



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN DE TRES CIRCUITOS NEURONALES
EN Drosophila melanogaster

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

CRISTINA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE REYNAUD GARZA

2005

m. 340242



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Dr. José Narro Robles
Director
Facultad de Medicina, UNAM
Presente.

Por este conducto le informamos que la tesis "Caracterización de dos circuitos neuronales en *Drosophila melanogaster*", dirigida por el Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, que presenta la alumna: **Cristina Martínez González** con número de cuenta 096335374, reúne los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto los suscritos miembros del Jurado otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen.

Atentamente.

Dra. Clorinda Arias Álvarez

Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Dr. Rafael Camacho Carranza

Dra. Diana Escalante Alcalde

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a recibir en formato electrónico o impreso el
contenido de mi trabajo recreacional.

NOMBRE Cristina Martínez
González

FECHA 21-enero-2005

FIRMA ft

Índice	1
Antecedentes	2
<i>Introducción</i>	3
Objetivos	16
Metodología	17
Materiales y Métodos	24
Resultados:	
Línea IDB3A	30
Línea 2A2δ	36
Línea 3A42	42
Discusión	43
Perspectivas	56
Referencias	57

Antecedentes:

¿Cómo lleva a cabo sus funciones el sistema nervioso? Esta es una pregunta fascinante y muy amplia; ¿Cómo el cerebro es capaz realizar una gran cantidad de procesos tan complejos como el aprendizaje? El enfoque tradicional de la genética relacionaba un gen con una función de manera directa. Esta estrategia, que ha sido muy exitosa, busca atribuir un fenotipo a un gen, y deja a un lado otros niveles de regulación también muy interesantes como la interacción entre neuronas y estructuras cerebrales.

En mamíferos, se ha observado que existe una correlación entre ciertos estímulos y la actividad de diversas áreas del cerebro, de esta forma se ha podido asociar regiones de la corteza cerebral con la memoria a corto plazo (Deco *et al.*, 2003. Satoru., 2003). La alta complejidad y la no linealidad de las interacciones en el cerebro nos permite, en parte, explicar los comportamientos complejos de los seres vivos. Por ejemplo lo que vemos de forma general en un proceso como la memoria a largo plazo es la síntesis de proteínas en una ventana de tiempo, expresadas en un grupo de neuronas funcionalmente relacionadas, lo que conduce a la función (Bailey CH, Kandel ER, Si K. 2004).

La relación entre la estructura y la función se hace evidente cuando se daña una región del cerebro y se observa un fenotipo; y si tomamos en cuenta que al mutar un gen dado observamos también un fenotipo específico, podemos vislumbrar la compleja regulación que existe en los procesos del sistema

nervioso central. La idea de una regulación a un nivel celular o estructural es consistente con el concepto de control genético.

El cerebro es capaz de realizar funciones complejas debido a la intrincada red de interacciones entre sus componentes. En el desarrollo neuronal, millones de neuronas funcionan como unidades fundamentales que forman conexiones sinápticas, con ayuda de herramientas moleculares podemos ver estas interacciones como circuitos definidos relacionados con funciones biológicas características, como la motilidad. Por esta razón comprender la complejidad del sistema nervioso de un animal superior requiere de un análisis detallado a muchos niveles tales como el genético, el celular, el fisiológico y el desarrollo. Para nosotros es particularmente interesante estudiar como las neuronas interactúan formando circuitos neuronales que controlan funciones específicas.

Introducción:

Si algo nos ha mostrado la historia de la neurobiología es que el desarrollo del sistema nervioso es extremadamente complejo. El estudio de redes o circuitos neuronales es un importante tema de estudio para entender cómo funciona el sistema nervioso (Hua JY *et al.*, 2004). La formación de redes neuronales se da por la "creación" o "destrucción" de conexiones sinápticas entre un subgrupo de neuronas interconectadas. Es así como podemos relacionar la función genética con la regulación a nivel celular; por ejemplo los genes involucrados con el transporte retrogrado y anterogrado en las neuronas, que se expresan diferencialmente en una población definida de neuronas y glía durante el desarrollo, conducen a la formación de estructuras en el cerebro involucradas

en una función determinada. En el ratón se han estudiado ampliamente la formación de estos circuitos neuronales con diversos marcadores moleculares y celulares en los que se han encontrado mapas definidos de conexiones en el hipocampo, con un nivel de precisión de una sola neurona (Maskos. *et al.* 2002).

Si bien estudiar el sistema nervioso de un mamífero es sin duda la aproximación más interesante, es difícil desde el punto de vista metodológico, por eso elegimos un modelo que nos permita una mayor cantidad de herramientas técnicas para su estudio. Un modelo con un sistema nervioso lo suficientemente complejo como para realizar comportamientos específicos y con un número razonable de neuronas como para ser analizadas.

Tal es el caso de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que cuenta con aproximadamente doscientas mil neuronas, éste sistema nervioso relativamente pequeño entre los insectos de vida libre, le permite tener conductas complejas como el aprendizaje, y es un modelo sencillo de estudio en comparación con mamíferos y otros organismos. *Drosophila* es un organismo que permite utilizar una gran cantidad de herramientas genéticas, moleculares y celulares para su estudio; la mosca de la fruta ha sido por muchos años un modelo ideal para estudios de genética y es utilizada por muchos de grupos de investigación como un sistema para resolver preguntas acerca del sistema nervioso. No es casualidad que se haya usado a la mosca de la fruta como uno de los primeros modelos del desarrollo del sistema nervioso. *D. melanogaster* tiene la característica de tener una recombinación casi nula en los machos (Hiraizumi. 1971), la ventaja de poder marcar cada cromosoma y mantener líneas estables con "balancers" (cromosomas que no recombinan), y miles de líneas con mutaciones, inserciones, deleciones y genes reporteros. Su genoma esta

secuenciado en su totalidad y existe una gran variedad de técnicas diseñadas y estandarizadas que permiten resolver muchas preguntas. Una ventaja de *D. melanogaster* como modelo, es que se ha descrito con gran detalle tanto su ciclo de vida como la organización básica de su sistema nervioso a lo largo de sus diferentes estadios de vida (Demerec., 1946. Hertweck., 1931. Taylor., 1992).

El ciclo de vida de *D. melanogaster* desde el huevo hasta la eclosión del individuo adulto es de 8 días a 25 C. La embriogénesis comienza con 13 rápidas divisiones sincrónicas del núcleo ya fecundado, y posterior a esto sucede la celularización. A partir de este momento se le conoce como blastodermo celular.

Éste consta de 17 estadios, a largo de los cuales se llevan a cabo cambios morfológicos importantes como la gastrulación (estadio 6-8), en donde se forman las tres capas celulares más importantes para la formación de los tejidos especializados que tendrán lugar en la larva (Bate and Martínez., 1993).

El sistema nervioso central (SNC) de la mosca se forma durante las primeras 24 horas de la embriogénesis. En las etapas más tempranas (estadios 5-7) las células de la parte polar y la parte media ventral del blastodermo se invaginan, con este movimiento se generan tres capas celulares: las que células que permanecen en la superficie se les conoce como ectodermo, y las que se invaginan endodermo y mesodermo. La región ventral media del ectodermo se convierte en el neuroepitelio formado de una lámina uniforme de células ectodermales. Durante la gastrulación (estadio 8) el ectodermo, mediante una delaminación, da origen precursores neurales llamados neuroblastos (NB). Después de la gastrulación éstos NB comienzan a segregarse para empezar a

dividirse. Cada uno de ellos, a través de 70 divisiones asimétricas en promedio, genera un linaje propio. (Doe., 1985. Doe., 1992; Broadus *et al.*, 1995, Bossing., 1996).

Las células provenientes de un mismo linaje embrional mantienen esta identidad en la larva y el adulto. Al rededor del estadio 13 comienza la diferenciación neuronal y en el último estadio el sistema nervioso central esta prácticamente formado y se reconocen las estructuras del cerebro y del ganglio compuesto. (Hartensen., 1993) (Fig.1).

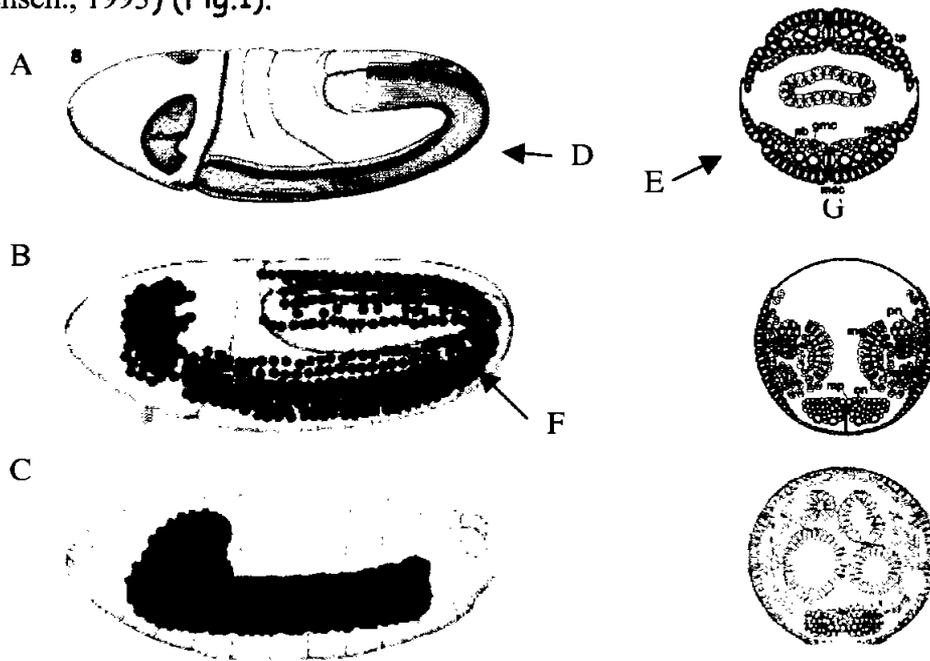


Fig. 1 Embrión de larva con su respectivo corte transversal. A- estadio 8. B- estadio 9. C- estadio 17. D- Región ventral neurogénica (vino). E- Neuroblastos (azul oscuro) F- Mesoectodermo (azul claro) G- Mesodermo H- Cerebro (neuronas y células progenitoras color morado) (Modificado de Hartensen., 1993).

La actividad funcional del sistema nervioso se define por el comienzo de los movimientos musculares después de las primeras 12 horas de vida del embrión; además de la aparición de actividad de acetilcolinesterasa en el SNC, la cual no es apreciable antes de las 10 horas, y posteriormente el pico en la actividad de

ésta enzima corresponde al periodo de mayor movimiento en la larva (Poulson and Boell, 1946).

La larva pasa a través de tres estadios y de dos mudas. La primera ocurre a las 25 horas, la segunda a las 48 horas y finalmente la formación del pupario alrededor del cuarto día.

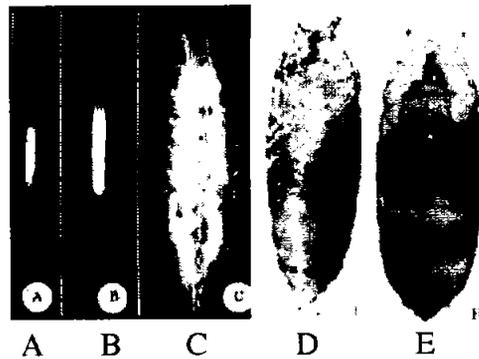


Fig. 2 Estadios Larvares y Pupaes de *D. melanogaster*. A-Primer instar. B- Segundo instar. C-Tercer instar. D-Prepupa. E-Pupa (Modificado de Demerec., 1946)

En la larva el sistema nervioso central se localiza en el tercer segmento torácico ocupando hasta el final del primer segmento abdominal (Fig.3) y en la pupa y el adulto se localiza dentro de la cabeza y el tórax (Fig.4).

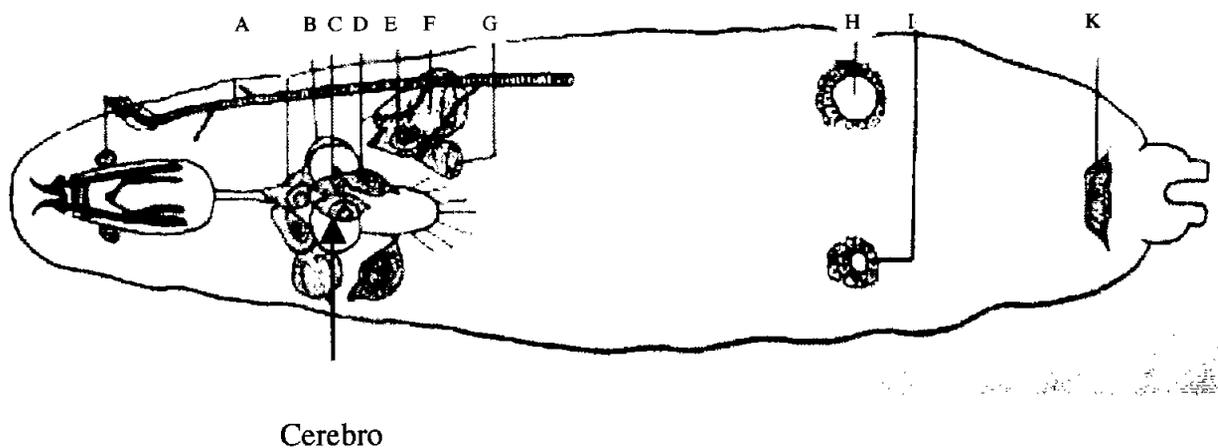


Fig.3 Larva de tercer Instar. A.-Traquea. B.- Disco Antenas. C.- Disco Ojo. D.-Disco Primer Par Patas. E.-Disco Segundo Par Patas. F.-Disco Tercer Par Patas. G.- Disco Alas. H.- Disco de Alterio. I.-Testículos. J.-Ovarios. K.-Discos Genitales (Modificado de Demerec., 1946).

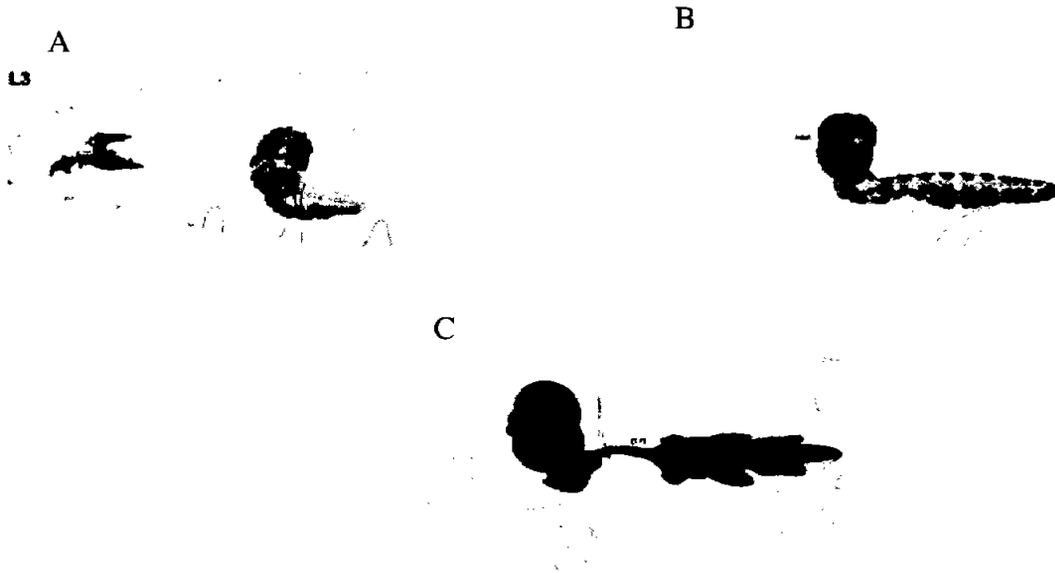


Fig.4 Localización del sistema nervioso central en el desarrollo de *D. melanogaster*. A.- Larva de tercer Instar. B.-Pupa. C.-Adulto. (Modificada de Hartenstein, 1993)

El cerebro de la larva consta de dos hemisferios, y un ganglio ventral compuesto. Los dos hemisferios están conectados entre si en la parte ventral. Toda la estructura de la cabeza está conectada a través ganglio subesofágico con el ganglio ventral compuesto (ganglio torácico-abdominal ó GTA). El GTA está compuesto por tres pares de segmentos del ganglio torácico y ocho pares del ganglio abdominal. La región más anterior del ganglio ventral inerva a los músculos maxilares, los músculos de la cabeza y órganos sensores de esta región. Del primer y segundo ganglio torácico surgen los nervios del primer y segundo par de patas, además del primer y segundo segmento torácico y órganos sensores de esta región. El tercer ganglio inerva al tercer segmento torácico directamente y de forma indirecta esta comunicado con el tercer par de patas (Demerec, M., 1950) (Fig. 5).

