

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**RASTREO DE GENES IMPLICADOS EN LAS PARAPLEJIAS  
ESPÁSTICAS HEREDITARIAS ASOCIADAS A *atlastina* EN  
*Drosophila melanogaster***

**GERARDO ENRIQUE ORTIZ LIRA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN GENÉTICA**

**Director de Tesis:** Prof. Dr. Patricio A. Olgún A.

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato**

**GERARDO ENRIQUE ORTIZ LIRA**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister con mención en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día jueves 28 de junio del año 2016.**

**Prof. Dr. ....  
Director de Tesis  
(Laboratorio Genética del Desarrollo)**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dra. ....**

**Prof. Dra. ....**

**Prof. Dr. ....**

**Prof. Dra. ....  
Presidenta Comisión**

Dedico este logro a mi mamá Ximena, mi papá Gerardo, mi hermano Sebastián, mi tía Rosa, mi polola Jocelyn y mi hijo Joaquín que han permitido que finalice esta etapa en mi vida y que sin su apoyo y ayuda no habría sido capaz de cumplir.

## Agradecimientos

Antes de comenzar, me gustaría mencionar que toda la gente que nombraré ha sido parte fundamental en todo este proceso y que sin su valiosa ayuda no habría podido completar esta etapa de mi vida que está llegando a su final.

En primer lugar, a la gente que forma parte del Programa de Genética Humana, por haberme acogido como uno más desde un comienzo y otorgarme todas las herramientas necesarias para crecer profesionalmente a un nivel que jamás pensé que iba a llegar a tener.

Al Laboratorio de Genética del Desarrollo de *Drosophila*. Nunca olvidaré el momento en que debía elegir pronto un lugar para hacer mi Unidad de Investigación (y posterior Tesis) y que no tenía certeza de dónde realizarlo. Fue hasta que vi a tres integrantes de ese laboratorio que explicaron una técnica que iban a ponerla en marcha prontamente y que parecía tan interesante de realizar que me convencieron que debía trabajar ahí. Y no me equivoqué. Comienzo nombrando a Miguel, una persona con una calidad humana inmensa, me ayudó en muchas ocasiones en que tenía dudas y siempre con una serenidad que no veo muy a menudo; una virtud en los acelerados tiempos que vivimos. Prosigo con Mauricio, que siempre tuvo gran voluntad conmigo y que cada vez que le preguntaba algo, siempre me ayudó dándome información clara y precisa. Continúo con Catalina, que desde el momento en que entramos en confianza, se generó entre nosotros una relación de amistad que va a perdurar. Siempre que necesité de su ayuda, me la brindó de la mejor forma. El siguiente es Franco, que desde que nos conocimos, fue como si nos conociéramos de hace mucho tiempo y vaya que la hemos pasado bien; pocas veces tengo la oportunidad de conocer gente como él, siempre con una buena disposición, humor y ganas de hacer del lugar de trabajo también algo distendido, donde hasta el más serio puede sentirse cómodo y pasarla bien. Agradecido estoy de todas las cosas que hemos compartido y no olvidaré que fuiste uno de los que me enseñó buena parte de las cosas que aprendí aquí. También agradezco a Andrés, mi gran amigo y el más cercano de los que conocí en el Laboratorio. Desde un comienzo tuvimos buena, generando gran afinidad y confianza mutua. No dudo

que nuestra amistad seguirá después de esto. También a los dos últimos integrantes que el laboratorio adquirió, Ignacio y Nolberto, que siempre aportan a la sana convivencia con su forma de ser agradable y tranquila. Finalmente, agradecer a mi profesor tutor de Tesis, el Dr. Patricio Olgún, profesor investigador y responsable del laboratorio. Apenas llegué, se preocupó por hacerme sentir lo más cómodo posible. Con él aprendí muchas cosas que no tenía idea siquiera que se podían hacer. Agradezco enormemente la confianza que siempre depositó en mí y que desde un comienzo me animó a hacer más y más cosas; además, siempre que pudo, me consideró para participar de actividades académicas como presentaciones orales, asistencias a congresos y ferias. Es de aquellas personas que no te deja sólo y siempre te guía, ayudándote en todo lo que pueda. Muchas gracias por todo.

