pares de bases se corresponden con el *exón γ* en el cDNA *lola 4*, mientras que los 179 primeros pares de bases del cDNA *lola 8* se corresponden con el *exón β*.
- Para conocer la secuencia del intrón situado en 3' del *exón γ* se utilizó la herramienta *BLAST* (<http://flybase.org/>), y se comparó un fragmento de la secuencia nucleotídica de *lola 4* formado por los 179 primeros pares de bases (*exón γ*) y los 150 pares de bases siguientes (parte del *exón δ*) con el genoma de *D. melanogaster*, de modo que la discontinuidad entre ambas se correspondía con el intrón de interés. La discontinuidad entre la secuencia y el genoma se encontraba entre los pares de bases 10533969 y 10534177, luego ahí estaría el intrón, para conocer su secuencia se acudió a la base de datos de intrones de *lola* (<http://flybase.org/>) y se buscó en la posición que indicó el alineamiento de secuencias.

A partir de las tres secuencias obtenidas se pudo construir una secuencia mixta de 645 pb (*Figura 3.*), formada por 257pb del extremo 3' de PlacW, 179 pb del *exón γ* (Giniger *et al.*,

1994) y 209 pb del extremo 5' del intrón en 3' del exón γ . Esta secuencia mixta (*Figura 3.*) se utilizó junto con la herramienta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para elegir la pareja de cebadores más adecuada para la reacción de PCR. Los cebadores obtenidos fueron:

- Fw: 5'-CGACAAGCTTTGCGTACTCG-3'
- Rv: 5'-TGTTGCTTAGCCTTTGCACAT-3'

```

GGAGTTGATGACGCCGACAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTA AAAATAAAA ACTTTAAAAA
TAATTTTCGTCTAATTAATATTATGAGTTAATTCAAACCCACGGACATGCTAAGGGTTAATC
AACAAATCATATCGCTGTCTCACTCAGACTCAATACGACACTCAGAATACTATTCTTTCACT
CGCACTTATTGCAAGCATAACGTTAAGTGGATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTAT
TTCATCATGACACACGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAAATCCGTTAG
CTCTCTCTTTACGCGAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAAATTAACAAG
AAGCAGAAACTCCCTAGGAAATTTAAAAAATAACTGCACTTCGCTGTTGAAAAATTTGCATA
CAGTATGTCGCTGTGGGTGTTTATTTGAGGATGTATGTGTGTATGTGCAAAGGCTAAGCAAC
AATAATAATCTAGCTGAAATTTCAAGCGCGCAAAGAGATGAAAGATATTGTTATTGCTGCG
CTGAAATTAACATGAACTTGACCTTGGGCCGATTGCGAGTTTTTTGCGTTACTAATTTTG
TTTTCTGTCTTCTTTCTCTTTGCAG
  
```

Figura 3. Secuencia mixta utilizada para el diseño de los cebadores de PCR. El texto en color verde (257 pb) representa la secuencia del extremo 3' de PlacW; el texto en color rojo (179 pb) representa la secuencia del exón γ (Giniger *et al.*, 1994); el texto en color azul (209 pb) representa la secuencia del intrón en 3' del exón γ .

Con dichos cebadores, se esperaba amplificar una secuencia formada por los 243 últimos pares bases del extremo 3' del elemento PlacW, un número desconocido de pares de bases (entre 0 y 179) del exón γ y los 61 primeros pares de bases del extremo 5' del intrón situado en 3' del exón γ . Es decir el tamaño del producto de PCR, representado en la *Figura 4.*, debía oscilar entre los 304 y los 483 pb. El tamaño máximo esperado (483 pb) del producto de PCR aparece representado en la *Figura 5.*

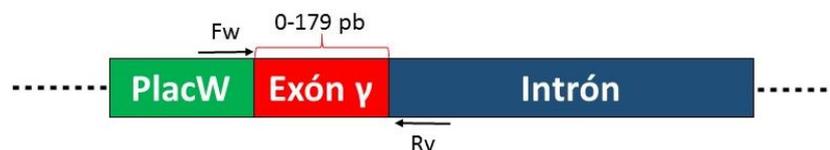


Figura 4. Representación del producto esperado de PCR. La longitud de los fragmentos de este no se encuentra representada a escala.

CGACAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTAAAAATAAACTTTAAAAATAATTTTCGTCTAAT
 TAATATTATGAGTTAATTCAAACCCACGGACATGCTAAGGGTTAATCAACAATCATATCGC
 TGTCTCACTCAGACTCAATACGACACTCAGAATACTATTCTTTCACTCGCACTTATTGCAA
 GCATACGTTAAGTGGATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGACACA
 CGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAAATCCGTTAGCTCTCTCTTTACGC
 GAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAAATTAACAAGAAGCAGAACTCCC
 TAGGAAATTTAAAAATAACTGCACTTCGCTGTTGAAAAATTTGCATACAGTATGTCGCTGT
 GGGTGTATTATTGAGGATGTATGTGTGTATGTGCAAAGGCTAAGCAACA

Figura 5. Secuencia máxima esperada producto de la PCR. El texto subrayado representa los cebadores de PCR. El texto en color verde (243 pb) representa la secuencia amplificada por PCR del extremo 3' de PlacW; el texto en color rojo (179 pb) representa la secuencia máxima amplificada por PCR del exón γ (Giniger *et al.*, 1994); el texto en color azul (61 pb) representa la secuencia amplificada por PCR del intrón en 3' del exón γ .