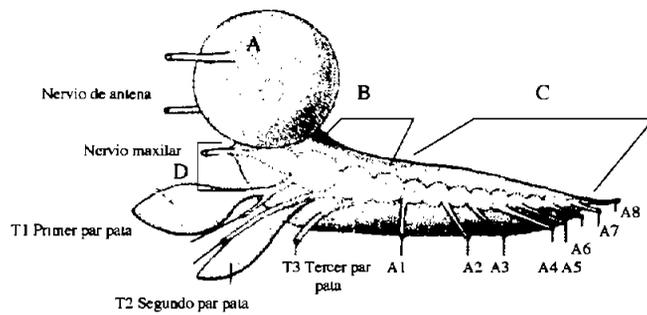


Fig. 5. Cerebro de larva de tercer instar vista lateral A.-lóbulo óptico. B.-Ganglios torácicos T1-3. C.-Ganglios abdominales 1-8. D.- Ganglio Subesofágico. (Modificado de Demerec., 1946)

En la larva, la proliferación neuronal es completada poco antes de convertirse en pupa y la metamorfosis es el momento en el desarrollo para la maduración y/o remodelación de las nuevas neuronas adulto-específicas (Truman., 1988) (Fig.6).

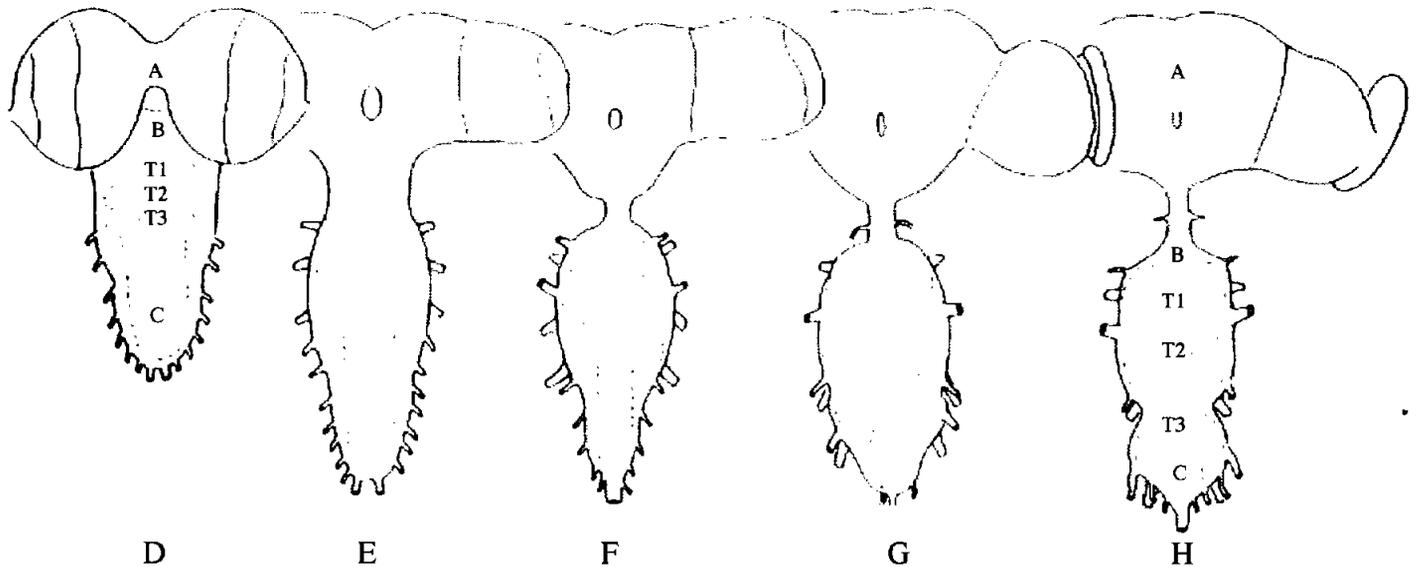


Fig. 6. Cambios del SNC de Drosophila durante la metamorfosis. A.- Cerebro. B.-Neurómeros Torácicos 1-3. C.-Neurómeros Abdominales D.-Pupación. E.-12 horas después de pupar. F.- 24 horas. G.-48 horas. H.-78 horas (Modificado de Truman, 1990)

La metamorfosis empieza cuando la larva deja de alimentarse aproximadamente al cuarto día, sus movimientos cesan totalmente, everta sus espiráculos y se transforma en un pupario inmóvil. Después de esto la cutícula se torna rígida para proteger a la pupa en su interior, mientras se diferencia a la etapa adulta. La estructura de la cabeza everta alrededor de las 12 horas después del inicio de la pupación y tres días después la mosca adulta emerge. La mosca adulta tiene la estructura de la cabeza bien desarrollada, y contiene a las estructuras de los ojos y las antenas, mientras que el tórax y parte del abdomen llevan a cabo las funciones motoras pues se encuentran en el las patas, las alas (Fig.7).

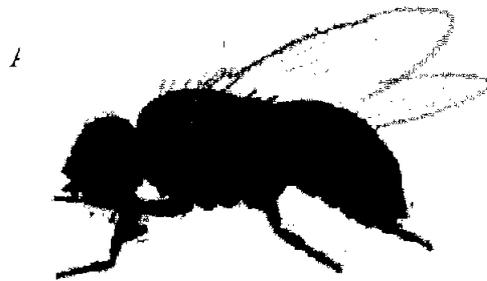


Fig.7 A.-Mosca adulta. Ojos color rojo. Cabeza color naranja. Tórax color amarillo. Patas y alas color café. Abdomen color verde (Modificado de Hartenstein., 1993)

El que la anatomía del cerebro de la mosca esté tan bien caracterizada, ha convertido a *Drosophila* en un modelo pionero en el estudio de circuitos neuronales. Los primeros descubrimientos acerca de desarrollo neuronal fueron hechos este modelo y poco a poco fueron extrapolados a mamífero. Se han hecho mapas con el número y posición exacta de diferentes NBs, en cada segmento del ganglio torácico, además de que se ha caracterizado la identidad de su linaje (Bossing, 1996. Schmidt, 1997). Muchos de los mapas neuronales y la

identificación de los genes involucrados en el desarrollo del SNC se han logrado identificar mediante estrategias genéticas (Klamt and Goodman, 1991). Normalmente las búsquedas han sido en screenings o búsquedas de pérdida de función, en los que la disrupción de un gen se reflejaba en un fenotipo dado (Seeger *et al.*, 1993, Salzberg *et al.*, 1997, Hummel *et al.*, 2000). Ésta es una metodología muy usada y ampliamente validada pero tiene un problema y es que hay genes que escapan a esta clase de búsqueda, pues la redundancia puede compensar la pérdida de un gen y no ver el fenotipo de la forma en que lo estamos buscando. Se ha estimado que dos terceras partes de los genes no son fácilmente identificados por esta clase de técnicas (Huang *et al.*, 2000). Es por esto que otras aproximaciones como los screenings de ganancia de función al igual que la expresión ectópica de genes son una alternativa y pueden usarse de forma conjunta para tener un panorama mas completo.

Nuestra aproximación para entender un poco mas acerca del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* es caracterizar circuitos neuronales característicos que causan fenotipos motrices, causados por la inserción de un elemento P que atrapo las secuencias regulatorias de genes del sistema nervioso central. Esta técnica se llama "Enhancer Trap" (O'Kane and Gehring. 1987), que combinada con el sistema bipartito UAS/GAL4 (Brand and Perrimon. 1998) es especialmente adecuada para nuestros objetivos.

El sistema UAS-GAL4 utiliza dos módulos funcionalmente independientes UAS y GAL4.

El gen GAL4 codifica para una proteína de 881 aminoácidos que se une al DNA de forma dimérica. Fue identificada en *Saccharomyces cerevisiae* como un

regulador transcripcional maestro de la transcripción. Se ha estudiado y demostrado el papel de *GAL4* como activador transcripcional (Ptashne., 1988) y se ha corroborado que su unión al DNA es directa y específica a una secuencia específica conocida como upstream activator sequences (UAS) (Giniger, *et al.*, 1985). *GAL4* no tiene secuencias blanco en el genoma de *Drosophila* y ha sido expresando en diversos tipos celulares sin presentar efectos o toxicidad alguna (Laughton and Gesteland., 1984).

Se ha demostrado que *GAL4* es capaz de activar la transcripción de genes reporteros que se encuentran bajo el control de secuencias UAS en diversos organismos, incluyendo *Drosophila melanogaster* (Fischer *et al.* 1988)

Primero tenemos una línea de mosca que tiene insertado un elemento P-*GAL4*, éste tienen la capacidad de "atrapar" las secuencias regulatorias de genes vecinos, expresando así *GAL4* en un patrón espacio temporal similar al del gen capturado y por otro lado tenemos una línea de moscas que tiene las secuencias UAS fusionadas a un gen reportero.

Cuando se cruzan estas dos líneas de mosca, en la progenie que hereda ambos elementos, se observa un fenotipo. Por lo tanto a menos que *GAL4* se encuentre presente, el gen reportero se encontrará apagado.

Una cualidad muy importante este sistema es que podemos dirigir la búsqueda de forma tejido específica con respecto al tipo de gen reportero que utilizemos. Como nuestro interés principal esta en encontrar genes del sistema nervioso podemos usar un reportero que solo afecte a neuronas. Para ello la cadena ligera de la toxina de tétanos (TetI_x), es una herramienta ideal ya que inhibe la liberación sináptica mediada por calcio (Sweeney *et al.* 1995).

Lacadena ligera de la toxina de tétanos es una metaloproteasa de zinc, que bloquea la neurotransmisión ya que corta a la proteína sináptica de membrana asociada a vesículas sinaptobrevina (VAMP) (Vederio *et al.*, 1999). Está formada por una cadena pesada de 100 kDa y una cadena ligera de 50 kDa unidas por un puente disulfuro. La cadena pesada esta involucrada en la unión e internalización a la neurona y la cadena ligera es la metaloproteasa que corta de forma selectiva a la sinaptobrevina.

La TetLx actúa de dos formas: extracelularmente se pega a las uniones neuromusculares, e intracelularmente esta involucrada en el transporte retrogrado del cuerpo neuronal al cordón espinal de las motoneuronas y la inhibición sináptica. (Niemann *et al.*, 1994; Schiavo *et al.*, 2000). Solamente usaremos la cadena ligera de la toxina, ya que así se inactiva solamente la neurona que la expresó.

Esto hace que el sistema este dirigido específicamente al sistema nervioso. Con esta toxina las neuronas no mueren pero quedan inhibidas en la liberación de neurotransmisores, lo que las hace quedar en "silencio" con respecto a su entorno de comunicación. La expresión de la Tetlx fuera del sistema nervioso no presenta ningún fenotipo ni alteración alguna, puesto que su acción es específica de neuronas.

Anteriormente en el laboratorio se construyó una colección de líneas con inserciones independientes de un elemento enhancer trap P-GAL4 de *D. melanogaster* (Valentín *et al.*, en preparación). Estas moscas expresan GAL4 en un patrón definido por el contexto genómico en el que cayó la inserción del elemento P. Podemos atrapar muchas secuencias regulatorias en el genoma ya

que estas inserciones caen de manera casi aleatoria. Estas líneas con la inserción del elemento P-GAL4 se utilizaron para dirigir de manera específica la expresión de un gen reportero (UAS-GAL4), en nuestro caso usamos la cadena ligera de la toxina de tétanos (Tetlx). Ésta al expresarse en las neuronas las inactiva causando un fenotipo evidente. En cada una de estas líneas independientes, la inserción atrapó las secuencias regulatorias de un gen distinto.

Existen tres posibilidades con respecto al tipo de gen atrapado:

Primero que la inserción haya caído en un gen no neuronal, por lo tanto no veríamos un fenotipo, ya que la proteína GAL4 se estaría expresando fuera del sistema nervioso y se uniría a la secuencia UAS-Tetlx expresando a la toxina de tétanos en donde no es capaz de actuar.

Segundo si la inserción si cayó en un gen neuronal, pero que éste sea de expresión generalizada. En este caso el sistema nervioso se apagaría y no podríamos identificar un circuito neuronal discreto y un gen de expresión de tan generalizada no nos interesa estudiarlo. Estas dos posibilidades son excluidas de nuestra selección dado el tipo de filtros que usamos en el análisis.

El tercer caso sería que la inserción haya caído en un gen que se expresa en un circuito neuronal discreto, es decir uno en que se expresan solo unas pocas neuronas con una función en común, y que la inactivación de éstas tuviera un fenotipo definido para poder estudiarlo.

Lo que buscamos en nuestra colección fueron aquellas líneas que presentaron deficiencias motrices como resultado de la inactivación selectiva de sus neuronas por la Tet1x, la cual refleja el patrón de expresión de GAL4 (Enhancer Trap).

Una vez que se tienen las líneas con fenotipos identificados, se puede utilizar otros genes reporteros tales como lacZ o GFP para visualizar directamente los circuitos neuronales. El uso de reporteros como estos, nos permitirán visualizar la expresión de GAL4 a lo largo del desarrollo.

Nosotros decidimos utilizar la Proteína Verde Fluorescente (GFP) como reportera en nuestro sistema. No interfiere con el crecimiento ni con la proliferación celular y no es toxica (Yeh, *et al.*, 1995. Chalfie M. *et al.* 1994. Chalfie M. 1995). Ha sido validado como gen reportero y usado ampliamente en mosca para visualizar su sistema nervioso, esto en combinación con el sistema UAS-GAL4 (Sun Banhua *et al.*, 1999, Murria *et al.*, 1998). Además existen fusiones con otras proteínas que sirven para dirigir la localización de la GFP dentro de la célula. Dos de estas fusiones fueron de gran utilidad para este trabajo, pues existían reportes de sus características en *Drosophila* que nos interesaban. La mCDB8-GFP marca de forma preferencial membranas (Lee and Luo. 1999) y la TAU-GFP dirige la localización hacia dendritas y procesos axonales en las neuronas (Lester I *et al.*, 1985. Butner and Kirschner 1991). Así tenemos una gran variedad de herramientas moleculares para discernir con mayor claridad estos circuitos neuronales, además es mayor la precisión con la que podemos ver al reportero, usando microscopia confocal y de fluorescencia.

Objetivo:

Caracterizar a nivel celular y molecular las inserciones 1DB3A, 2A2D y 3A42.

Objetivos Particulares:

Caracterizar el fenotipo de las inserciones 1DB3A, 2A2D y 3A42 en la progenie, mediante la cruce con las moscas UAS-Tetlx.

Identificar los circuitos neuronales de estas líneas mediante el gen reportero GFP y dos de sus variantes, con microscopia confocal y/o de florescencia.

Encontrar la secuencia del sitio de inserción de cada línea mediante la secuencia obtenida con un PCR reverso.

Identificar el gen adyacente afectado por la inserción mediante un análisis tipo BLAST.

Corroborar el sitio de la inserción por PCR

Metodología:

Construcción de una colección de líneas con inserciones independientes de un elemento P-GAL4:

Usando una transformante parental que tenga una inserción única en su genoma de un elemento-P capaz de "saltar" a otro sitio, podemos generar una gran cantidad de nuevas líneas con inserciones independientes por simple transposición (Zhang and Spradling., 1994), cada una de las cuales tendrá un patrón de expresión de GAL4 diferente.

Esta línea parental tiene insertado en el cromosoma X un elemento P (p[GAWB]) modificado (Brand and Perrimon., 1993), el cual lleva podemos seguirlo porque lleva el gen *white* y el gen que codifica para GAL4. Este elemento no es autónomo, ya que no puede "saltar" por si mismo, es decir esta inactivo porque no contienen el gen de la transposasa.