Agradezco también a mi profesora tutora de magíster, la Dra. Luisa Herrera que siempre estuvo ahí para ayudarme en temas que no necesariamente eran de índole académico. Me brindó todo su apoyo apenas llegué a la universidad, preocupándose constantemente de mis avances y cómo me sentía en el Programa de Genética Humana.

A mis padres: Ximena y Gerardo que siempre han estado conmigo apoyándome en todas las cosas que quiero hacer para mi formación, porque que han creído en mis capacidades para llegar lejos. Me enorgullezco enormemente en ser su hijo y estoy agradecido de la vida por haberme dado padres tan maravillosos. A mi hermano Sebastián por darme su apoyo incondicional en aquellos momentos más duros y por confiar en mis capacidades totalmente. A mi tía Rosa por darme ánimo y palabras de apoyo constantemente, en especial cuando estaba decaído y estresado.

Finalmente, a mi polola Jocelyn por ser la persona que más ha compartido conmigo durante todo este largo proceso y que llevamos cinco años de puro amor.

Ha estado conmigo en las buenas, en las malas y encuentra siempre la palabra precisa para animarme. Me ayuda a pensar algunas situaciones de manera diferente, siendo más objetiva, ya que las ve desde otro punto de vista. Ha sido el bálsamo que me ha permitido sobrellevar la carga del magíster con aplomo y coraje, logrando que mantenga la calma, serenidad y valentía en esos momentos en que no todo andaba muy bien. Es mi confidente, nadie me conoce tanto como ella y por eso, además de otras cosas, le estoy profundamente agradecido. Te amo mucho Amorsin. Además, gracias al amor que nos tenemos, fuimos padres de un bebé hermoso al que llamamos Joaquín, que es la razón de mi existencia en estos momentos y que me ha dado un nuevo aire en mi vida. Ser padre es de las cosas más lindas de este mundo y ahora que puedo hablar desde la experiencia, sólo puedo decir que estoy inmensamente agradecido de la vida por el bello bebé que nos ha dado.

A todos los que nombré y también a aquellos que no lo hice producto del espacio, pero que saben que están ahí, quiero comentarles que tienen un lugar en mi vida no menor; que bueno poder contar con ustedes para lo que sea y que el sentimiento siempre será recíproco. Cuentan con mi apoyo para lo que sea, siempre.

### **Lugar de realización**

- Laboratorio de Genética del Desarrollo de *Drosophila*
- Programa de Genética Humana
- Instituto de Ciencias Biomédicas
- Facultad de Medicina
- Universidad de Chile

### **Financiamiento**

- Proyecto financiado por CONICYT: “*The cell biology of hereditary spastic paraplegias using Drosophila as a model organism*”. USA2013-0020, ICM P09-015-F.

**A la fecha, este trabajo ha dado origen a la siguiente comunicación:**

Ortiz G., Candia N., Ibacache A., Sierralta J., Couve A. and Olguín P. Identification of Atlastin-interacting genes in a *Drosophila* model of Hereditary spastic paraplegias.

Panel presentado en dos congresos y una feria académica:

- XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Valdivia, Chile. 18 al 21 de octubre de 2015. **Obtención del primer lugar al mejor trabajo presentado como panel.**
- XXIX Congreso de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 25 al 29 de octubre de 2015
- 1a Feria Grados Académicos para estudiantes de postgrado de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. 6 de abril de 2016.



## **ÍNDICE GENERAL**

Índice General.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tablas.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vi
Summary.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1 Las Paraplejias Espásticas Hereditarias.....	1
1.2 Papel de la atlastina en las PEHs.....	4
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> en el estudio de la <i>atl</i> en las PEHs.....	5
2. Hipótesis.....	10
3. Objetivos.....	10
3.1 Objetivo General.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
4. Materiales y Métodos.....	12
4.1 Sistema UAS-GAL4.....	12
4.2 Cepas utilizadas.....	13
4.2.1 Cepa de prueba.....	13
4.2.2 Cepas estandarización.....	13
4.2.3 Cepas con interferente para <i>tkv</i> .....	15
4.3 Evaluación de la función motora.....	16
4.4 Cruzamientos.....	17
4.5 Recolección de moscas.....	17
4.6 Ensayo de escalada.....	18
4.7 Análisis de videos.....	20
4.8 Análisis estadístico.....	21
4.9 Obtención de sinapsis de larvas.....	21
4.10 Observación de la sinapsis de la UNM.....	25
4.11 Disección de larvas.....	25
4.12 Inmunohistoquímica.....	27
4.13 Cuantificación de los datos obtenidos de la sinapsis de la UNM.....	29