Haciendo uso de los cebadores diseñados y del DNA genómico previamente extraído se efectuó una PCR siguiendo el protocolo del kit *DNA Amplitools Master Mix (Biotools B & M Labs. S.A., Madrid)*, utilizando el siguiente programa.

Pasos del programa	Temperatura	Duración	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	8 min	1
Desnaturalización	94°C	45 seg	35
Templado	58°C	45 seg	
Extensión	72°C	60 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1
Mantenimiento	4°C	∞	1

Tabla 1. Programa de PCR utilizado para amplificar el DNA genómico.

Clonación del producto de PCR

Se indujo la competencia a una población bacteriana de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* utilizando cloruro de calcio (Sambrook & Russell, 2001). Se estimó la eficacia de transformación, que obtuvo un valor del orden de $1,46 \times 10^7$ UFC/ngDNA.

Se introdujo el producto de PCR en el vector pCR[®]4-TOPO[®] con el cual se transformaron bacterias competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Se dejaron crecer las bacterias transformadas en un medio selectivo con ampicilina y se obtuvieron clones resistentes.

Se hizo una selección por color de las colonias, de modo que se interrumpía el gen de la β -galactosidasa en aquellas que presentaban el inserto en el vector pCR[®]4-TOPO[®]. Luego solo las colonias blancas llevaban el producto de PCR insertado.

El plásmido (pCR[®]4-TOPO[®]) con el producto de la PCR se recuperó de los clones bacterianos por el método de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001). Se comprobó la presencia del

producto de la PCR mediante digestión con *EcoRI*, cuyas dianas flanquean su punto de inserción en el vector pCR[®]4-TOPO[®], y resolución del producto de la digestión en una electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

Secuenciación

Se secuenció el producto de la PCR en el vector pCR[®]4-TOPO[®]. La secuenciación fue llevada a cabo por La Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Se obtuvieron dos secuencias resultado de dicha secuenciación (una obtenida con el cebador M13F y otra con el M13R), se hizo la edición de las mismas (se limpiaron los extremos de las secuencias de indeterminaciones, se alinearon las dos hebras) y se obtuvo la secuencia completa del producto de la PCR (secuencia completa del clon) para su posterior análisis.

Extracción de RNA

A partir de una puesta de 0-20 horas de una línea silvestre (WT) de *D. melanogaster* se realizó una extracción de RNA total siguiendo el método descrito por el protocolo que se adjunta a la *Solución Ultraspec[™] RNA (Biotecx Laboratories Inc., Houston, TX)*. Se extrajo el RNA total presente en los embriones, puesto que el método utilizado no hizo selección específica del mRNA. Se cuantificó el RNA extraído tomando distintas medidas de absorbancia y se obtuvo una concentración de 1266,3 ng/μl y una relación A₂₆₀/A₂₈₀ de 1,99.

RT y PCR con cebadores específicos de *lola*

El RNA total extraído con anterioridad se sometió a retrotranscripción (RT) siguiendo el método descrito en el protocolo del kit *Biotoools High Retrotranscriptase Starter Kit with Random Primer (Biotoools B & M Labs. S.A., Madrid)*.

Los cebadores para la amplificación por PCR se diseñaron de tal modo que el Fw se situaba en el segundo exón de los cuatro denominados constantes de *lola* que están presentes en todos los mRNAs, y el Rv se situaba en el exón contiguo. Así se obtuvieron los cebadores:

- Fw: 5'-AGGGCCTTTCGGACAATC-3'
- Rv: 5'-CCAACGGCACTACCCTCATC-3'

La amplificación por PCR se hizo siguiendo el protocolo del kit *DNA Amplitools Master Mix (Biotoools B & M Labs. S.A., Madrid)*, utilizando el siguiente programa.

Pasos del programa	Temperatura	Duración	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	35
Templado	58°C	30 seg	
Extensión	72°C	60 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1
Mantenimiento	4°C	∞	1

Tabla 2. Programa de PCR utilizado para amplificar el cDNA.

En la *Figura 6.* se representa un esquema del diseño de los cebadores. El producto de amplificación esperado era de 640 pb (*Figura 6A.*), teniendo en cuenta la distancia en pb entre el cebador Fw y el Rv del cDNA. Si el producto de amplificación superaba dicho tamaño era señal de una contaminación por DNA genómico, puesto que se amplificaría también el intrón existente entre el segundo y el tercer exón de los denominados cuatro exones constantes de *lola*. Dicho intrón consta de 223 pb, luego si el producto de amplificación tiene un tamaño de 863 pb (*Figura 6B.*) indicará contaminación por DNA genómico, además de la muestra extraída de RNA.



Figura 6. (A) Representación del producto esperado de PCR en el caso de no haber existido contaminación por DNA genómico. (B) Representación del producto esperado de PCR en el caso de haber existido contaminación por DNA genómico. La longitud de los fragmentos de este no se encuentra representada a escala.