Por otro lado tenemos una línea de moscas que expresa la transposasa, que es la proteína responsable de la escisión e integración de un transposón en el genoma huésped (Robertson *et al.*, 1988).

Al cruzar ambas líneas, la progenie que herede ambos cromosomas pondrá en contacto el elemento P-GAL4 con la fuente de transposasa proveniente de la otra línea parental. Esto le permitirá saltar del sitio original en donde se encontraba. En una proporción de la progenie veremos nuevas inserciones resultado de la movilización del elemento P original hacia nuevos sitios (Fig. 8). Las nuevas inserciones pueden caer tanto en el cromosoma X, donde se encontraba originalmente, como otros cromosomas (Cooley *et al.*, 1988).

Seleccionamos las inserciones que cayeron en el segundo y tercer cromosoma debido a que metodológicamente es fácilmente sencillo (Rubin G. *et al.*, 1995).

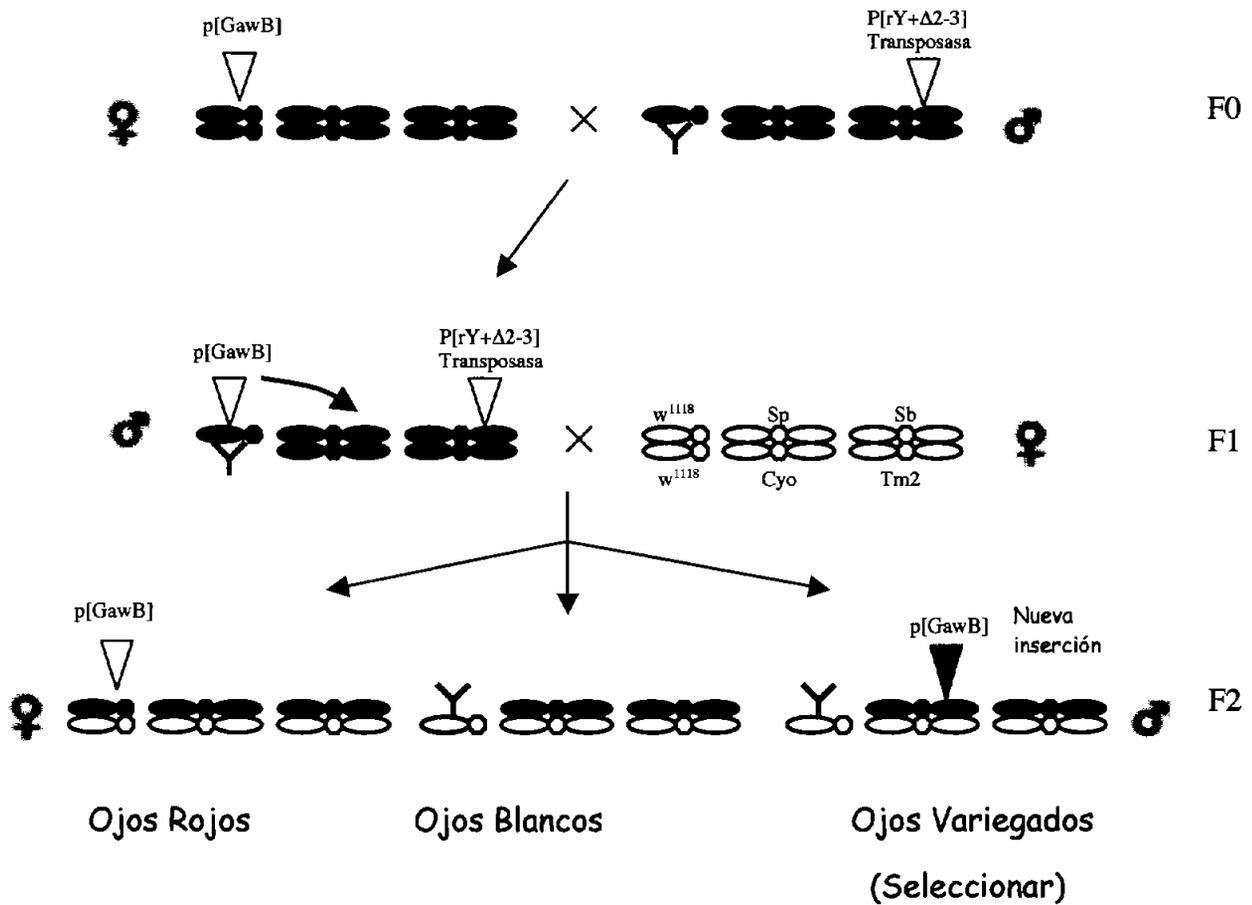


Fig. 8. Esquema de movilización

Modificado de Cooley et al., 1988.

Esta movilización es azarosa y puede existir más de una inserción por individuo por lo que el siguiente paso es balancear las líneas hasta que todos los individuos de cada línea tienen la misma inserción repetida una sola vez en su genoma y marcada para que podamos seguirla.

Es necesario establecer líneas con inserciones únicas y estables antes de caracterizarlas. Aproximadamente el 65% de las nuevas inserciones expresarán *GAL4* (Brand and Perrimon., 1993)

Esquema de cruce de la movilización (F0):

F0 p [GawB]/+;+/+;+ X W¹¹¹⁸/Y; Sp/Cyo; P [rY+Δ2-3], Sb/Tm2, Ubx

F1 p [GawB]/Y Cyo/+; P [rY+Δ2-3], Sb/+ X W¹¹¹⁸/W¹¹¹⁸; Sp/Cyo; Sb/Tm2, Ubx

F2 W¹¹¹⁸/Y; p [GawB]/Cyo; Sb/Tm2, Ubx O W¹¹¹⁸/Y; Sp/Cyo; Sb/ p [GawB] (nuevas inserciones)

Es importante recordar que el fenotipo de las moscas con la transposasa es de ojos blancos y tienen Sb, por lo tanto tienen pelos cortos. Y las que tienen la inserción tienen ojos rojos, por lo que fácilmente podemos seguir la inserción en la progenie. Como resultado, esperamos ver que se haya movilizad el elemento P de su posición original en una proporción de la progenie.

De esta manera se obtiene una colección con un gran número de líneas independientes, en las cuales todos los descendientes de cada línea tienen la misma inserción repetida una sola vez en su genoma. Esta colección podemos usarla ahora para probarla contra reporteros que nos ayuden a identificar genes del sistema nervioso mediante e sistema UAS-GAL4.

Sistema UAS-GAL4

En este sistema tenemos dos elementos involucrados: UAS y GAL4. Es muy importante dejar claro que estos elementos actúan como módulos independientes, por lo que tenemos una mosca que expresa la proteína GAL4 y otra mosca que tiene las secuencias UAS-reportero por separado. Y solo después de cruzarlas, es en la progenie, se heredan ambos elementos; es donde observamos un fenotipo.

Usamos un transposón modificado (Tsubota and Dang-Vu., 1991), reportado anteriormente. El pPTGAL es un vector para probar enhancers *in vivo*, lo que lo convierte en una herramienta útil para la generación de nuevas líneas GAL4 y para el análisis de sus secuencias regulatorias (Sharma *et al.*, 2002) (Fig. 9).

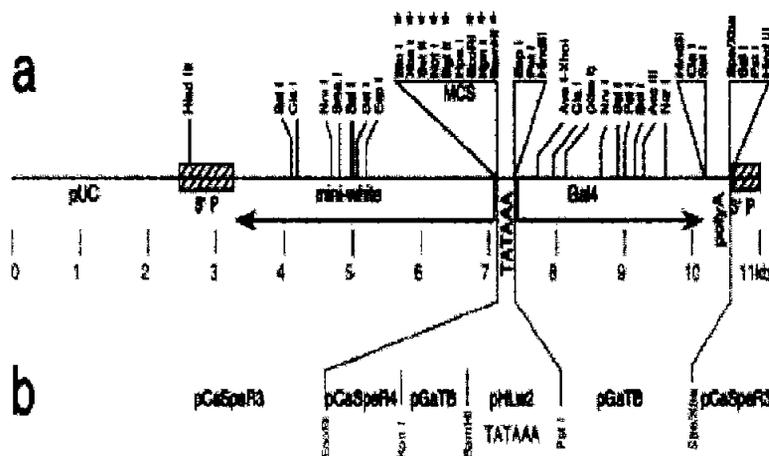


Fig. 9. Vector P-PTGAL (Modificado de Sharma *et al.*, 2002).

Este vector lleva el gen *white* de *Drosophila melanogaster*, el promotor mínimo Hsp70 y el gen GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*.

No existe GAL4 en la mosca, por lo que solo en aquellas líneas que tengan un elemento P-GAL4 insertado en su genoma, expresaran la proteína GAL4. Tampoco existen secuencias UAS de forma endógena en la mosca, por lo que se construyo una línea transgénica que lleva las secuencias UAS precediendo a un gen reportero en *Drosophila melanogaster* (Brand and Perrimon., 1993).

Se sabe que ninguna proteína de *Drosophila* interactúa de forma específica con las secuencias UAS. Solo cuando estén presentes en la misma célula la proteína GAL4 y las secuencias regulatorias UAS podremos ver un efecto de

interacción. Así nuestro gen reportero se expresara solo en las células que expresan GAL4. Por lo tanto a menos que GAL4 se encuentre presente, el gen reportero se encontrara apagado.

Esta es la base del sistema UAS-GAL4 en el que ambos elementos actúan como elementos separados e independientes. Estas características permiten a este sistema una regulación muy fina y le da grandes ventajas técnicas, como el uso de moduladores, por ejemplo GAL80 (Suster *et al.*, 2004). Éste es un represor de la transcripción en levaduras, que impide la acción de GAL4 mediante una interacción proteína-proteína con su dominio de activador transcripcional. Esto hace que la proteína GAL4 unida a la secuencia UAS se incapaz de activar la transcripción del gen reportero (Hirst *et al.*, 2001; Melsher and Xu., 2001). Podemos prender o apagar la expresión tanto de GAL4 como de GAL80 termosensible, transfiriendo a las moscas GAL4/GAL80 a la temperatura permisiva para permitir que se exprese lo que esta bajo el control de UAS en cualquier estadio de vida de la mosca; esto le da una enorme versatilidad al sistema.

Enhancer Trap:

Al insertarse, el elemento P-GAL4 tienen la capacidad de "atrapar" las secuencias regulatorias de genes vecinos, expresando así GAL4 en un patrón similar al del gen capturado. Esta estrategia de "enhancer trap" nos permite seguir la expresión espacio temporal del gen atrapado mediante un reportero. De esta forma tenemos moscas que expresan GAL4 en un patrón definido por el contexto genómico en el que cayó la inserción. En teoría podemos atrapar cualquier secuencia regulatoria en el genoma ya que estas inserciones caen de

manera semi-aleatoria (Fig. 10). Solo en la progenie, que tiene ambos transposones (GAL4, UAS-Tetlx) cuando tenemos presentes tanto GAL4 como la secuencia UAS-Tetlx en la misma neurona, podremos ver un fenotipo

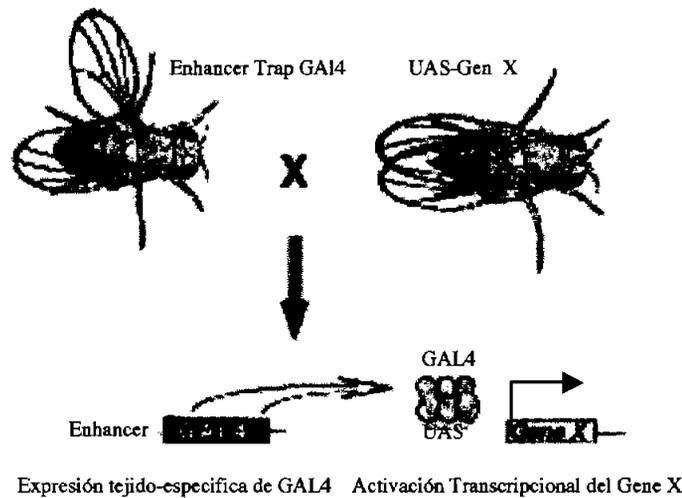


Fig.10 Esquema de técnica Enhancer Trap (Modificado de Brand and Perrimon., 1993).

PCR Reverso:

Esta técnica nos permite identificar el sitio de inserción del transposón, la idea básica es digerir el DNA genómico completo con una enzima de restricción que corte frecuentemente en el genoma. Una vez digerido todo el DNA esperamos tener una serie de fragmentos de diversos tamaños, dentro de los cuales algunos contendrán simultáneamente un fragmento del transposón y un fragmento del DNA geonómico adyacente. Después, ligamos todos los fragmentos favoreciendo que lo hagan sobre si mismos. Así obtenemos una colección de fragmentos de DNA circular, algunos de las cuales, llevaran secuencias de nuestro transposón y secuencias genómicas adyacentes a la inserción en una misma molécula (Sullivan *et al.*, 2000).

Dado que conocemos la secuencia de nucleótidos de nuestro transposón podemos predecir los sitios de corte de la enzima de restricción que usamos y en base a eso diseñar oligos internos sobre las secuencias palindrómicas del transposón. Los oligos amplifican lo que se encuentra hacia afuera del transposón. Se hace un PCR usando como templado las moléculas de DNA circularizado para obtener un amplificado, el cual contiene las secuencias adyacentes al sitio de la inserción (Fig. 11). Al secuenciar este producto de PCR se puede usar la información obtenida para hacer un análisis tipo BLAST contra el genoma completo de *Drosophila melanogaster*. Esto nos proporciona información del gen adyacente a la inserción.

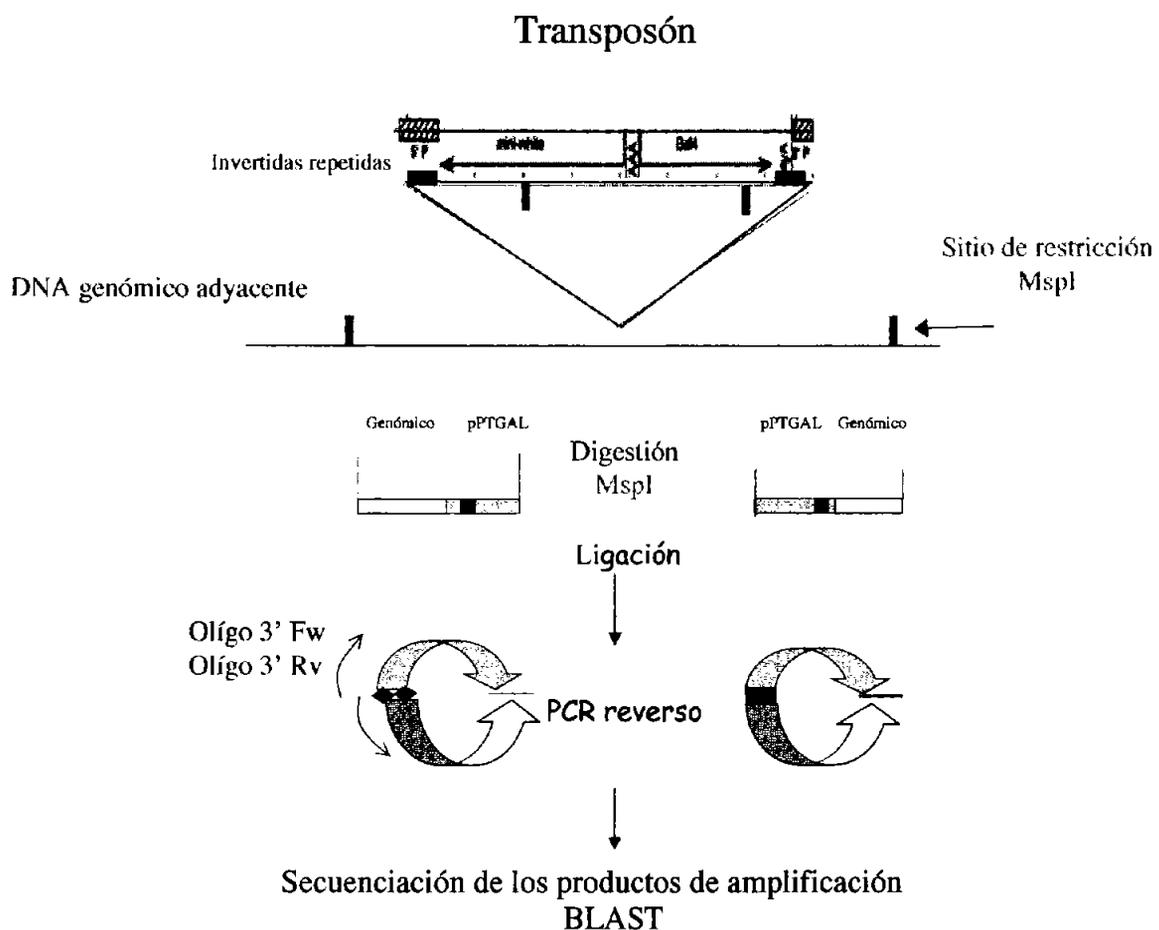


Fig.11 Esquema de PCR Reverso.