5. Resultados.....	31
5.1. El fenotipo de escalada asociado a la disminución de atlastina es modificado por genes conocidos que interactúan con <i>atl</i> .....	31
5.2. El rastreo del cromosoma 2 revela regiones que modifican el fenotipo motor de escalada asociado a la disminución de la expresión de <i>atl</i> .....	34
5.2.1. Rastreo Brazo 2L.....	36
5.2.2. Rastreo Brazo 2R.....	40
5.3. Las UNM de larvas con expresión disminuida de <i>atl</i> en motoneuronas presentan un aumento de botones satélites, lo cual es revertido al quitar una copia de la región correspondiente a las deficiencias 7497 y 7783.....	44
5.4. Cruzas con <i>dsRNAi</i> específicos para <i>tkv</i> demostró una disminución en el fenotipo motor en el ensayo de escalada.....	47
6. Discusión.....	50
7. Conclusiones.....	55
8. Proyecciones.....	56
9. Bibliografía.....	57
10. Anexo.....	60
10.1 Anexo I. <b>Figura A.</b> Ubicación de las agujas de disección (“pin”) en la larva.....	60
10.2 Anexo II. <b>Figura B.</b> Esquema que muestra la forma en cómo hacer el corte en la larva diseccionarla.....	61
10.3 Anexo III. <b>Figura C.</b> Esquema que representa los cromosomas de la mosca.....	62
10.4 Anexo IV. <b>Figura D.</b> Esquema que muestra las deficiencias existentes en cada brazo de los cuatro cromosomas de la mosca.....	62
10.5 Anexo V. <b>Figura E.</b> Pares de segmentos que servirán para observar las sinapsis de la UNM.....	63
10.6 Anexo VI. <b>Figura F.</b> Representación gráfica de la fenotipificación completa del brazo 2L.....	64
10.7 Anexo VII. <b>Figura G.</b> Representación gráfica de la fenotipificación completa del brazo 2R.....	65

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Neurona que muestra la ubicación espacial de las proteínas involucradas en las PEHs.....	3
<b>Figura 2.</b> Comparación del gen <i>atlastina</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> (dm) y <i>Homo sapiens</i> (hs).....	7
<b>Figura 3.</b> Ilustración de cómo funciona el sistema <i>UAS-GAL4</i> en <i>Drosophila</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Representación del ensayo de escalada.....	19
<b>Figura 5.</b> Cuantificación de moscas que escalan sobre los 2 y 5 cm para los días 5 y 15.....	32
<b>Figura 6.</b> Diagrama de flujo que representa cómo se seleccionaron las deficiencias candidatas y las que fueron descartadas.....	35
<b>Figura 7.</b> Cuantificación de los ensayos de escalada para los días 5 y 15 para las condiciones con <i>C380-G4; dsRNAiatl</i> y con <i>C380-G4</i> en las deficiencias candidatas del brazo 2L.....	37
<b>Figura 8.</b> Criterios de selección para deficiencias candidatas en brazo 2L.....	39
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de los ensayos de escalada para los días 5 y 15 para las condiciones con <i>C380-G4; dsRNAiatl</i> y con <i>C380-G4</i> en las deficiencias candidatas del brazo 2R.....	40
<b>Figura 10.</b> Criterios de selección para deficiencia candidatas en brazo 2R.....	43
<b>Figura 11.</b> Cuantificación realizada al contar la cantidad de botones sinápticos y botones satélites dividido por la longitud de la neurona en cada genotipo analizado.....	44
<b>Figura 12.</b> Representación de las neuronas con los diversos genotipos que muestran las sinapsis.....	46
<b>Figura 13.</b> Comparación entre las cepas de moscas que contienen una disminución a la expresión de <i>atl</i> ( <i>C380; RNAi</i> ) y los interferentes para <i>tkv</i> ubicados en el cromosoma 2 y 3.....	47
<b>Figura 14.</b> Comparación entre las cepas de moscas que contienen una disminución a la expresión de <i>atl</i> ( <i>C380; RNAi</i> ) y los interferentes para <i>tkv</i> ubicados en el cromosoma 2 y 3, utilizando como control las moscas cruzadas con el driver de expresión únicamente ( <i>C380-G4</i> ).....	49
<b>Figura 15.</b> Representación de la vía de señalización de BMP.....	52