Purificación de sondas

A partir del producto de la amplificación del cDNA (específico de *lola*) se siguió el protocolo del kit *UltraClean® PCR Clean-Up Kit (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA.)* para la purificación de sondas específicas para los mRNA de *lola*.

Marcaje de sondas

Se siguió el protocolo descrito en el kit *DIG DNA Labeling Kit (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea)* hasta obtener sondas marcadas con digoxigenina (DIG). La mezcla de desoxirribonucleótidos empleada en dicho kit contiene DIG-11-dUTP, esto dio como resultado la incorporación de DIG en el DNA recién sintetizado.

Mediante una técnica semejante al Dot Blot se estimó el rendimiento del marcaje gracias a la comparación de la intensidad de color de una serie de diluciones de la sonda marcada, con la intensidad de color de diluciones de un DNA control marcado con DIG de concentración conocida. Tras dicho proceso se estimó una cantidad de sonda marcada de 660 ng.

Hibridación *in situ*

Para la hibridación *in situ* se siguió el proceso de detección de mRNA en embriones de *Drosophila* de Tautz (2000).

Los embriones se obtuvieron de puestas de 0-20 horas de una línea silvestre (WT) de *D. melanogaster*, y fue necesaria su preparación previa (eliminación del corion, fijación, eliminación de la membrana vitelina y permeabilización) al proceso de hibridación *in situ*. Los embriones preparados sufrieron un proceso de prehibridación, en el cual se incubaron con una solución que contenía los mismos componentes que la solución utilizada en la hibridación excepto la sonda, a la misma temperatura que la hibridación (48°C). La hibridación se llevó a cabo incubando los embriones a 48°C con la sonda DIG-marcada previamente desnaturalizada. Ambos procesos (prehibridación e hibridación) se realizaron en presencia de formamida, un solvente orgánico que permite disminuir la temperatura de hibridación.

Las sondas DIG-marcadas fueron detectadas por la adición de anticuerpo anti-digoxigenina (anti-DIG) conjugado a fosfatasa alcalina para su posterior revelado con la solución *NBT/BCIP Stock Solution* (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO.).

Resultados

Análisis molecular del punto de inserción del elemento *PlacW* en el genoma de la línea 5D2 de *Drosophila melanogaster*

En la *Figura 7*. aparece el resultado de la electroforesis en gel de agarosa 0,8% del DNA genómico. Se encontró una banda de un tamaño bastante elevado que se correspondía con el DNA genómico.

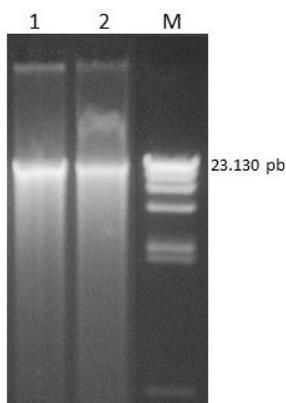


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % del DNA genómico. 1 y 2 corresponden a dos réplicas del DNA genómico; M representa el marcador de peso molecular λ -Hind III.

La *Figura 8*. muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa 0,8% del producto de PCR. Se amplificó un fragmento con un tamaño cercano a los 500 pb, aproximadamente dentro de lo que se esperaba según el diseño de los cebadores.

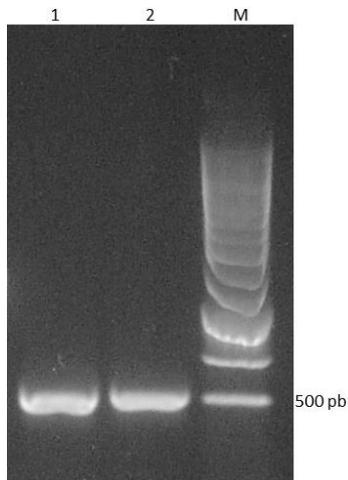


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% del producto de PCR. 1 y 2 representan dos réplicas de la PCR; M representa el marcador de peso molecular HypeLadder500pb.

Se recuperaron los plásmidos pCR[®]4-TOPO[®] de las colonias blancas, los cuales fueron sometidos a una digestión con EcoRI. El producto de la digestión se resolvió en una electroforesis en gel de agarosa 0,8% representada en la *Figura 9.*, en la cual se ve que se obtuvo una banda del orden de 4 kb del vector pCR[®]4-TOPO[®] y una banda cercana a los 500 pb correspondiente al producto de PCR. La banda cercana a los 2 kb correspondería con un topoisomero de cccDNA (DNA circular covalentemente cerrado) sin digerir superenrollado.

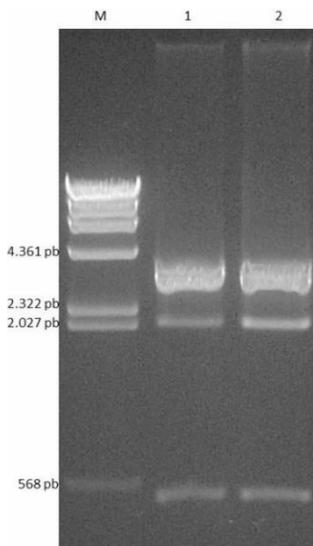


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% de la recuperación del producto de PCR del vector pCR[®]4-TOPO[®]. 1 y 2 representan dos réplicas; M representa el marcador de peso molecular λ -Hind III.