Materiales y Métodos:

Se crecieron las moscas a 25 C en medio semidefinido (10 gr. agar, 80 gr. Levadura de cerveza. 20 gr. Extracto de levadura, 20 gr. peptona, 30 gr. Sacarosa, 60 gr dextrosa, 0.5gr. MgSO₄*(6H₂O), propiónico 6ml, 10 ml Nipagin en 1000 ml de agua destilada).

Se cruzo a líneas identificadas por fenotipo con la línea de moscas que expresa la cadena ligera de la Toxina de Tétanos (Tetlx) bajo el promotor UAS. Con esto observamos el fenotipo causado por la inserción, y lo seguimos a lo largo del tiempo.

Esquema de cruzas	Progenie seleccionada	Fenotipo
1DB3A / Cyo ; Sb / Tm2 X Tetlx/Tetlx ; +/+	1DB3A/ Tetlx ; Sb/+	Parálisis
Sp / Cyo ; 2A28 / 2A28 X Tetlx/Tetlx ; +/+	Cyo/Tetlx ; 2A28 /+	Faratos
Sp / Cyo ; 3A42 /Tm2 X Tetlx/Tetlx ; +/+	Cyo/Tetlx ; 3A42/+	Patas chuecas

Para la caracterización celular usamos a la proteína verde fluorescente (GFP) como proteína reportera (Yeh *et al.*, 1995. Chalfie M. *et al.* 1994.). Esto con el fin de seguir el circuito neuronal a nivel histológico con microscopia confocal y de fluorescencia (Sun Banhua. *et al.*, 1999). Además se utilizaron dos fusiones de la GFP:

TAU-GFP que marca preferencialmente dendritas y axones (Lester I *et al.*, 1985. Butner and Kirschner 1991.). Y mCDB8-GFP que marca principalmente membranas (Lee and Luo. 1999).

Esquema de cruas GFP:

Esquema de cruas	Progenie seleccionada	Fenotipo
1DB3A/Cyo ; Sb/Tm2 X UAS-GFP/UAS-GFP ; +/+	1DB3A / GFP ; Sb/+	Fluorescentes (Toda la célula)
1DB3A/Cyo ; Sb/Tm2 X TAU-GFP/TAU-GFP ; +/+	1DB3A / TAU-GFP ; Sb/+	Fluorescentes (Axones y dendritas)
1DB3A/Cyo ; Sb/Tm2 X MCD8-GFP/MCD8-GFP ; +/+	1DB3A / MCD8-GFP ; Sb/+	Fluorescentes (Membranas de neuronas)

Esquema de cruas	Progenie seleccionada	Fenotipo
Sp / Cyo ; 2A28 / 2A28 X UAS-GFP / UAS-GFP ; +/+	GFP / Cyo ; 2A28 / +	Fluorescentes (Toda la célula)
Sp / Cyo ; 2A28 / 2A28 X TAU-GFP / TAU-GFP ; +/+	TAU-GFP/Cyo ; 2A28 / +	Fluorescentes (Axones y dendritas)
Sp / Cyo ; 2A28 / 2A28 X MCD8-GFP / MCD8-GFP ; +/+	MCD8-GFP/Cyo ; 2A28 / +	Fluorescentes (Membranas de neuronas)
Sp / Cyo ; 3A42 / Tm2 X UAS-GFP / UAS-GFP ; +/+	GFP / Cyo ; 3A42 / +	Fluorescentes (Toda la célula)
Sp / Cyo ; 3A42 / Tm2 X TAU-GFP / TAU-GFP ; +/+	TAU-GFP/Cyo ; 3A42 / +	Fluorescentes (Axones y dendritas)
Sp / Cyo ; 3A42 / Tm2 X MCD8-GFP / MCD8-GFP ; +/+	MCD8-GFP/+Cyo ; 3A42 / +	Fluorescentes (Membranas de neuronas)

Se disectó el sistema nervioso central (ganglio torácico abdominal y lóbulos del cerebro) y se realizaron preparaciones temporales para microscopia.

Las larvas y adultos fueron separadas por sexo para su análisis posterior y se prepararon de la siguiente manera:

Larvas:

Se separaron por sexo y se lavaron 2 veces en PBS 1X

Se disectó en ganglio torácico abdominal y los lóbulos del cerebro.

Se fijo durante 20 min. en formaldehído al 4% en buffer fosfato.

Se lavo Buffer de Fosfatos durante 20 min.

Se coloco en un portaobjetos con citifluor como agente de montaje

Las muestras fueron observadas al microscopio antes de 36 horas.

Adultos:

Se separaron por sexo

Se coloca en un vidrio de reloj con PBS1X

Se disectó el ganglio torácico abdominal y los lóbulos del cerebro.

Se fijo durante 20 min. en formaldehído al 4% en buffer fosfato.

Se lavo Buffer de Fosfatos durante 20 min.

Se coloco en un portaobjetos con citifluor como agente de montaje

Las muestras fueron observadas al microscopio antes de 36 horas.

Buffer fosfatos:

Fosfato de potasio dibásico 0.1 M ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

22.82 gr. en 1 Lt Agua destilada. Ajustar a p.H. 7.4

PBS:

8 gr. NaCl, 0.2 gr. Kcl, 1.44 gr. Na₂HPO₄, 0.24 gr. Kh₂PO₄ en 1 Lt Agua destilada. Ajustar a p.H. 7.4 (Maniatis, T. 1989)

Para el análisis de PCR reverso se extrajo DNA geonómico de las tres líneas de forma independiente mediante el siguiente protocolo:

Triturar de 50-100 moscas en 2 ml de Douncing Buffer con un pistilo suavemente.

Filtrar el homogenizado a través de un poco de fibra de poliéster en una jeringa de 3ml.

Recolectar el filtrado en un eppendorf y centrifugar 1 min.

Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100µl de douncing buffer.

Agregar 300µl de Lisis buffer y mezclar suavemente.

Agregar 400µl de fenol , mezclar suavemente y centrifugar.

Agregar 400µl de fenol+400µl cloroformo mezclar y centrifugar (3X)

Agregar 400µl de cloroformo, mezclar y centrifugar

Precipitar con butanol si es un volumen grande

Precipitar con Ac. de Na. 3M pH 5.2 + Etanol 100% + glicógeno

Lavar con etanol 70% (2 veces)

Dejar secar 20 min. a temperatura ambiente y resuspender en 150 µl de H₂O.

Soluciones Stock:

<u>Douncing Buffer:</u> 10ml		10ml	<u>Lisis Buffer :</u>	
0.15 M NaCl	300 μ l	(NaCl 5M)	100 μ l	0.3 M NaCl
0.01 M Tris	100 μ l	(Tris 1M pH8)	50 μ l	0.05 M Tris
0.005 M EDTA	100 μ l	(EDTA 0.5M pH8)	100 μ l	0.005 M EDTA
0.2% IGEPAL	200 μ l		0.1gr	1% NaSarcosyl

Olígos utilizados para hacer el PCR reverso:

Amp 5' Fw CAATCGCCGTGAAGACCAGTG.

Amp 5' Rv CTCCAGTCACAGCTTTGCAGC.

Amp 3' Fw CAATCATATCGCTGTCTCACTC.

Amp 3' Rv CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT.

Se purificó la banda obtenida mediante un kit de Gene Clean en el caso de la línea 2A2 δ y IDB3A. En la línea 3A42 se obtuvo una banda única, por lo que se utilizo el kit de Montage PCR de Millipore para concentrar y purificar la banda. Ésta se mando a la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM con los siguientes olígos:

Sec 5' FW GCCCAGAAAGTATGTGTCAC.

Sec 5' Rv CACAACCTTTCTCTCAACAA.

Sec 3' Fw GCACTCAGAATACTATTC.

Sec 3' Rv CGTGGGGTTTGAATT AACTC.

Programa de PCR reverso:

94 * 3 min.

94 * 30 seg.

58* 1 min.

72* 1.5 min.

72* 10 min.

4*

25 ciclos

Se hizo un BLAST con los resultados de la secuencia obtenida en:
<http://flybase.net/blast/>

Para corroborar la inserción por PCR se diseñaron y sintetizaron los siguientes
oligos para cada línea:

IDB3A: ZincFw AATTCGAATGTGTGGAGGGCA.
Zinc Rv CTAATGCGTTTCAGACTC.

2A28: MuraFw GCTTTCGGTCCATATCCA.
Mura Rv ATACGTGCGTGGTTAGTT.

3A42: Fw GAGTCTATGTACCTAAGCC.
RV CTCTAACTCCTCTGGCATT.

Resultados:

Se caracterizó el fenotipo las líneas con las diferentes inserciones mediante la cruce con moscas que expresaban la Toxina de Tétanos bajo el control de UAS.

Caracterización de la inserción IDB3A:

La progenie con genotipo IDB3A/Tetlx presentó una parálisis motora total a la semana de que eclosionan los adultos, como resultado de la inactivación selectiva de sus neuronas por la Tetlx. Antes de paralizarse, las moscas fueron fértiles y depositaron huevos en el medio, los cuales eclosionaron posteriormente; lo cual es interesante ya que imita hasta cierto punto los síntomas de algunas enfermedades neurodegenerativas humanas como la pérdida progresiva y prematura de la capacidad motriz.

Se identificó el patrón de expresión de *GAL4* en el sistema nervioso central larvario utilizando el gen reportero *GFP*. La progenie IDB3A/*GFP* expresó a la proteína *GFP* en un número reducido de células que podrían representar a un circuito neuronal discreto en el Ganglio Torácico Abdominal (Fig. 12).

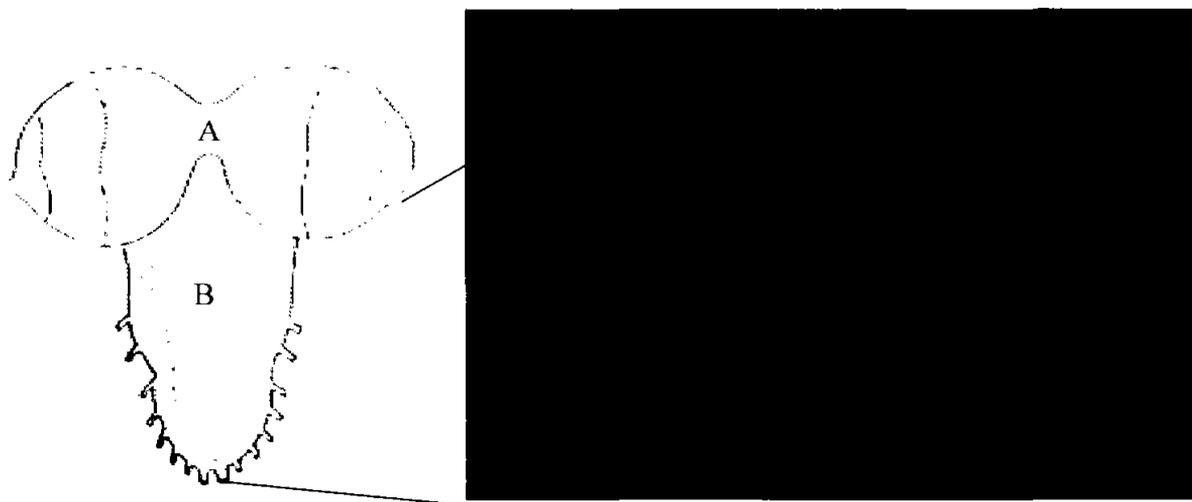


Fig.12. Cerebro de larva mosca. A-Cerebro B-Ganglio Torácico Abdominal. C-Línea IDB3A/*GFP*.

El circuito neuronal que atrapamos mediante la inserción del elemento P-GAL4 en la línea IDB3A, está involucrado en el fenotipo de parálisis que observamos debido a que solo lo observamos en presencia de la Tetlx.

Una vez identificado el circuito neuronal, nos enfocamos a encontrar el sitio en donde cayo la inserción, porque es importante identificar el gen atrapado para buscar si tiene un posible papel en el sistema nervioso o no. Para esto se extrajo DNA genómico de moscas IDB3A/CYO (Fig. 13) que se digirió con una enzima de restricción para hacer un PCR reverso, con el fin de obtener un producto de amplificación para secuenciarlo (Fig. 14).

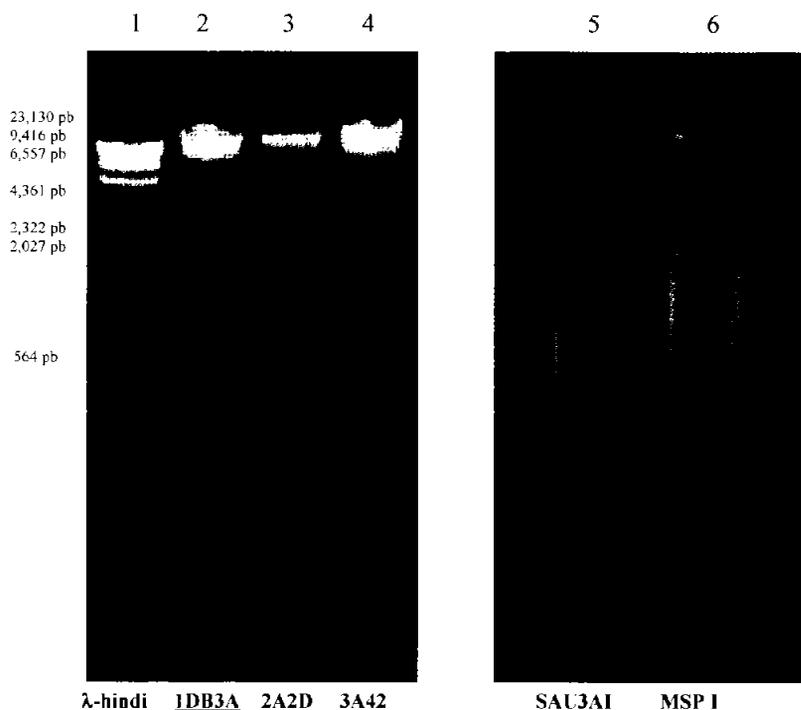


Fig. 13 Marcador de pesos moleculares λ -HindIII (carril 1). DNA genómico de las líneas IDB3A, 2A2D y 3A42 respectivamente (carril 2, 3 y 4). Digestión del DNA de la línea IDB3A con las enzimas de restricción SAU3AI (carril 5) y MspI (carril 6) (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio)

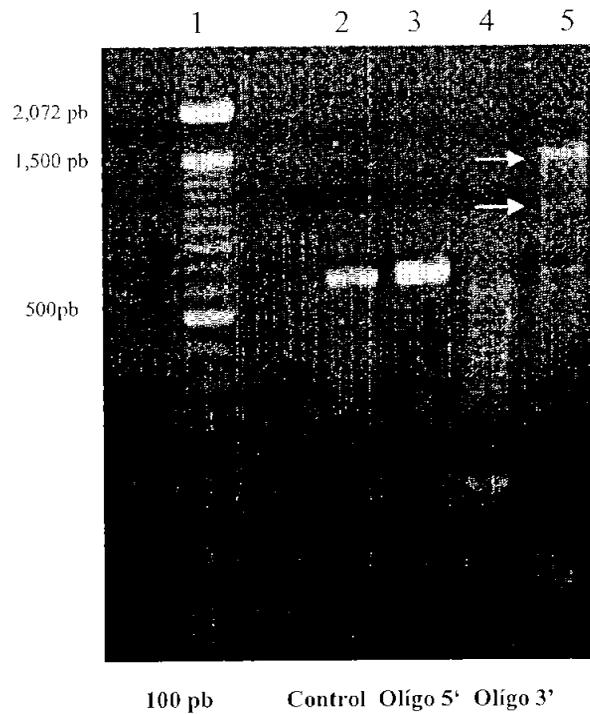


Fig. 14 Marcador de pesos moleculares (100pb) (carril 1). Control de amplificación (carril 2 y 3). PCR usando como templado DNA de la línea 1DB3A digerido con la enzima de restricción SAU3AI con lo oligos Amp 5' (carril 4) y Amp 3' (carril 5) (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio).