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla N°1.</b> Representación de las deficiencias que nos dieron diferencias significativas en el brazo 2L.....	38
<b>Tabla N°2.</b> Representación de las deficiencias que nos dieron diferencias significativas en el brazo 2R.....	41

## **Abreviaturas**

°C	: Grados Celsius
AtI	: Atlastina
ATP	: Adenosina Trifosfato
BDSC	: Bloomington Drosophila Stock Center
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
CyO	: Curly
Df	: Deficiency
DM	: <i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
Dpp	: Decapentaplegic
dsRNAi	: Double Stranded RNA-Mediated Interference
Gbb	: Glass Bottom Boat
GFP	: Green Fluorescent Protein (Proteína fluorescente verde)
GTP	: Nucleótido Trifosfato de Guanina
HS	: <i>Homo sapiens</i>
HSP	: Hereditary Spastic Paraplegia
PBS	: Buffer Salino Fosfato
PBT	: Buffer Salino Fosfato + Tritón
PEH	: Paraplejia Espástica Hereditaria
RE	: Retículo Endoplásmico
REL	: Retículo Endoplasmático Liso
RER	: Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	: Ácido Ribonucleico
Spas	: Espastina
Tkv	: Thickveins
UAS	: Upstream Activating Sequence (Secuencia activadora río arriba)
UNM	: Unión Neuromuscular
VCP	: Valosin-Containing Protein (Proteína contenedora de valosina)
VDRC	: Viena Drosophila Resource Center

## **RESUMEN**

Las paraplejias espásticas hereditarias (PEHs) corresponde a diversos desórdenes genéticos caracterizados por la espasticidad de miembros inferiores y una marcada debilidad muscular debido a una degeneración de los axones más largos en los seres humanos. Los genes más conocidos causantes de las PEHs (*atlastina*, *espastina*, *VCP*) están involucrados en el tráfico intracelular, localización y conformación de organelos membranosos. El gen *atlastina* (*atl*) codifica para una GTPasa que media la fusión homotípica en las membranas del retículo endoplásmico (RE). En el tratamiento de PEHs asociadas a mutaciones en *atl* no se han descrito blancos terapéuticos efectivos ya que inhibir cualquiera de las proteínas asociadas resulta en defectos en la morfogénesis del RE. En *Drosophila melanogaster* existen genes codificantes para moduladores de la expresión y actividad de *atlastina*. Como el gen es conservado tanto en humanos como en *Drosophila*, se utilizó este modelo biológico para identificar genes que modulen su actividad. En esta tesis se rastrearon genes del cromosoma 2 (aproximadamente un 40% del genoma de *Drosophila*) que actúen como modificadores dominantes del fenotipo asociado a la disminución de la expresión de *atl* en neuronas motoras. Nuestros resultados indican que existen genes que interactúan con *atlastina*, destacándose particularmente uno de ellos, en que la proteína codificada por este participa de la vía de señalización de BMP, que juega un rol fundamental en el correcto desarrollo de la unión neuromuscular. Esto es el inicio de una potencial investigación enfocada en encontrar más interactores de *atlastina* y los mecanismos moleculares que subyacen a estos descubrimientos.

## Summary

### **“Identification of Atlastin-interacting genes in a *Drosophila* model of Hereditary spastic paraplegias”**

The hereditary spastic paraplegias (HSPs) corresponds to a variety of genetic disorders, characterized by spasticity of the lower limbs and a marked muscle weakness due to degeneration of the longest axons in humans. The best known genes of the HSP (*atlastin*, *spastin*, *VCP*) are involved in intracellular trafficking, localization and formation of membranous organelles. The *atlastin* (*atl*) gene encodes a GTPase that mediates homotypic fusion of endoplasmic reticulum (ER) membranes. There have not been described effective therapeutic targets for the treatment of HSPs associated to *atl* mutations, because the inhibition of any associated proteins results in defects in morphogenesis ER. In *Drosophila melanogaster* there are genes coding for modulators of expression and activity of *atlastin*. As this gene is conserved in both humans as in *Drosophila*, this biological model is used to identify genes that modulate its activity. In this thesis we will screen genes of chromosome 2 (about 40% of the *Drosophila* genome) that acts as dominant modifiers of the phenotype associated with decreased expression of *atl* in motor neurons. Our results indicate that there are genes that interact with *atlastin*, particularly highlighting one of them, in which the protein encoded by this participates of the BMP signaling pathway, which plays a fundamental role in the proper development of the neuromuscular junction. This is the beginning of a potential research focused on finding more interactors of *atlastin* and the molecular mechanisms underlying these findings.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Las Paraplejias Espásticas Hereditarias**