El resultado de la edición del producto secuenciado aparece en la *Figura 10.*, presentaba un tamaño de 507 pb, por lo que excedió en 24 pb el tamaño máximo esperado *a priori* (483 pb) representado en la *Figura 5*.

El resultado de la edición del producto secuenciado (*Figura 10.*) presentaba algunas discrepancias con la secuencia esperada (*Figura 4.*), por ello se tuvo que hacer un análisis *in silico* para localizar el punto exacto de la inserción del elemento PlacW, el cual aparece detallado en el apartado de la discusión.

```

CGACAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTAAAAATAAACTTTAAAAATAATTTTCGTCTAAT
TAATATTATGAGTTAATTCAAACCCACGGACATGCTAAGGGTTAATCAACAATCATATCGC
TGTCTCACTCAGACTCAATACGACACTCAGAATACTATTCTTTCACTCGCACTTATTGCAA
GCATACGTTAAGTGGATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGTGTCC
ATCGATCTCCAACACTAAACACCCGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAA
ATCCGTTAGCTCTCTCTTTACGCGAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAA
ATTAACAAGAAGCAGAACTCGCTAGGAAATTTAAAAAATAACTGCACTTCGCTGTTGAAA
ATTTGCATACAAGTATGTCGCTGTGGGTGTTTATTTGAGGATGTATGTGTGTATGTGCAAAG
GCTAAGCAACA
  
```

Figura 10. Secuencia resultado de la edición del producto secuenciado. El texto subrayado representa los cebadores de PCR.

Estudio de expresión del gen *lola* en una línea silvestre de *Drosophila melanogaster*

En la *Figura 11.* aparece el resultado de la electroforesis en gel de agarosa 0,8% del producto de PCR del cDNA de los mensajeros de *lola*. Se distinguen dos bandas, que según nuestro diseño, el mRNA de *lola* se correspondería con la banda situada más abajo en el carril RT+ de la *Figura 11.* con un tamaño de 640 pb puesto que está situada un poco por encima de la banda de 564 pb del marcador de peso molecular, por tanto, el gen *lola* se transcribe y es activo en dicho estadio. La otra banda, situada algo por encima en el carril RT+ de la *Figura 11.* con un tamaño de 863 pb se correspondería con una contaminación por DNA genómico amplificada en la PCR, dicha contaminación ocurrió en el proceso previo de extracción de RNA.

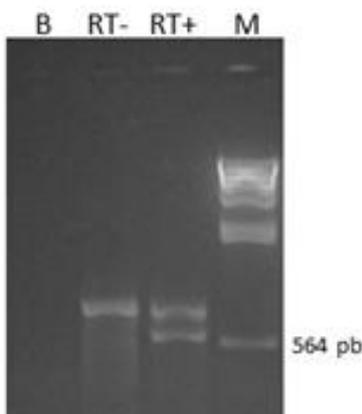


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% del producto de PCR del cDNA de los mensajeros de *lola*. B indica el blanco, RT- indica el control negativo (RNA resultado de la extracción), RT+ indica la muestra donde se había cargado el cDNA, M representa el marcador de peso molecular λ -Hind III.

Los mRNA de *lola* fueron visualizados tras el proceso de hibridación *in situ*. En la *Figura 12*. aparecen fotografías de algunas etapas del desarrollo embrionario de los embriones de *D. melanogaster* WT sobre los que se realizó la hibridación *in situ*. Se siguió la nomenclatura descrita por Hartenstein (1993) para diferenciar las diferentes etapas del desarrollo embrionario. Se ve marcaje sobre mRNA de *lola* desde etapas muy tempranas del desarrollo, entre los estadios embrionarios 1 y 5 (*Figura 12A.*), hasta un estadio embrionario cercano al 16 (*Figura 12D*). En nuestra preparación no se pudieron apreciar estadios posteriores, pese a que está descrito que existe marcaje en ellos.

Se detectaron mRNAs de *lola* en el SNC desde un estadio embrionario cercano al 9 (*Figura 12B.*), hasta un estadio embrionario entre el 15 y 16 (*Figura 12D.*), mientras que en el SNP no detectaron mRNAs de *lola* hasta un estadio embrionario cercano al 15-16 (*Figura 12D.*).