Se incluyeron dos controles positivos de amplificación, usando como templado DNA digerido de las líneas 2A2 δ y 3A42 (Fig. 14 carril 2 y 3), con oligos diseñados para amplificar el fragmento silvestre de 630pb. En el carril 5 observamos que amplificamos tres productos de PCR de diferente peso molecular cuando usamos los oligos Amp 3' (flechas) los cuales se mandaron a secuenciar. Mientras que usando los oligos Amp 5' no lograron amplificar ninguna banda con las condiciones que utilizamos (Fig. 14 carril 4). Los tres productos dieron la misma secuencia.

Resultado de la secuencia:

```
TATTTTAAAGTTTTATTTTTCATAATTTGGAGTTTCCAATTAACTTTTGTTTTGATTTTTAATTTCAATTTT
TTGTTGAAGTACTTAATTCTAAAATATATTCTAATTTTAAAAATAAAAAGATTTTACTTGTTTATCAACATCG
ACGTTTCGCGCTGCTAATATTAATTTTTCTTTACATTATTTGTAATTTTACAATTATTATTATTTGTATAATG
CAAAAAAATACATTCTAGCTCTTTTAACTTCTCTTGAATTTTTTCGGACGGCTTAATAAGTCCGCCGTGAGACAC
CTCGTCGACNTATGTAATGTCAAATTTTCTTTTACTTTGTCACTGNATTCTCAANTTTGT
```


Para corroborar que la inserción se amplificó por PCR un fragmento usando un oligo del elemento P y otro que amplifica parte de la secuencia del gen CG11163 (Fig. 17).

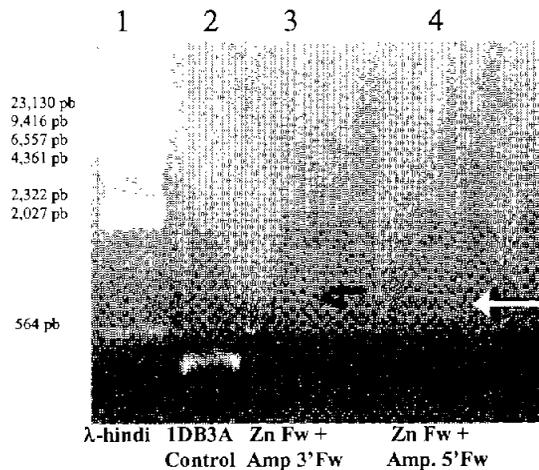


Fig.17 Marcador de pesos moleculares λ -HindIII (carril 1). Control de amplificación esperando 356 pb del gen CG11163 con oligos Zn Fw y Zn Rv (carril 2). Producto de PCR de la línea 1DB3A heterociga, con oligos Zn Fw y Amp 5' Fw (carril 3). Producto de PCR de la línea 1DB3A heterociga, con oligos Zn Rv y Ampl. 3' Fw (carril 4). (Gel de agarosa 1%, bromuro de etidio)

Se corroboró la inserción por PCR ya que se amplificó un fragmento usando el oligo del gen Zn Fw y el oligo Amp 5' Fw del elemento P. Así mismo se hizo un PCR control usando todos los oligos por separado para comprobar que no se amplificara ninguna banda al usar el oligo solo sin su complementario.

Caracterización de la inserción 2A2δ:

En el genotipo *Tet1x/+ ; 2A2δ/+* la mayoría de los machos fueron incapaces de eclosionar (faratos), presentando anomalías en el desarrollo. Sin embargo las hembras parecen ser normales y no pudimos encontrar un fenotipo asociado a dicho genotipo (Fig. 18).

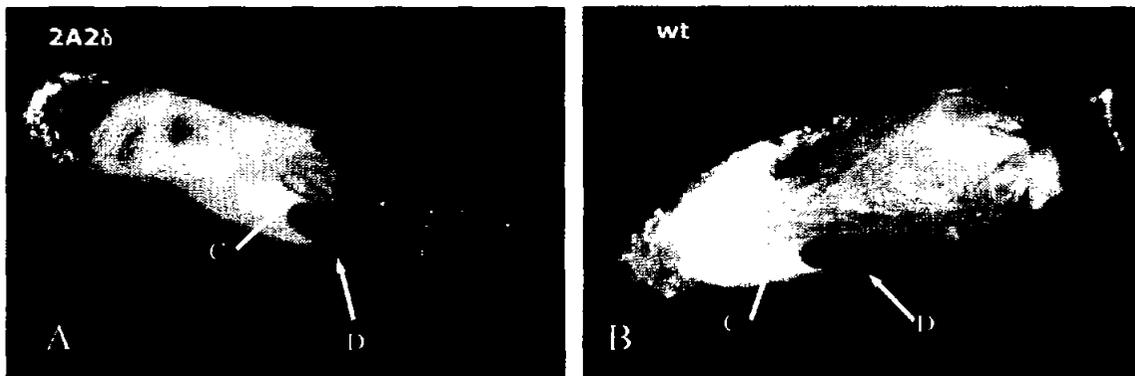


Fig.18 A.- Mosca macho 2A2δ/*Tet1x* antes de eclosionar “faratos” B.-Mosca antes de eclosionar macho control. C.- Patas. D.- Alas

Se identificó el patrón de expresión de *GAL4* en el sistema nervioso larvario utilizando como reportero *GFP*. La línea con genotipo 2A2δ/*GFP* atrapó un grupo de neuronas en el ganglio torácico abdominal de larva (Fig. 18).

Tanto en machos como en hembras se observó el mismo patrón, y en vista de que daba mucho ruido ya que la *GFP* llena a las neuronas completas, usamos la proteína TAU-*GFP*, que marca preferencialmente axones como reportera. Con esto se definió mucho mejor el circuito (Fig. 20).

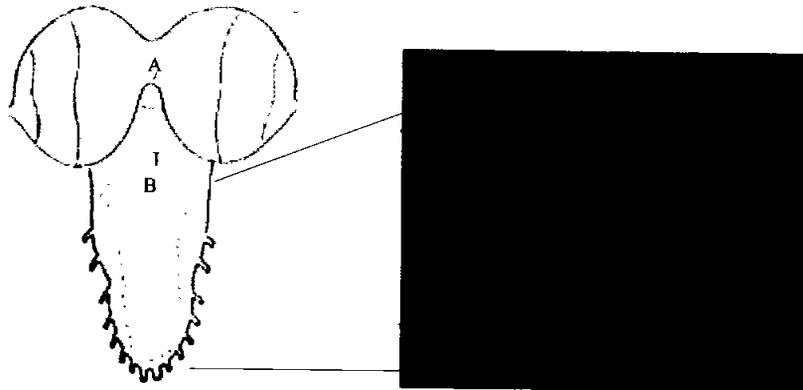


Fig. 19 Cerebro de larva mosca. A-Cerebro B- Ganglio Torácico Abdominal. C- Línea 2A2δ/GFP

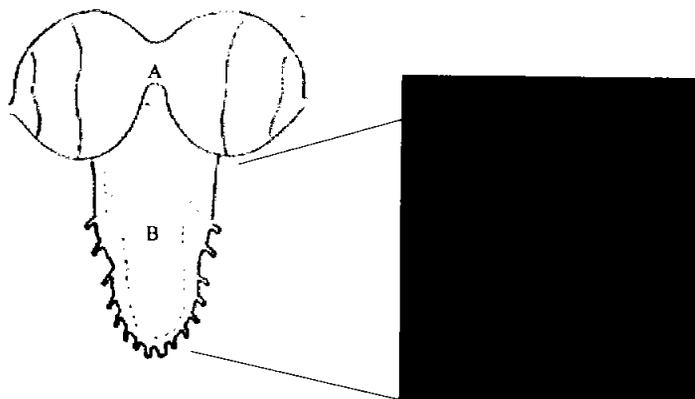


Fig. 20 Cerebro de larva mosca. A- Cerebro B- Ganglio Torácico Abdominal. C- 2A2δ/TAU-GFP.

Una vez identificado el circuito neuronal, nos enfocamos a encontrar el sitio en donde cayó la inserción. Para esto se extrajo DNA geonómico de moscas con genotipo 2A2δ/Tm2, el cual digerimos con la enzima de restricción MspI (Fig. 21). Usando esté DNA digerido como templado, se hizo un PCR reverso (Fig. 22). El producto de amplificación obtenido fue secuenciado para determinar el gen adyacente a la inserción de nuestro elemento P.

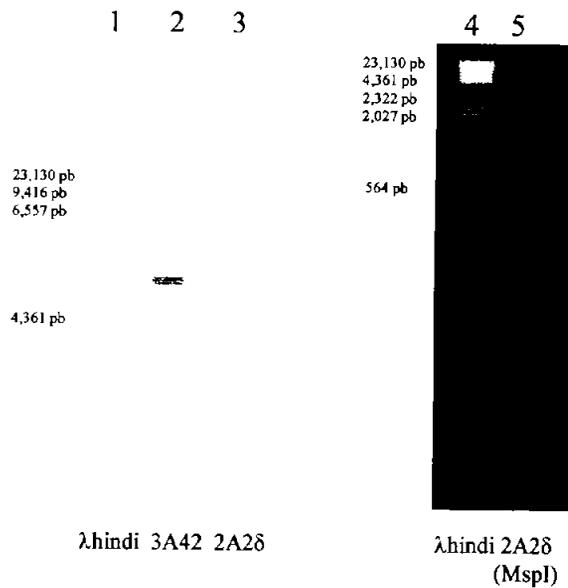


Fig.21 Marcador de pesos moleculares λ -Hindi III (carril 1 y 4). DNA genómico de las líneas y 3A42 y 2A28 respectivamente (carril 2 y 3). Digestión DNA de la línea 2A28 con la enzima de restricción MspI (carril 5) (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio)

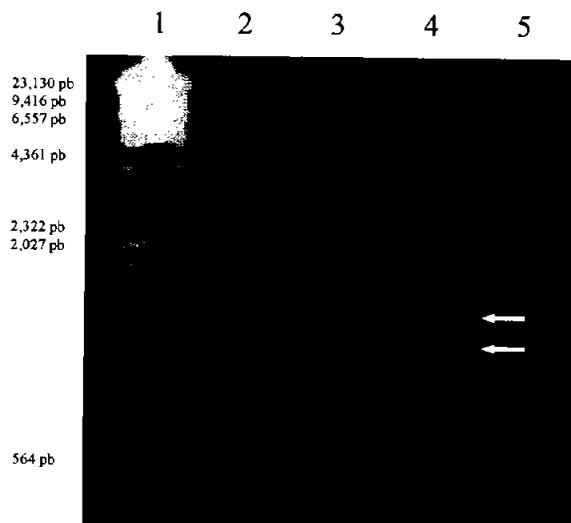


Fig.22 Marcador de pesos moleculares λ -Hindi III (carril 1). PCR usando como templado DNA de la línea 2A28 digerido con la enzima de restricción MspI con lo oligos Amp 5' (carril 3) y Amp 3' (carril 2, 4, 5) (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio).

En los carriles 2, 4 y 5 observamos que se amplificaron dos productos de PCR de diferente peso molecular cuando usamos los oligos Amp 3' (flechas), los cuales se mandaron a secuenciar con los oligos Sec 3' Fw y Sec 3' RV. Usando los oligos Amp 5' no amplificamos ninguna banda en estas condiciones (carril 3).
Resultado de la secuencia Sec 3' FW:

CATATATTAGCGAAATTATTTTGTAGAGTTTCTATCTGTTTAATAATGTGCGAGTACGCAAAGCTTGGCTGCAGGTGAC
TCTAGTGGATCTAATCAGTGAGCCATAGCGCTTCTTCTTTGTTTCCCCCACCACAAAAAAGTTGCAAAAGAAGCAGACAC
TTTGTCTACGCGATTGGGACATGTTTGTGTGTTTATTAACCTAGTGCATGATGAAATAACATAAGGTGGTCCCGTCGGC
AAGAGACATCCACTAACGTATGCTTGAATAAGTGCAGTGAAAGGAATAGTATTCTGAGTGTCTGATTGAGTCTGAGT
GAGNGCCCAANTATGATTGAATG

Resultado de la secuencia Sec3' RV:

CTGCCTTATTGCAGCATACGTTAAGTGGATGTCTCTTGGCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGCACTAGGTT
AATAAACACACGAAACATGTCCCGAATCGCGTAGACAAAGTGTCTGCTTCTTTTCAACTTTTTTGGTGGGGGAAACAA
AGAAGAAGCGCTATGGCTCACTGATTAGATCCACTAGAGTGCACCTGCAGCCAAGCTTTGCGTACTCGCAAATTATTA
AATAAAACTTTAAAAATAATTTGCTAATTAATATTATGAGTTAATTCAAACCCAGAACCATGCTAAGGAGCATATA
TTTACACAATGGTAACGCGGCTCACCTGTTACACAGTTTGGGCTAGAAAAATAGCAAAAATAGCATTATTACCTATAGTT
ACCTATGTTCTATTCCATCTAATAACGTAATGTATCTTGAAATGTATCTTGCAAGTGCATGTTGCAAGTGTATCTTGCAAGT
CATCTTGCAAGTGTATCTTGCAAGTGTATCTTGCAAGTGNATCTTGAATGTATCTTGAAATGTATCTTGCAAGTGC

Después de descartar la secuencia del vector pPTGAL encontramos la siguiente secuencia genómica:

Sec 3' FW:

pPTGAL: 3516 ctcactcagactcaatacgcactcagaatactattcctttcactcgcacttattgcaag 3575
|||||
3A42: 323 ctcactcagactcaatacgcactcagaatactattcctttcactcgcacttattgcaag 264

pPTGAL: 3576 catacgttaagtggatgtctcttgccgacgggaccaccttatgttatttcatcatg 3631
|||||
3A42 : 263 catacgttaagtggatgtctcttgccgacgggaccaccttatgttatttcatcatg 208

pPTGAL: 3364 ttagatccactagagtgacctgcagcccaagctttgcgactcgcacaaattatttaa 3420
|||||
3A42: 94 ttagatccactagagtgacctgcag-ccaagctttgcgactcgcacattatttaa 39

pPTGAL: 6392 catgatgaaataacataaggtggtcccgtcg 6422
|||||
3A42: 208 catgatgaaataacataaggtggtcccgtcg 238

Sec 3' RV:

pPTGAL: 3364 ttagatccactagagtgacctgcagcccaagctttgcgactcgcacaaattattaaaaat 3423
|||||
3A42: 185 ttagatccactagagtgacctgcagcc-aagctttgcgactcgcacaaattattaaaaat 243

pPTGAL: 3424 aaaactttaaaaaataatttctgctaattaatattatgagttaattcaaaccoca 3477
|||||
3A42: 244 aaaactttaaaaaataatttctgctaattaatattatgagttaattcaaaccoca 297

pPTGAL: 3565 cttattgcaagcatacgttaagtggatgtctcttgccgacgggaccaccttatgttattt 3624
|||||
3A42: 6 cttattgc-agcatacgttaagtggatgtctcttgccgacgggaccaccttatgttattt 64

pPTGAL: 3625 catcatg 3631
|||||
3A42: 65 catcatg 71

Con esta información encontramos que el gen en donde cayó la inserción es *murashka* (*mura*), también conocido como CG9381. Existen 8 alelos reportados; siete mutantes disponibles y un silvestre.