Las Paraplejias Espásticas Hereditarias (PEHs) son un grupo clínica y genéticamente heterogéneo de condiciones que se caracterizan por la espasticidad y debilidad de los miembros inferiores (Salinas et al., 2008). Este padecimiento es progresivo, neurodegenerativo, que afecta selectivamente los terminales de los axones más largos del sistema nervioso central, en donde los axones de las neuronas motoras corticales causan un desorden con movimientos espásticos (Beetz et al. 2013).

Los síntomas iniciales son trastornos motores y rigidez en las extremidades inferiores en la mayoría de los casos. Estos síntomas suelen progresar seriamente a marcados movimientos espásticos que requieren el uso de un bastón, andador o silla de ruedas para moverse (Denora et al. 2013). La clasificación clínica distingue entre PEH de forma “pura” y de forma “compleja”. Los pacientes con PEH pura muestran signos piramidales aislados, como el signo de Babinski (extensión dorsal del dedo gordo del pie), espasticidad y déficit motor, que pueden estar asociados con trastornos del esfínter y profunda pérdida sensitiva (Klebe et al. 2015). Las formas complejas se asocian con una plétora de signos o síntomas neurológicos, incluyendo retraso mental, neuropatía periférica, ataxia cerebelosa, epilepsia, atrofia óptica, retinitis pigmentosa, sordera y cataratas (Denora et al. 2013). Las PEHs “puras” son generalmente consideradas como el tipo más común en el norte de Europa y el norte de América (Calleja & Berciano, 1993).



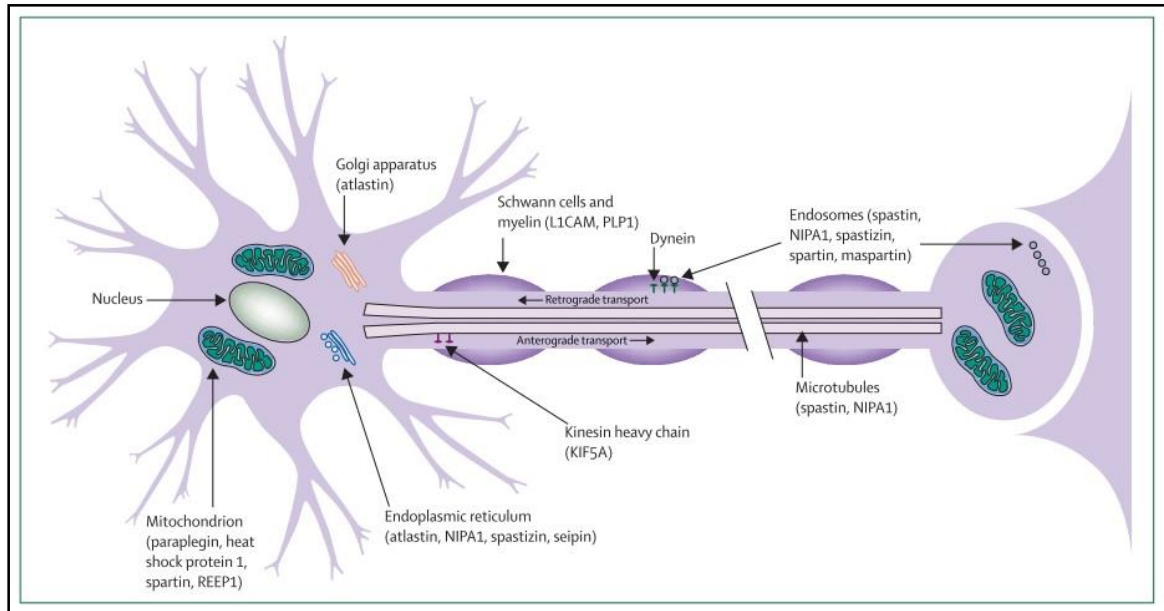
Existen pocos estudios epidemiológicos de las PEHs, pero la prevalencia estimada en poblaciones europeas es de aproximadamente 3 a 10 casos por 100.000. La edad de inicio es desde una temprana niñez hasta los 70 años de edad y las PEHs es por tanto una significativa fuente de neurodiscapacidad crónica (Salinas et al. 2008).