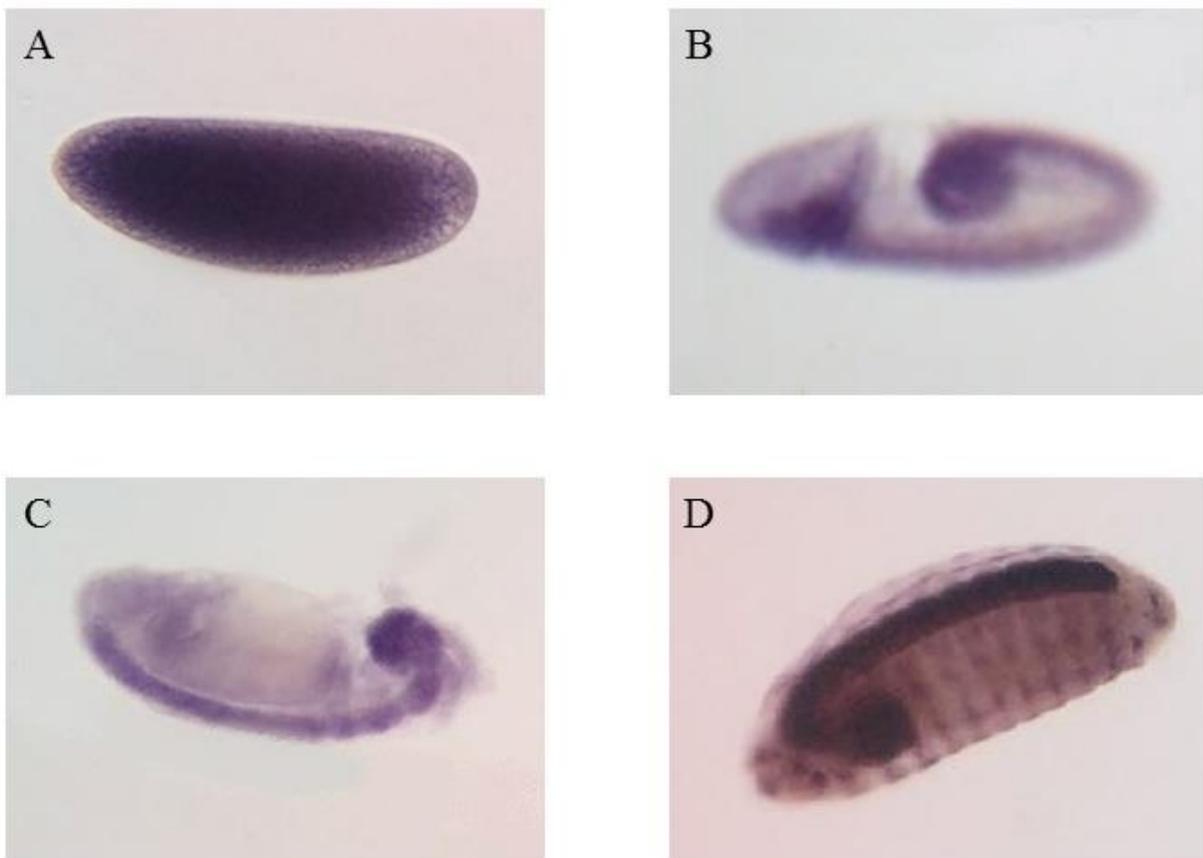


Figura 12. Distribución espacio-temporal del mRNA de *lola* durante diferentes fases del desarrollo embrionario de *D. melanogaster* WT. (A) Estadio embrionario entre 1 y 5. (B) Estadio embrionario cercano al 9. (C) Estadio embrionario ligeramente anterior al 13. (D) Estadio embrionario entre 15 y 16. Estadios embrionarios descritos según Hartenstein (1993).

Discusión

Análisis molecular del punto de inserción del elemento PlacW en el genoma de la línea 5D2 de *Drosophila melanogaster*

El producto secuenciado (*Figura 10.*) se comparó con la secuencia mixta (*Figura 3.*), utilizando la herramienta *Align Sequences Nucleotide BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El resultado aparece representado en la *Figura 13.* Se apreciaron 23 pb entre el extremo 3' del elemento PlacW y el comienzo del *exón γ* del producto secuenciado que no aparecían en la secuencia mixta.

```
CGACAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTTAAAAATAAACTTTAAAAATAATTTTCGTCTAAT
TAATATTATGAGTTAATTCAAACCCACGGACATGCTAAGGGTTAATCAACAATCATATCGC
TGTCTCACTCAGACTCAATACGACACTCAGAATACTATTCTTTCACTCGCACTTATTGCAA
GCATACGTTAAGTGGATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGTGTCC
ATCGATCTCCAACACTAAACACC CGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAA
ATCCGTTAGCTCTCTCTTTACGCGAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAA
ATTAACAAGAAGCAGAACTCGCTAGGAAATTTAAAAAATAACTGCACCTTCGCTGTTGAAA
ATTTGCATACAAGTATGTCGCTGTGGGTGTTTATTTGAGGATGTATGTGTGTATGTGCAAAG
GCTAAGCAACA
```

Figura 13. Secuencia resultado del alineamiento entre el producto secuenciado y la secuencia mixta. El texto subrayado representa los cebadores de PCR. El texto en color verde (243 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el extremo 3' de PlacW; el texto en color rojo (177 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el *exón γ* (Giniger *et al.*, 1994); el texto en color azul (61 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el intrón en 3' del *exón γ*. El texto resaltado en color gris (2 pb) indica los pb del producto de secuenciación que discrepan con los de la secuencia mixta; El texto resaltado en color amarillo (23 pb) indica los pb adicionales del producto de secuenciación que no aparecen en la secuencia mixta; El texto resaltado en color fucsia (1 pb) indica el pb adicional del producto de secuenciación que no aparece en la secuencia mixta debido a un error experimental, puesto que cuando se construyó la secuencia mixta no se consideró dicho pb como perteneciente al *exón γ* descrito por Giniger *et al.* (1994) cuando sí lo era.