Este gen codifica para tres RNA mensajeros: *mura-RA* (3995 nucleótidos), *mura-RB* (3978 nucleótidos) y *mura-RC* (4943 nucleótidos).

Estos transcritos codifican para tres polipéptidos respectivamente: *mura-PA* (868 aa); *mura-PB* (868 aa) y *mura-PC* (1173 aa).

La proteína *Mura-PC* tiene un peso molecular de 1,265 KDa aprox. y tiene un dominio tipo dedo de zinc C3HC4 asociado a una actividad de E3 ligasa de ubiquitina. Esto es inferido mediante el análisis de homología de secuencia. La proteína *Mura-PA* tiene un peso molecular de 92619 Da aprox. Tiene el mismo tipo de dominio dedo de zinc, con la diferencia que su actividad esta asociada a una proteína E1 del complejo de ligasa de ubiquitina.

En estudios anteriores se han aislado mutantes en este gen por los defectos en el aprendizaje y memoria a largo plazo en *D. melanogaster* (Dubnau *et al.*, 2003. Mutsuddi *et al.*, 2004).

Murashka ha sido mapeado citológicamente en el brazo R del tercer cromosoma, en la posición 85D22–24. Esto correlaciona con el mapeo genético de la inserción, que lo sitúa también en el tercer cromosoma (Fig. 23).

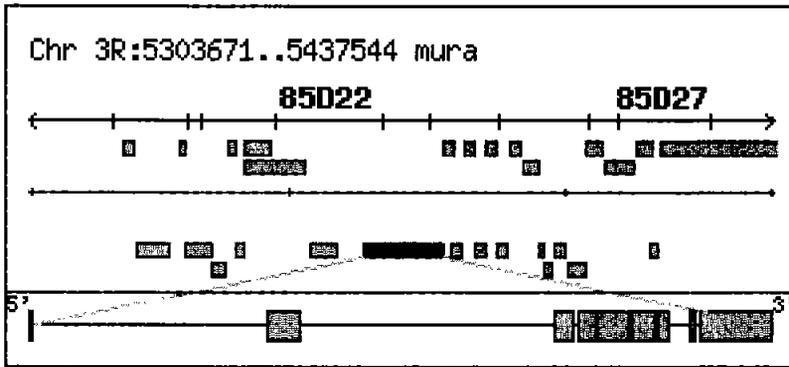


Fig. 23. Localización citogenética Cromosoma 3 Brazo R 85D22-85D27

<http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbidq.html?FBgn0037705&content=full-report>

Para corroborar que la inserción se amplificó por PCR un fragmento usando un oligo del elemento P y otro que amplifica parte de la secuencia del gen *CG9381* (*mura*). Se corroboró la inserción por PCR en el gen *CG9381*, ya que se obtuvo un producto de amplificación usando el oligo del gen *Mura Fw* y el oligo *Amp 5' Fw* del elemento P. Se revisó con un PCR control a todos los oligos por separado para comprobar que no se amplificara ninguna banda al usar el oligo solo sin su complementario.

Caracterización de la inserción 3A42:

En la progenie con el genotipo *Tetlx/+ ; 3A42/+*, tanto machos como hembras se presento una torsión en las patas, como resultado de la inactivación selectiva de algunas de sus neuronas por la *Tetlx*. El defecto se observa en la parte media de la extremidad, y se observan que algunos individuos no extienden las alas (Fig. 24).

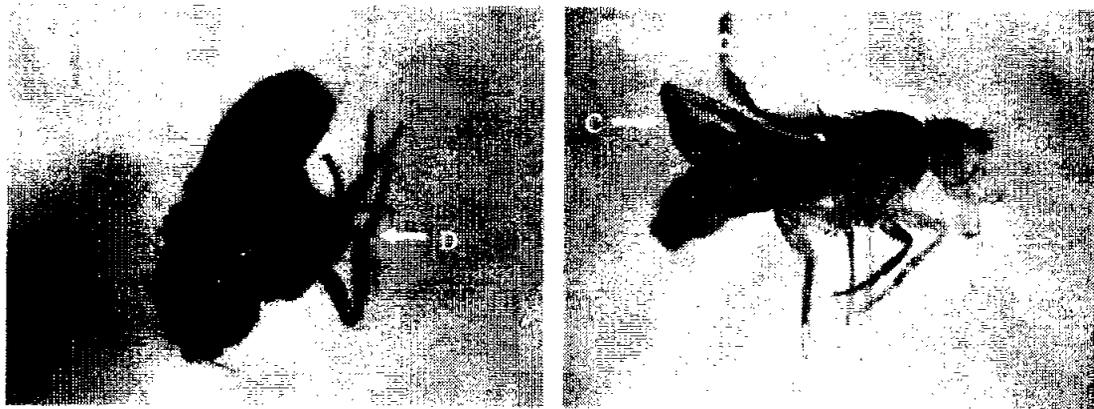


Fig.24 A- Mosca adulta 3A42/*Tetlx* macho con defectos en las extremidades y alas no extendidas. B.-Mosca adulta macho control. C- Alas. D- Patas

La línea con la inserción 3A42 presentó el siguiente patrón de expresión de *GAL4* en el sistema nervioso larvario, visto con la proteína reportera *GFP* (Fig. 25).

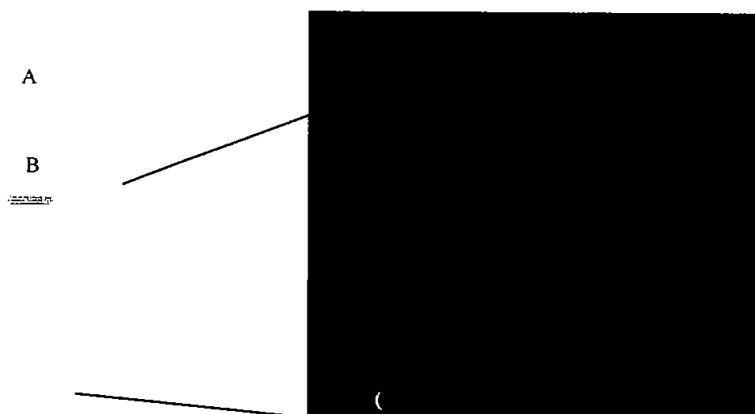


Fig. 25 Cerebro de larva mosca. A-Cerebro B-Ganglio Torácico Abdominal.C-Línea 3A42/*GFP*.

Ésta línea atrapó a un grupo de neuronas en el ganglio torácico abdominal. Tanto en machos como en hembras se observó el mismo patrón, y dado que se observan dos grandes proyecciones nerviosas, usamos la proteína TAU-GFP que define mejor procesos axonales y dendritas. Esto con el fin de observar mejor el circuito.

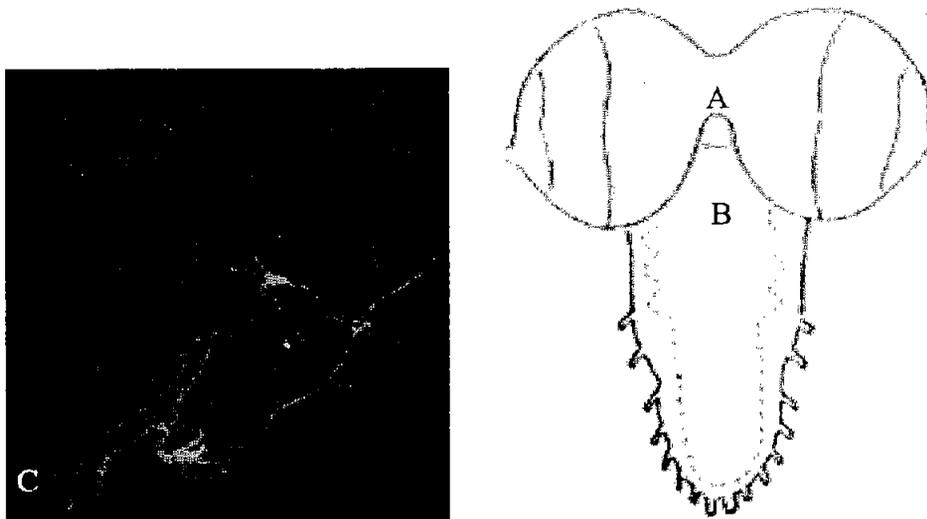


Fig. 26 Cerebro de larva mosca. A-Cerebro B-Ganglio Torácico Abdominal.C-Línea 3A42/TAU-GFP.

Una vez identificado el circuito neuronal, nos enfocamos a encontrar el sitio en donde cayó la inserción. Para esto, se extrajo DNA genómico de moscas con genotipo 3A42/Tm2, el cual se digirió con la enzima de restricción *MspI*, usamos este DNA digerido como templado para hacer un PCR reverso (Fig.27). El producto de amplificación se mandó a secuenciar y con esta información encontramos el gen en donde cayó la inserción del elemento p-GAL4 (Fig.28).

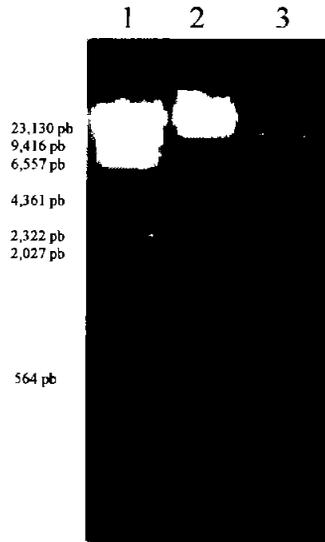


Fig.27 Marcador de pesos moleculares λ -Hind III (carril 1). DNA genómico de la línea 3A42 (carril 2). Digestión con la enzima de restricción MspI (carril 3) (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio).

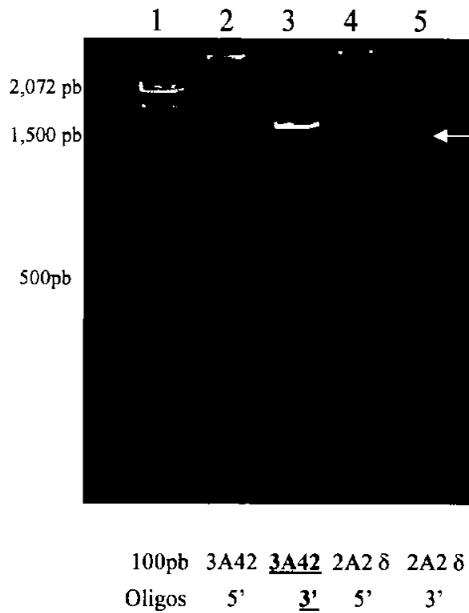


Fig.28 Marcador de pesos moleculares 100 pb (carril 1). PCR usando como templado DNA de la línea 3A42 digerido con la enzima de restricción MspI con lo olígos Amp 5'(carril 2 y 4) y Amp 3'(carril 3 y 5) (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio).

Obtuvimos un producto de amplificación el cual mandamos a secuenciar.

Resultado de la secuencia:

CTTAATGTCGTGGGTTTGAATGAGTGGAGAACAGCCGCATATGCTTGAAGCCCCGCTGACATTGCCTGC6666CCCTC66
 GATTAACGCTTCTGCCTACATCCCTGCAATGATGAACGAATGATCTTCTAGAGTATTTATTTGCCACAC6CTAATGTAAA

ATCAATTTGTTGCTAACTTAAAACATAAATAATTATGTATTAGTTATTTACATTCTTTTGGTTGGTTACAACCAAATAAA
 TAATATCACTTTTAAAAACTTAAGCCAGGAAGTGAATAATTTCTATTTGGCTTTAGTCGACGGTATCGATAAGCTTCTG
 AATAAGCCCTCGTAATATATTTTCATGAAGAATTTAGGTCCAAAAAAAAGATGGGCATTAATTCTAGTCATTTAAAAAA
 TCTATAGATCAGAGGTTACATGGCCAAGATTGAAACTTTAGAGGAGTATAGTTACATAAAAAGAAGGCCAAAACGATGTAT
 AAATGGAAAAGAAATTGAGATGGTGCACGGATGCACAGTTGAAGTGAACCTTGCAGGGGTTTTTTTTCAGTATCCTACGAACA
 TTTTACTCTTTTTTTTTTGGGTTTGGGTGGGGATCTTTCATCTCGAAATAGGTAGGGTTAAAAATCCGTCCATCCATTGGTG
 GGCATAAACCTCCCTGGTTGTGTCCAACCGCTTTAACCGTTTGTCCGTCCAACCAAGGGGGCAGGGGTTTTGAAATTAT
 TACCACCCCATTTTTCCAAGCCCGGAGTTCTGTTATTCCTGGATTTCCCGACTTTTAGGAACGCTGGGGTGGGTAAAGCGC
 TGGAAATTCGTTTATTGTTAAAAGTTCCGAACCTCCCTCTGTTCAAAAGCAAGGCCACGGTTTTTCTCCAATTTTTCCAC
 TTTGGT

En nuestra secuencia, del nucleótido 15 al 551 se observó una homología del 95% con el pPTGAL.

Homología 95%

```
pPTGAL: 2886 gataactgaaaaa--ccccgcaagttcacttcaactgtgcatc-gtgcaccatctcaattt 2942
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 551 gataactgaaaaaacccccgcaagttcacttcaactgtgcatccgtgcaccatctcaattt 492

pPTGAL: 2943 cttt--catttatacatcgTTTTg-ccttcttttatgtaactatactcctctaa-gtttc 2998
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 491 cttttccatttatacatcgTTTTggccttcttttatgtaactatactcctctaaagtttc 432

pPTGAL: 2999 aatcttggccatgtaacctctgatctatagaattttttaaatgactagaattaatgccca 3058
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 431 aatcttggccatgtaacctctgatctatagaattttttaaatgactagaattaatgccca 372

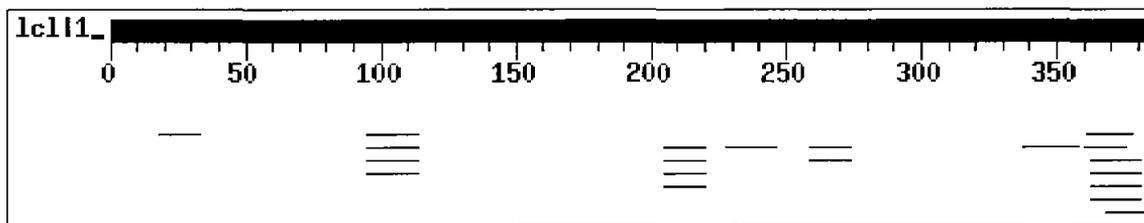
pPTGAL: 3059 tcnnnnnnnnggacctaaattcttcatgaaaaatattacgagggccttattcagaagcct 3118
|| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 371 tcttttttttggacctaaattcttcatgaaaaatattacgagggccttattcagaagcct 312

pPTGAL: 3119 atcgataccgtcgactaaagccaaatagaaa-ttattcagttc-tggccttaagtttttaa 3176
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 311 atcgataccgtcgactaaagccaaatagaaaattattcagttcctggccttaagtttttaa 252

pPTGAL: 3177 aagtgatattattttatttgggtgtaaccaacccaaaagaatgtaataactaatacataat 3236
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 251 aagtgatattattttatttgggtgtaaccaacccaaaagaatgtaataactaatacataat 192

pPTGAL: 3237 tatgtagtTTTTaagtttagcaacaaattgatttta 3271
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
3A42: 191 tatgtagtTTTTaagtttagcaacaaattgatttta 15
```

Con los datos de la secuencia no homologa al elemento P se hizo un BLAST para compararla contra el genoma completo de *D. melanogaster* (Fig. 29).