Se desconocía a que parte del genoma pertenecían esos 23 pb, por ello se comparó la secuencia del producto secuenciado (*Figura 10.*) con el genoma de *D. melanogaster* utilizando la herramienta *BLAST* (<http://flybase.org/blast/>) para ver si esos 23 pb pertenecían a dicho genoma. El alineamiento, mostrado en la *Figura 14.*, comenzaba en el pb 243 de la secuencia del producto secuenciado, es decir, en la base anterior a esos 23 pb de origen desconocido, lo que indica de forma clara que esos 23 pb sí pertenecen al genoma de *D. melanogaster*. Además se observó que esa base 243 del producto de secuenciación estaba alineada con la base 10534381 del genoma de *D. melanogaster* lo que indica que PlacW se encuentra insertado entre esa base y la anterior.

```

CGACAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTAATAATAAACTTTAAAAATAATTTTCGTCTAAT
TAATATTATGAGTTAATTCAAACCCACGGACATGCTAAGGGTTAATCAACAATCATATCGC
TGTCTCACTCAGACTCAATACGACACTCAGAATACTATTCTTTCACTCGCACTTATTGCAA
GCATACGTTAAGTGGATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGTGTCC
ATCGATCTCCAACACTAAACACCCGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAA
ATCCGTTAGCTCTCTCTTTACGCGAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAA
ATTAACAAGAAGCAGAACTCGCTAGGAAATTTAAAAAATAACTGCACTTCGCTGTTGAAA
ATTTGCATACAAGTATGTCGCTGTGGGTGTTTATTTGAGGATGTATGTGTGTATGTGCAAAG
GCTAAGCAACA

```

Figura 14. Secuencia resultado del alineamiento entre el producto de secuenciación y el genoma de *D. melanogaster*. El texto resaltado en color gris (242 pb) indica los pb del producto de secuenciación que discrepan con el genoma de *D. melanogaster*.

Se hizo un *BLAST* (<http://flybase.org/>) en el que se comparó una secuencia formada por los 23 pb y el exón γ con todos los mRNA de *D. melanogaster* para comprobar si esos 23 pb aparecían en algún mensajero de *D. melanogaster* (alineamiento no mostrado). Todos los mensajeros comenzaban por el pb 27, por tanto ni los 23 pb ni los 3 pb siguientes parecen pertenecer al exón γ .

Se buscó el exón γ en la base de datos de exones de *lola* de FlyBase (<http://flybase.org/>) y se comprobó la secuencia descrita en la actualidad para dicho exón, la cual se muestra en la *Figura 15*.

```

CCCGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAAATCCGTTAGCTCTCTCTTTAC
GCGAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAAATTAACAAGAAGCAGAACTC
GCTAGGAAATTTAAAAAATAACTGCACTTCGCTGTTGAAAATTTGCATACAA

```

Figura 15. Secuencia del exón γ del gen *lola* (<http://flybase.org/>). El texto en negrita (2 pb) representa las discrepancias entre el exón γ descrito por Giniger *et al.* (1994) y el exón γ descrito en la actualidad.

La secuencia del exón γ descrita en la actualidad (*Figura 15*), con 177 pb, concuerda con los resultados de la secuenciación y explica las discrepancias entre los resultados de la secuenciación y el exón γ descrito por Giniger *et al.* (1994):

- El exón γ descrito por Giniger *et al.* (1994) constaba de 179 pb pues consideraba parte del exón 2 pb más en 5' con respecto al exón descrito en la actualidad.
- Los pb en posición 2 y 125 del exón γ descrito en la actualidad no presentan las mismas bases que sus equivalentes (en posiciones 5 y 128 respectivamente) en el exón γ descrito por Giniger *et al.* (1994).

Los 26 pb de origen desconocido debían pertenecer a un intrón, pues no aparecían en los mensajeros. Para comprobarlo se acució a la base de datos de intrones de *lola* (<http://flybase.org/>) y se buscó la secuencia de 26 pb obteniendo un resultado positivo. Luego los 26 pb pertenecen al intrón situado en 5' del *exón* γ descrito en la actualidad.

Todo lo discutido hasta el momento aparece representado en la *Figura 16.*, y de forma algo más esquemática en la *Figura 17.*

```

CGACAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTTAAAAATAAACTTTAAAAATAATTTTCGTCTAAT
TAATATTATGAGTTAATTCAAACCCACGGACATGCTAAGGGTTAATCAACAATCATATCGC
TGTCTCACTCAGACTCAATACGACACTCAGAATACTATTCTTTCACTCGCACTTATTGCAA
GCATACGTTAAGTGGATGTCTCTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGTGTCC
ATCGATCTCCAACACTAAACACCCGCAGTCGGGAAGCAGAAGCAGCAGCAACTGTAACACAA
ATCCGTTAGCTCTCTCTTTACGCGAGAGCGTGATTAGTGTAGGGAAAGAGCAAAGTTGAAAA
ATTAACAAGAAGCAGAACTCGCTAGGAAATTTAAAAATAACTGCACCTCGCTGTTGAAA
ATTTGCATACAAGTATGTCGCTGTGGGTGTTTATTTGAGGATGTATGTGTGTATGTGCAAAG
GCTAAGCAACA

```

Figura 16. Secuencia resultado de la edición del producto secuenciado. El texto subrayado representa los cebadores de PCR. El texto en color verde (243 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el extremo 3' de PlacW; el texto en color negro (26 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el intrón en 5' del *exón* γ ; el texto en color rojo (177 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el *exón* γ (<http://flybase.org/>); el texto en color azul (61 pb) representa la secuencia del producto de secuenciación que se corresponde con el intrón en 3' del *exón* γ .

Se concluyó que PlacW está insertado en el gen *lola*, entre las bases 10534380 y 10534381 (<http://flybase.org/>), que corresponden al intrón anterior al *exón* γ .

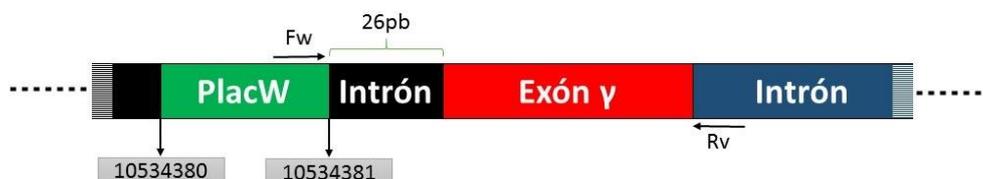


Figura 17. Representación del punto de inserción de PlacW en el gen *lola*. La longitud de los fragmentos de este no se encuentra representada a escala.

La posición de la inserción del elemento PlacW 26 pb aguas arriba del *exón* γ (*Figura 17.*) no se ajustaba a lo esperado, pues Giniger *et al.* (1994) habían descrito su posición dentro del *exón* γ . La hipótesis más plausible es que la inserción de PlacW, elemento P modificado de gran tamaño (10699 pb), a tan solo 26 pb de la unión entre el *exón* γ y el intrón situado en 5' de este podría afectar al proceso de *splicing* por el cual se elimina dicho intrón, podría ocurrir que el proceso de eliminación del intrón no ocurra, o sea incorrecto al afectar a cualquiera de los pasos

de transesterificación de tal modo que el intrón no pudiera ser reconocido por la maquinaria del espliceosoma (Jiménez García *et al.*, 2007), de modo que el intrón no se elimine o se elimine de manera incorrecta, ello quedaría reflejado fenotípicamente como una mutación del *exón γ*. Este hecho explicaría por qué Giniger *et al.* (1994) consideraron que PlacW estaba insertado dentro del *exón γ*.

Estudio de expresión del gen *lola* en una línea silvestre de *Drosophila melanogaster*

El gen de *lola* consta de 32 exones alineados en la misma cadena de ADN, 4 de esos exones aparecen en todos los mRNA de *lola*, y es por ello que reciben el nombre de exones constantes. Se pueden formar al menos de 20 isoformas de proteínas que se producen a través de *splicing* alternativo (Horiuchi & Aigaki, 2006), cada una de las cuales está implicada en distintos procesos de crecimiento y orientación de los axones (Horiuchi *et al.*, 2003), además las diferentes isoformas de *lola* se pueden dimerizar (Goeke *et al.*, 2003).

Para conseguir unas sondas que se uniesen a todos los mRNAs de *lola* se hizo un diseño de tal forma que las sondas fuesen complementarias a los exones constantes de *lola*. Si se hubiese querido hacer un estudio más concreto, sobre alguno de los mRNA de *lola* en particular, se podría haber diseñado la sonda de modo que fuese complementaria de exones que aparecen específicamente en alguno de los mRNAs.

Como ya demostraron Giniger *et al.* (1994) y Goeke *et al.* (2003) por hibridación *in situ*, la expresión de los distintos mRNAs de *lola* en el SNC se produce entre los estadios embrionarios 5 y 17, pues dicho gen está implicado en una enorme cantidad de procesos relacionados con la orientación y la trayectoria de los axones que tienen lugar durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, los mRNAs de *lola* en el SNP comenzarían a visualizarse durante el estadio embrionario 12 (Giniger *et al.* 1994), puesto que *lola* también desempeña un papel importante en el proceso de orientación de los axones en el SNP (Crownner *et al.*, 2002), como demuestra la línea k09901 descrita por Kania *et al.* (1995) en la cual una mutación por inserción de un elemento PlacW en *lola* impide el correcto desarrollo del SNP. Por tanto nuestros resultados de expresión espacio-temporal obtenidos de la hibridación *in situ* (Figura 12.) se ajustan a los patrones de expresión previamente descritos.

En la Figura 12A. se aprecia una elevada expresión de mRNA de *lola* en estadios del desarrollo previos a los descritos por distintos autores, esto se debe a que ese mRNA no procedería de la expresión de *lola* del propio embrión, sino que tendría origen materno (Giniger *et al.* 1994).

Luego está descrita por varios autores la distribución espacio-temporal del mRNA de *lola* durante diversas fases del desarrollo embrionario. En nuestro caso, en las preparaciones de embriones no aparecían representados estadios embrionarios posteriores al 15-16. Por tanto, nuestros resultados están comprendidos dentro de los descritos por otros autores, pero no llegan a abarcar todas las etapas en las que se ha descrito presencia de mRNA de *lola*: en las preparaciones de embriones se vio expresión de *lola* por marcaje de sus mRNAs en el SNC hasta el estadio embrionario 15-16 (*Figura 12D.*) aunque se sabe que dicha expresión se prolonga hasta el estadio embrionario 17; se consiguió ver expresión de *lola* por marcaje de sus mRNAs en el SNP en un estadio entre 15 y 16 (*Figura 12D.*) aunque se sabe que su expresión comienza antes, concretamente en el estadio 12.