<u>CG7922-RA</u>	type=transcript; loc=3R:join(17299011..17299147,172992...	<u>35</u>	0.37
<u>CG4165-RB</u>	type=transcript; loc=X:join(5162818..5162880,5163194....	<u>33</u>	1.4
<u>CG4165-RC</u>	type=transcript; loc=X:join(5162793..5162893,5163194....	<u>33</u>	1.4
<u>CG4165-RA</u>	type=transcript; loc=X:join(5162520..5162740,5163194....	<u>33</u>	1.4
<u>CG4165-RD</u>	type=transcript; loc=X:join(5162144..5162281,5163194....	<u>33</u>	1.4
<u>CG32156-RE</u>	type=transcript; loc=3L:join(16022246..16022349,16024...	<u>31</u>	5.3
<u>CG32156-RC</u>	type=transcript; loc=3L:join(16000847..16001029,16001...	<u>31</u>	5.3
<u>CG32156-RB</u>	type=transcript; loc=3L:join(16000847..16001029,16001...	<u>31</u>	5.3
<u>CG32156-RA</u>	type=transcript; loc=3L:join(16000847..16001029,16001...	<u>31</u>	5.3
<u>CG14980-RB</u>	type=transcript; loc=3L:complement(3878067..3878569,3...	<u>31</u>	5.3
<u>CG12010-RB</u>	type=transcript; loc=3L:join(3354937..3355805,3355863...	<u>31</u>	5.3
<u>CG12010-RA</u>	type=transcript; loc=3L:join(3354937..3356663,3356720...	<u>31</u>	5.3
<u>CG7644-RA</u>	type=transcript; loc=2L:complement(15883217..15883897,...	<u>31</u>	5.3
<u>CG9582-RA</u>	type=transcript; loc=2L:complement(9016681..9017635); ...	<u>31</u>	5.3
<u>CG9660-RA</u>	type=transcript; loc=2L:complement(3060908..3063300,30...	<u>31</u>	5.3
<u>CG9660-RD</u>	type=transcript; loc=2L:complement(3060908..3063300,30...	<u>31</u>	5.3
<u>CG9660-RC</u>	type=transcript; loc=2L:complement(3060908..3063300,30...	<u>31</u>	5.3
<u>CG9660-RB</u>	type=transcript; loc=2L:complement(3060908..3063300,30...	<u>31</u>	5.3
<u>CG4785-RA</u>	type=transcript; loc=2L:join(1166136..1166746,1166805....	<u>31</u>	5.3
<u>CG13693-RA</u>	type=transcript; loc=2L:join(232514..233154,233217..2...	<u>31</u>	5.3

CG7922-RA type=transcript;
 loc=3R:join(17299011..17299147,17299205..17299538,
 17299667..17300541,17300638..17303289,
 17303353..17303568); ID=CG7922-RA; name=CG7922-RA;
 db_xref=FlyBase:FBtr0084109,FlyBase:FBgn0038889,
 Gadfly:CG7922-RA; len=4214
 Length = 4214

Genome Map

Homología 100%

```
3AA42: 362 ttttctccaatttttcca 379
      |||
CG7922: 3294 ttttctccaatttttcca 3277
```

Identificamos que la inserción del elemento P-GAL4 cayó en el gen *CG7922*. Se encuentra reportado solo el alelo silvestre. Este gen codifica para un RNA mensajero *CG7922-RA* de 4214 nucleótidos, este se traduce en una proteína de 1383 residuos de aminoácidos.

La proteína codifica para una helicasa de RNA con un dominio DEAD/DEAH box, un dominio de helicasa en el C-terminal y un loop que contiene la actividad de hidrolasa.

La actividad de esta proteína se infiere por homología de secuencia, ya que no se ha descrito su actividad de forma experimental (Lasko., 2000).

Este gen ha sido localizado en el brazo R del tercer cromosoma, en la posición 95E2. Esto correlaciona con nuestro mapeo genético de la inserción el cual localizamos también en el tercer cromosoma (Fig. 30).

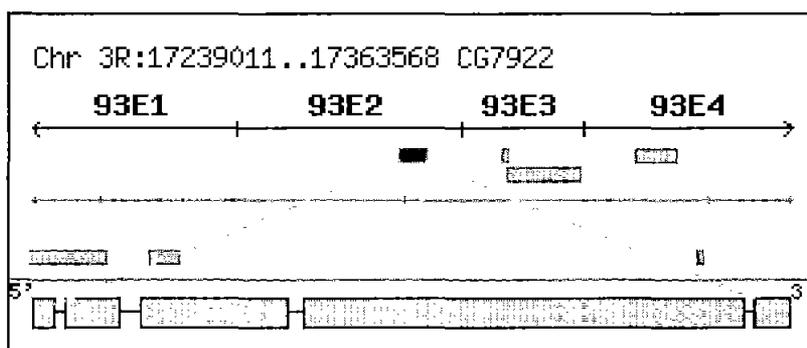


Fig. 30. Localización citogenética Cromosoma 3 Brazo R 93E2-93E3

<http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbidq.html?FBgn0038889&content=full-report>

Para corroborar la inserción se extrajo DNA de la línea homociga para inserción 3A42/3A42 y de la línea heterociga 3A42/Tm2. Usando este DNA como templado, hice un PCR con oligos diseñados para amplificar 630 pb del gen CG7922 (Fig.31). Para corroborar que la inserción se amplificó por PCR un fragmento usando un oligo del elemento P y otro que amplifica parte de la secuencia del gen CG7922 (Fig. 32).

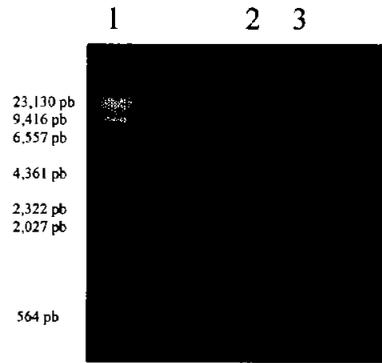


Fig. 31 Marcador de pesos moleculares 100 pb (carril 1). PCR control usando como templado DNA de moscas homóclgas para la inserción 3A42/3A42 y no obtuvimos ningún amplificado (carril 2). PCR usando como templado DNA de moscas 3A42/Tm2 usando los olígos 3A Fw y 3A Rv. Estos olígos amplifican un producto de 624 pb del gen CG9381 (carril 3) en la línea heteróclga para la inserción. (gel de agarosa 1%, bromuro de etídlío)

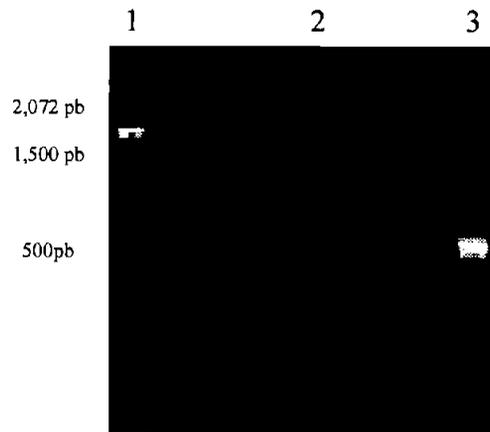


Fig. 32 Marcador de pesos moleculares 100 pb (carril 1). Fragmento de PCR amplificado usando DNA templado de la línea 3A42/Tm2 con el olígo 3A Fw del gen CG7922 y el olígo Amp 3' Fw del elemento P (carril 2). Control de PCR usando los olígos 3A Fw y 3A Rv amplificando 624 pb del gen CG79221 (gel de agarosa 1%, bromuro de etídlío)

Para corroborar que la inserción se amplificó por PCR un fragmento usando un olígo del elemento P y otro que amplifica parte de la secuencia del

Se corroboró la inserción por PCR en el gen *CG7922*, ya que se obtuvo un producto de amplificación usando el olígo del gen 3A Fw y el olígo Amp 3' Fw del elemento P. Se hizo un PCR control a todos los olígos por separado para comprobar que no se amplificara ninguna banda al usar el olígo solo sin su complementario.

Discusión:

En este trabajo se caracterizaron tres líneas que tienen una inserción de un elemento P-GAL4 en su genoma. Cuando cruzamos estas líneas con moscas que llevan la toxina de tétanos bajo el control de las secuencias UAS, la progenie que llevaba ambos elementos, presentó un fenotipo definido. En ésta progenie observamos que cuando inactivamos un subconjunto de neuronas con la toxina de tétanos obteníamos fenotipos definidos y observables. Cuando visualizamos mediante la proteína reportera GFP obtuvimos un mapa neuronal de estos circuitos.

De forma importante concluimos que el fenotipo de cada línea es resultado de la inactivación selectiva de un grupo de neuronas específicas, debido a que solo cuando se expresa la TetLxc se observa el fenotipo. Es a la inactivación de cada circuito en particular a lo que le atribuimos el fenotipo específico de cada línea, puesto que la inserción *per se* no causa ningún efecto aparente en ninguna de las líneas.

Línea 1DB3A:

La primera línea que caracterizamos fue la 1DB3A, la cual tiene insertado en su genoma un elemento P-GAL4. Este transposón atrapó las secuencias regulatorias del gen en donde cayó. Cuando cruzamos esta línea con otra que lleva las secuencias UAS-TetLx, dirigimos de manera específica la expresión de la toxina en un subconjunto de neuronas, lo cual se manifestó en un fenotipo de parálisis motora en esta línea. De forma interesante la parálisis fue progresiva en las moscas con genotipo 1DB3A/TetLx y a la semana de que los individuos eclosionaron ya estaban paralizados totalmente. Esto recuerda a algunas

enfermedades neurodegenerativas humanas como por ejemplo la adrenoleucodistrofia (ALD) (Peters *et. al.*, 2004) o el mal de Parkinson.

Las neuronas del GTA inervan diferentes grupos musculares en larva, y algunos de estos patrones se mantienen durante su desarrollo. En el en el adulto, el cerebro y los lóbulos ópticos están relacionados principalmente con el aprendizaje y el procesamiento de la información que proviene del medio ambiente, mientras que el ganglio torácico abdominal está mayoritariamente involucrado en procesos motrices ya que las neuronas de esta estructura inervan a diferentes grupos musculares que están presentes en las patas, las alas, los intestinos y el tracto uro-genital.

Usando como gen reportero *GFP*, pudimos observar un circuito neuronal discreto bien definido en el ganglio torácico abdominal en la larva. Esto correlaciona con el hecho de que el ganglio esta relacionado a las funciones motrices

Los diez pares de neuronas que expresan *GFP* en esta línea, se localizan en los dos últimos segmentos del ganglio torácico (T2 y T3) y en los ocho segmentos del ganglio abdominal, por lo que quizá estas neuronas estén inervando a regiones importantes para la motilidad. La células nerviosas como es el caso de las motoneuronas, inervan a grandes grupos musculares del tórax y el abdomen, lo que podría sugerir que ésta desregulación sea responsable del fenotipo progresivo de parálisis que observamos. El hecho de que sigan alimentándose aun paralizadas nos indica que los músculos maxilares no están afectados, lo que correlaciona con el hecho de que no observamos señal de *GFP* en el ganglio subesofágico, sitio de donde provienen los nervios que inervan a éstos músculos.

Otra explicación sería quizá, que las moscas si se puedan mover, pero que estén deprimidas, es decir que el circuito este formado por neuronas secretorias y que la falta de algún neurotransmisor, por ejemplo la serotonina, cause la parálisis progresiva (Valles *et al.*, 1988). Esto lo proponemos debido a que las moscas son capaces de vivir mucho tiempo sin moverse, únicamente alimentándose, por mas de 40 días. Lo cual indica que los músculos del intestino y del tracto uro-genital están activos y funcionando. Para poder encontrar la causa de la parálisis podemos hacer inmunohistoquímica para determinar si son neuronas de tipo neuro-secretor, interneuronas, motoneuronas o neuronas sensoriales (Bate and Martínez., 1993).

Identificamos al gen *CG11163* como el sitio en donde cayó la inserción. Este gen codifica para una proteína la cual, por análisis de homología de secuencia, presenta una actividad de transportador de zinc. Se encuentra clasificado dentro de una familia de proteínas cuya función es la salida de cationes de la célula, y al igual que los demás miembros, se predice que es un componente integral de membrana. Estas proteínas son consideradas bombas de salida de cationes divalente de la célula y su importancia radica en mantener la correcta homeostasis de zinc en la célula; también se ha reportado que aumentan la tolerancia a otros cationes divalentes como cobalto y cadmio. (Xiong A. *et al.*, 1998. Kunito T. *et al.*, 1996. Conklin D.S. *et al.*, 1992). No se tiene reportado que al alterar este gen se observe un fenotipo similar al que nosotros encontramos. Pero dado que no se tienen pocos datos *in vivo* de ésta proteína, estamos interesados en estudiar posteriormente su posible papel neurológico.

Concluimos que el fenotipo de parálisis que observamos es causado por la inactivación de un circuito neuronal discreto, ya que el fenotipo solo aparece en presencia de la UAS-TetLx. La inserción *per se* no presentó ningún fenotipo aparente en las moscas heterocigas para la inserción 1DB3A/Cyo, ni en las homocigas 1DB3A/1DB3A.

Línea 2A2δ:

La segunda línea que caracterizamos fue la 2A2δ, la cual presento un fenotipo machos "faratos" en respuesta a la inactivación selectiva de sus neuronas por la TetLx. Esta línea presentó un circuito neuronal extenso en el ganglio torácico abdominal y en los lóbulos ópticos de larva, al usar como reportero GFP. Por esta razón usamos el reportero TAU-GFP con lo cual definimos mejor el circuito.

Los faratos son individuos adultos que ya pasaron por todo el proceso de metamorfosis pero que son incapaces de eclosionar. El proceso de eclosión del pupario requiere una vigorosa actividad muscular, así la cabeza del farato adulto es cíclicamente "inflada", lo cual hace la función de una cuña dentro de la parte anterior de la cápsula de la pupa, el operculo, este proceso termina por abrirlo, permitiendo la eclosión (Laing., 1935; Crossley., 1978). Este continuo inflar y desinflar es llevado a cabo por la contracción de los músculos abdominales forzando a la hemolinfa hacia la cabeza, para desinflar se usan los músculos retractores de la cabeza. De forma importante los individuos faratos 2A2δ/TetLx no everten la cabeza. Especulamos que la inactivación del circuito causa un defecto en la neuromodulación de músculos necesarios para que las

moscas puedan everter la cabeza en los machos, y está alteración temprana en el desarrollo de la pupa, se refleje quizá posteriormente en el fenotipo de faratos.

Algunos de los individuos lograron escapar al fenotipo de faratos, el hecho de que haya individuos que lleguen hasta la etapa adulta, puede deberse en parte de que las neuronas que estamos inactivando modulan a la mayoría de los músculos involucrados en la eclosión, pero no a todos, permitiendo así que una pequeña proporción de los individuos sea capaz de eclosionar. Los machos que logran eclosionar no presentan ningún efecto evidente, lo cual no descarta que tengan problemas a otro nivel o que quizá se manifiesten en etapas más tardías de su vida.

Otra posibilidad es que se trate de un fenotipo endocrino, pues existen hormonas involucradas en la eclosión como la EH, la cual es producida por células neuro-secretoras en la parte ventral media del cerebro de larva, pupa y faratos. Ésta hormona de eclosión está involucrada con los procesos de muerte celular programada de los músculos abdominales, lo que está relacionado con el proceso de mudar la cutícula de la pupa (ecdisis), lo que es indispensable para que la mosca adulta emerja (Kimura and Truman., 1990). Otras hormonas como la ecdisona es necesaria para el inicio de la pupación y posteriormente del desarrollo en el adulto, además de que es necesaria para la liberación de péptidos necesarios para la ecdisis (Li and Bender., 2000). Mutantes condicionales de ecdisona son incapaces de eclosionar a menos que se les suministre ecdisona de forma exógena (Klose *et al.*, 1980).

El gen CG9381 fue identificado como sitio de inserción del elemento P en la línea 2A2 δ , este gen, también conocido como muraska ya ha sido descrito. En estudios anteriores se han aislado mutantes en este gen asociado a defectos de aprendizaje y memoria a largo plazo en *D. melanogaster*, esto apoya nuestra hipótesis de que atrapamos un gen neuronal (Labourier *et al.*, 2002. Dubnau *et al.*, 2003. Mutsuddi *et al.*, 2004).

El transcrito del gen muraska se traduce en dos proteínas de alto peso molecular, las cuales tienen un dominio de E3 ligasa y de E1 activadora de ubiquitina respectivamente. Esto es inferido mediante el análisis de homología de secuencia.

Concluimos que el fenotipo de "faratos" observado solo en los machos, es causado por la inactivación de un circuito neuronal sexo específico, ya que el fenotipo solo aparece en presencia de la TetLx. La inserción *per se* no presentó ningún fenotipo aparente en las moscas heterocígas para la inserción 2A2 δ /Tm2.

Línea 3A42:

La tercera línea que caracterizamos fue la 3A42, la cual tiene insertado en su genoma un elemento P-GAL4. Este transposón atrapó las secuencias regulatorias del gen en donde se insertó. Cruzamos esta línea con otra que lleva las secuencias UAS-TetLx y buscamos en la progenie aquellos individuos que llevaban ambos elementos. De esta forma observamos que la inactivación selectiva de un grupo de neuronas del ganglio torácico abdominal (GTA) en estas moscas causó un fenotipo de "patas chuecas" en los individuos, además de

que la gran mayoría no extendía las alas. Dos pares de estas neuronas de éste circuito presentaron proyecciones nerviosas muy largas hacia afuera del sistema nervioso central. Probablemente el primer par de nervios que observamos con la GFP, provengan del tercer segmento torácico del GTA, el cual inerva a órganos sensoriales, y de forma indirecta, al tercer par de patas. El segundo par de nervios que observamos con la GFP probablemente se trate del tercer segmento abdominal del GTA, el cual inerva al tercer segmento del abdomen del adulto (Fig. 33).

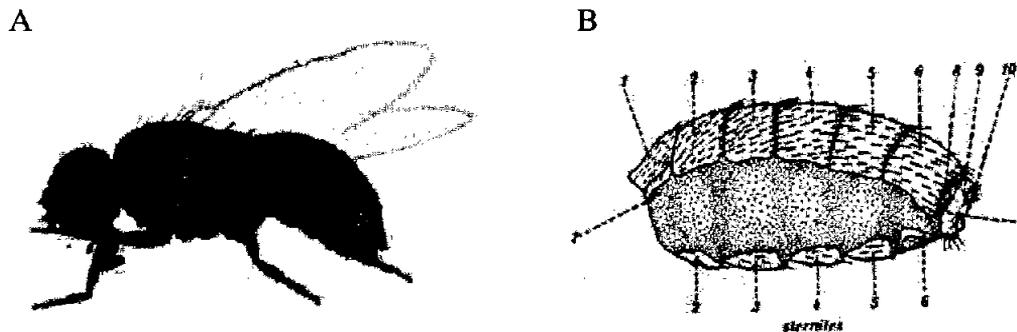


Fig. 33 A-Mosca adulta. Ojos color rojo. Cabeza color naranja. Tórax color amarillo. Patas y alas color café. Abdomen color B-Abdomen vista lateral segmentos del 1 al 8 inervados por sus correspondientes los nervios del Ganglio torácico abdominal segmentos 1-8. (Modificado de Demerec 1946 y Hartenstein., 1993)

Estamos interesados en encontrar hacia a donde se dirigen estos nervios, ya que quizá inerven músculos de las patas y/o las alas, los cual explicaría el defecto en éstas. Dos pares de las neuronas del circuito quizá estén inervando y estimulando a músculos de forma directa, ya que presentan estas largas proyecciones nerviosas. Esto no descarta que el resto de las neuronas que conforman el circuito sean quizá interneuronas.

Identificamos al gen *CG7922* como el sitio de la inserción del elemento P-GAL4. Este gen codifica para una helicaza de RNA y se predice que tienen un dominio DEAD/DEATH box, esto es inferido por homología de secuencia (Lasko, 2000). Las proteínas con esta firma se clasifican dentro de una familia de ATP-asas, las cuales se propone que regulan re-arreglos estructurales de RNA en una variedad de procesos celulares como el splicing, en ensamble de los ribosomas, la síntesis de proteínas, el transporte nuclear y la degradación del RNA (Wassarman *et al.*,1991. Aubourg S. *et al.*,1999. De la Cruz J *et al.*.,1998).

Concluimos que el fenotipo observado es causado por la inactivación de un subconjunto de neuronas en el ganglio torácico abdominal por la acción de la TetLx. La inserción *per se* no presentó ningún fenotipo aparente en las moscas heterocigas para la inserción 3A42/Tm2.

Perspectivas:

Estamos interesados en visualizar el circuito neuronal a lo largo del tiempo y si es que éste se remodela, mediante disecciones de individuos de cada una de las líneas en los diferentes estados de vida.

Queremos identificar también los sitios de innervación de las neuronas de cada circuito con fluorescencia (GFP) y seguir así sus proyecciones axonales mediante disecciones de organismos adultos, ya que en estos es en donde observamos el fenotipo, incluyendo a la línea 2A2 δ como faratos adultos.

Es importante identificar el tipo de neuronas que conforman cada circuito, para lo cual podemos hacer inmunohistoquímica, usando anticuerpos contra diferentes marcadores neuronales y neurotransmisores. En *Drosophila melanogaster* el principal neurotransmisor de neuronas de tipo excitatorio es el glutamato, por lo que este sería uno de los primeros blancos a buscar.

Finalmente también queremos estudiar el efecto de la inactivación de las neuronas de cada circuito con la TetLx hasta su etapa adulta y no antes, esto se puede modular finamente mediante un represor como GAL80 (Suster *et. al.*, 2004). De esta forma quizá lograríamos ver en la línea 2A2 δ eclosionar a los individuos adultos y estudiar que pasaría si en ese momento inactivamos el circuito.

Conklin D.S. , McMaster J.A. , Culbertson M.R. , Kung C.

COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3678- 3688 (1992)

Cooley, Lynn, Kelley, Richard, Spradling, Allan

Insertional Mutagenesis of the "Drosophila" Genome with Single P Elements. *Science*. Mar 4, 1988. Vol. 239, Iss. 4844; p. 1121

Corradini et al.,

FISH analysis of *Drosophila melanogaster* heterochromatin using BACs and P elements. *Chromosoma* 112(1): 26—37 2003

Crossley, A. C

The morphology and development of the *Drosophila* muscular system, pp. 499–560 in *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 2b, edited by M. ASHBURNER and T. R. F. WRIGHT. Academic Press, London. 1978

Deco G, Rolls ET.

Attention and working memory: a dynamical model of neuronal activity in the prefrontal cortex. *Eur J Neurosci.* 2003 Oct;18(8):2374-90.

De la Cruz J. , Kressler D. , Linder P.

Unwinding RNA in Saccharomyces cerevisiae: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24: 192- 198 (1999)

Demerec, M.

Biology of Drosophila. Facsimile Edition. 1994 Cold Spring Harbor. Republication of the 1950 edition published by Jhon Wiley and sons. New York.

Doe, C. Q. (1992).

Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855–863.

Doe, C. Q., and Goodman, C. S. (1985).

Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* 111, 193–205.

Dubnau et al.,

The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr. Biol.* 13(4) (2003)

Duffy Joseph B.

GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 2002 Sep-Oct;34(1-2):1-15.

Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M.

GAL4 activates transcription in Drosophila.

Nature. 1988 Apr 28;332(6167):853-6.

Giniger E, Varnum SM, Ptashne M.

Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. Cell 40:767-774 (1985)

Hartensen Volker

Atlas of Drosophila Development. Cold Spring Harbor Laboratory Press U.S.A. (1993)

Hertweck, H.

Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von Drosophila melanogaster. (1931) Z. wiss. Zöl. 139:559-663

Hiraizumi, Y.

Spontaneous recombination in Drosophila melanogaster males. Proceed. Nat. Acad. Scie. Vol 68, No2, 268-270 (1971)

Hiromi Y, Mlodski M.

Enhancer trap method in Drosophila: its application to neurobiology. Methods in neurosciences. Vol 9 pp 399-414 (1992).

Hirst M, Ho C, Sabourin L, Rudnicki M, Penn L, Sadowki I.

A two-hybrid system for activator bait proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98:8726-8731 (2001)

Hua JY, Smith SJ.

Neural activity and the dynamics of central nervous system development. Nat Neurosci. 2004 Apr;7(4):327-32. Review.

Huang, A.M., Rubin, G.M.,

A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in drosophila melanogaster. Genetics 156, 1219-1230. 2000

Hugh M. Robertson, Christine R. Preston, Randall W. Phillis, Dena M. Johnson-Schlitz, Wendy K. Bern and William R. Engels

A Stable Genomic Source of P Element Transposase in Drosophila melanogaster. Genetics 118: 461-470 (March, 1988)

Hummel, T., Schimmelpfeng, K., Klambt, C.,

Commissure formation in the embryonic CNS of drosophila. Dev. Biol. 209,381-398 1999

Joshua S. Kaminker, Casey M. Bergman, Brent Kronmiller, Joseph Carlson, Robert Svirskas, Sandeep Patel, Erwin Frise, David A. Wheeler, Suzanna Lewis, Gerald M. Rubin, Michael Ashburner and Susan E. Celniker

The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin - a genomics perspective . *Genome Biology* (2002) 3:research0084.1-0084.20

Kimura, K.I. and J.W. Truman.

Postmetamorphic cell death in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosciences*. 10: 403-441 (1990)

Klamt C, Goodman CS.

The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Glia*. 1991;4(2):205-13. Review.

Klose, W. E. Gateff, H. Emmerich, and H. Beirlich.

Developmental studies on two ecdysone deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 189:57-67 (1980)

Kopczynski et al.,

A high throughput screen to identify secreted and transmembrane proteins involved in *Drosophila* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17): 9973—9978 (1998)

Kraut, R., Menon, K., Zinn, K.

A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2001 11(6):417--430

Kunito T., Kusano T., Oyaizu H., Senoo K., Kanazawa S., Matsumoto S.

Cloning and sequence analysis of czc genes in Alcaligenes sp. strain CT14. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 699- 704 (1996)

Labourier et al.,

The KH-type RNA-binding protein PSI is required for *Drosophila* viability, male fertility, and cellular mRNA processing. *Genes Dev.* 16(1): 72—84 (2002)

Laing, J

On the ptilinum of the blow-fly *Calliphora erythrocephala*. *Quart. J. Microscop. Sci.* 77:497-521. 1935

Laughon A, Gesteland RF.

Primary structure of the *Sacharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol* 4:260-267 (1984)

Lasko,

The *Drosophila melanogaster* genome: translation factors and RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* 150(2): F51--F56 (2000)

Lee T, Luo L.

Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*. 1999 Mar;22(3):451-61.

Lester I. Binder Anthony, Frankfurter R, and Lionel I Rebhun.

The Distribution Central Nervous of Tau in System the Mammalian. *The Journal of cell Biology*. Vol. 101 October pp. 1371-1378 (1985)

Li T, Bender M.

A conditional rescue system reveals essential functions for the ecdysone receptor (EcR) gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Development*. 2000 Jul;127(13):2897-905.

Maskos, U., Kissa, K., Cloment, C., Brulet, P.

Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proceed. Nat. Acad. Sci.* Vol 99 No 15, 10120-10125. (2002)

Melcher K. Xu He.

Gal80-GAL80 interaction on adjacent GAL4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO J.* 20:841-851 (2001)

M.D. Adams, S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides et al.,
The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (2000), pp. 2185–2195

Murray Micael J. Merrit David J. Brand Andrea. Whittington Paul M.

In vivo dynamics of axon pathfinding in the *Drosophila* CNS. A time lapse study of an identified motoneuron. (1998)

Mutsuddi et al.,

The spinocerebellar ataxia 8 noncoding RNA causes neurodegeneration and associates with stau68 in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 14(4): 302–308 (2004)

Niemann, H., Brasi, J., and Jahn, R.

Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4, 179-185. (1994)

O'Kane Cahir J. Ghering Walter J.

Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 84, pp 9123-9127 December (1987)

Pernille Rorth.

A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 93, pp 12418-12422 October (1996)

Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W.

Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):881-8. 2004

Phelps CB, Brand AH.

Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*. 1998 Apr;14(4):367-79. Review.

Poulson,D.F., and E.J. Boell 1946

A comparative study of cholinesterase activity in normal and genetically deficient strains in *Drosophila melanogaster*. *Biol Bull*. 91:228

Ptasne M.

How eucariotyc transcriptional ativators work. *Nature* 335:683-689 (1988)

Salzberg A, Prokopenko SN, He Y, Tsai P, Pal M, Maroy P, Glover DM, Deak P, Bellen J.

P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics*. 1997 Dec;147(4):1723-41.

Sambrook, J. Fritsch, E.F. Maniatis, T.

Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. 1989. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA.

Satoru Otani

Prefrontal cortex function, quasi-physiological stimuli, and synaptic plasticity *Journal of Physiology-Paris* Vol. 97, (4-6) , July-November 2003, Pg 423-430

Schmidt H, Rickert C, Bossing T, Vef O, Urban J, Technau GM.

The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol*. 1997 Sep 15;189(2):186-204.

Schmid S.R. , Linder P.

D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol*. 6: 283- 292 (1992)

Seeger.M., Tear,G., Ferress-Marco, D., Goodman, C.S.,

Mutation affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10, 409-426 1993

Seroude Laurent

GAL4 drivers expresión in the whole adult fly *Genesis* 34:34-38 (2002)

Schiavo, G., Mattetoli, M., and Montecucco,C

Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Phsiol. Rev*. 80, 717-766. ,(1991)

Sharma Yashoda, Cheung Una, Larsen EllenW, Eberl DanielF.
pPTGAL, a Convenient Gal4 P-Element Vector for Testing Expression of Enhancer Fragments in Drosophila. *Genesis* 34:115–118(2002)

Spradling AC, Stern Dianne M, Kiss Istvan, Roote John, Alberti Todd, Rubin Gerald M.
Gene disruptions using P-transposable elements: An integral component of the drosophila genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 92, pp. 10824-10830, November (1995)

Sullivan William, Ashburner Michael, Hawley Scott R.
Drosophila Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000 N.Y.

Sun Banghua, Xu Peizhang, Salvaeterra Paul M.
Dynamic visualization of nervous system in live Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 10438–10443, August 1999

Suster Maximilano L, Martín Jean-Rene, Sung Carl, Robinow Steven.
Target expresión of tetanus toxin reveals sets of neurons involved in larval locomotion in drosophila. (2002)

Suster Maximiliano L, Seugnet, Laurent, Bate, Michael, Sokolowski, Maria B.
Refining GAL4-Driven Transgene expresión in Drosophila with a GAL80 Enhancer-Trap. *Genesis* 39:240-245 (2004)

Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ.
Targeted expression of tetanus toxin light chain in Drosophila specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron*. 1995 Feb;14(2):341-51

Truman JW, Bate M.
Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of Drosophila melanogaster. *Dev Biol*. 1988 Jan;125(1):145-57.

Tsubota Stuart and Dang-Vu Huong
Capture of flanking DNA by a P element in Drosophila melanogaster: Creation of a transposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 88, pp. 693-697 February (1991)

Tzumin Lee and Liqun Luo
Mosaic Analysis with a Repressible Neurotechnique Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron*, Vol.22, pp 451-461, March, (1999)

Valles, A. M., and White, K.
Serotonin-containing neurons in Drosophila melanogaster: Distribution and development. *J. Comp. Neurol*. 168, 414–428 (1988).

Verderio C, Coco S, Bacci A, Rossetto O, De Camilli P, Montecucco C, Matteoli M.
Tetanus toxin blocks the exocytosis of synaptic vesicles clustered at synapses but not of synaptic vesicles in isolated axons.

Wassarman D.A. , Steitz J.A.

RNA splicing. Alive with DEAD proteins [news; comment].

Nature 349: 463- 464 (1991)

Watts RJ, Hoopfer ED, Luo L.

Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron*. 2003 Jun 19;38(6):871-85.

Wheeler, W. M. (1891).

Neuroblasts in the arthropod embryo. *J. Morphol.* 4, 337–343. *J. Morphol.* 4, 337– 343.

William Sullivan, Michael Ashburner, R.Scott Hawley,

Drosophila Protocols , Cold Spring Harbor, New York, USA. (2000),

Chapter 23 p 429-437

Xiong A. , Jayaswal R.K.

Molecular characterization of a chromosomal determinant conferring resistance to zinc and cobalt ions in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 180: 4024- 4029 (1998)

Yeh Edward, Gustafson Kerstin, Boulianne Gabrielle.

Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*.

Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 92, pp 7036-7040, July 1995

Zhang P, Spradling AC.

Insertional mutagenesis of *Drosophila* heterochromatin with single P elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26;91(9):3539-43.

<http://flybase.bio.indiana.edu/>