Conclusiones

En la línea 5D2 de *D. melanogaster* PlacW está insertado en el gen *lola*, entre las bases 10534380 y 10534381, que corresponden al intrón anterior al *exón* γ .

La inserción de PlacW en la línea 5D2 de *D. melanogaster* se produce en DNA no codificante e impide el correcto funcionamiento del gen *lola*.

El gen *lola* se transcribe y es activo durante el desarrollo embrionario de la línea silvestre de *D. melanogaster*.

El gen *lola* se expresa durante diferentes estadios del desarrollo embrionario de *D. melanogaster* en el SNC y SNP.

Referencias bibliográficas

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A. *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185–2195.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.

Attrill, H., Falls, K., Goodman, J. L., Millburn, G. H., Antonazzo, G., Rey, A. J., Marygold, S. J. *The FlyBase Consortium*. [en línea]. <<http://flybase.org/>> [Consulta: 21-04-2016; Versión: 2016_02 publicado 30-03-2016]

Base de datos de exones de lola. [base de datos en línea]. The FlyBase Consortium. <<http://flybase.org/cgi-bin/getseq.html?source=dmel&id=FBgn0283521&chr=2R&dump=Pre>

[compiledFasta&targetset=exon](#)> [Consulta: 21-04-2016; Versión: 2016_02 publicado 30-03-2016]

Base de datos de intrones de lola. [base de datos en línea]. The FlyBase Consortium. <<http://flybase.org/cgi-bin/getseq.html?source=dmel&id=FBgn0283521&chr=2R&dump=PrecompiledFasta&targetset=intron>> [Consulta: 21-04-2016; Versión: 2016_02 publicado 30-03-2016]

Base de datos de nucleótidos. [base de datos en línea]. National Center for Biotechnology Information, United States National Library of Medicine. Rockville. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>> [Consulta: 21-04-2016]

Beumer, K., Bhattacharyya, G., Bibikova, M., Trautman, J. K., Carroll, D. 2006. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 172(4): 2391-2403.

Brand, A. H., Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2): 401-415.

Cooley, L., R. Kelley, and A. Spradling. 1988. Insertion mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P-elements. *Science*, 239: 1121-1128.

Crowner, D., Madden, K., Goeke, S., Giniger, E. 2002. Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development*, 129: 1317–1325.

Giniger, E., Tietje, K., Jan, L.Y., Jan, Y.N. 1994. *lola* encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in *Drosophila*. *Development*, 120: 1385–1398.

Goeke, S., Greene, E.A., Grant, P.K., Gates, M.A., Crowner, D., Aigaki, T., and Giniger, E. 2003. Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in *Drosophila*. *Nature Neurosci.*, 6: 917–924.

Greenspan, R. J. 2004. Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. 191 págs. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Hartenstein, V. 1993. Atlas of *Drosophila* Development. 57 págs. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Horiuchi T, Giniger E, Aigaki T. 2003. Alternative *trans*-splicing of constant and variable exons of a *Drosophila* axon guidance gene, *lola*. *Genes and development*, 17: 2496–2501.

Horiuchi T., Aigaki T. 2006. Alternative *trans*-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biol. Cell*, 98: 135–140.

- Jiménez García L., Lara Martínez R., Gil Chavarría I., Zamora Cura A., Salcedo Álvarez M., Agredano Moreno L., Moncayo Sahagún J., Segura Valdez M. 2007. Biología celular del *splicing*. *Mensaje bioquímico*, 31: 141-156.
- Kania, A., Salzberg, A., Bhat, M., D'Evelyn, D., He, Y., Kiss, I., Bellen, H.J. 1995. P-element mutations affecting embryonic peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 139(4): 1663—1678
- Madden, K., Crowner, D., Giniger, E. 1999. *lola* has the properties of a master regulator of axon–target interactions for SNb motor axons of *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 213: 301–313.
- Marcus J.M., Hughes T.M. 2009. *Drosophila* Transposon Insertions as Unknowns for Structured Inquiry Recombination Mapping Exercises in an Undergraduate Genetics Course. *Genetics*, 182(2):417-422.
- Orphanides, G., Reinberg, D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell*, 108: 439–451.
- Roberts D. B. 1998. Preparation of nucleic acids. En: Hames B. D. *Drosophila a practical approach*. págs 347-371. Oxford University Press Inc. New York.
- Rubin, G.M., Spradling, A. C. 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218. 348-353.
- Sambrook, J., Russell D. W. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., Goodman, C.S. 1993. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance towards or away from the midline. *Neuron*, 10: 409–426.
- Tautz D. 2000. Whole mount in situ hybridization for the detection of mRNA in *Drosophila* embryos. En: Kessler C. *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*. págs. 573-580, Springer Lab Manual. New York.
- Zhongsheng, Y., Renjie, J. 2010. Advances in *Drosophila* gene targeting and related techniques. *Front. Biol.*, 5(3): 238–245.