La heterogeneidad genética es causada por un gran número de loci/genes involucrados. Las proteínas implicadas en la aparición del síndrome son parte de una vía molecular específica o cumplen funciones similares y la misma proteína puede estar relacionada en diversas funciones (Lo Giudice et al. 2014).

Las PEHs presentan penetrancia incompleta y expresividad variable, por ejemplo, los individuos portadores pueden presentar síntomas desde la infancia y confinados a una silla de ruedas, o bien permanecen asintomáticos durante toda su vida (Du et al., 2010).

La genética de las PEHs es compleja y todos los modelos de herencia han sido descritos: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado a X recesivo y más raramente herencia mitocondrial, aunque el autosómico dominante es el que mayormente prevalece y representa cerca del 70% de los casos entre los casos de PEH puras (Salinas et al. 2008). Interesantemente, un grupo de genes asociados con las PEHs, *espastina (spas)*, *atlastina-1 (atl-1)*, y *REEP-1 (reep-1)* codifican proteínas requeridas para la morfogénesis y dinámica del RE (McDermott et al. 2003), (Blackstone et al., 2011). Mutaciones en los genes *atl* y *spas* se han estimado que causan aproximadamente un 10% y un 40% respectivamente de PEHs autosómica dominante pura (Lee et al. 2009).

La Figura 1 ilustra el lugar espacial donde se encuentran estas proteínas en una neurona.



**Figura 1.** Neurona que muestra la ubicación espacial de las proteínas involucradas en las PEHs (Salinas et al. 2008). En la figura podemos encontrar algunas de las proteínas codificadas por los genes que más mutaciones presentan en las PEHs: atlastina (aparato de Golgi, retículo endoplasmático); espastina (vesículas endosomales, microtúbulos); REEP (mitocondria).

Se sugiere que la patogénesis de las PEHs causada por mutación en estas dos proteínas proveen la primera evidencia experimental que las PEHs pueden ser causadas por anomalías en proteínas que son miembros de una misma vía bioquímica. Una comprensión más detallada de la función de esta vía no sólo dará información clave de las causas de neurodegeneración en la PEHs y quizás otras condiciones neurológicas, sino que también permitirá dilucidar mecanismos moleculares que son importantes para el mantenimiento de las neuronas con axones largos (Sanderson et al. 2006).

En relación al retículo endoplasmático (RE) se puede mencionar que la integridad del RE axonal se ha descubierto que está comprometida en desórdenes

neurodegenerativos devastadores, pero aún se desconoce si esto involucra alteraciones del proteoma axonal a través de mecanismos locales (Björk et al. 2013). Las paraplejias espásticas hereditarias (PEHs) representan quizás la asociación más directa entre patologías y el RE axonal (Blackstone et al. 2011).

### **Papel de la atlastina en las PEHs**

En los humanos, el gen de *atlastin-1* (también llamado SPG3A, por *Spastic Paraplegia Gene 3A*) se encuentra en el cromosoma 14, región 14q22.1 y consiste en 14 exones que codifican para una proteína de 558 aminoácidos de longitud y es uno de los principales causantes de las PEHs (Zhao et al. 2001). Este gen es expresado en la mayoría de los tejidos corporales, aunque su mayor expresión es en el cerebro y en la médula espinal (Zhao et al. 2001). Con algunas raras excepciones, mutaciones en *atlastina* causan aparición temprana de PEHs. La mayoría de las mutaciones de *atlastina* publicadas consisten en mutaciones de sentido erróneo (missense) o con una sola mutación que causa el corrimiento del marco de lectura (frameshift) (Trotta et al., 2004).

La proteína atlastina es una GTPasa, similar a los miembros de grandes GTPasas de la familia dinamina (Zhao et al. 2001). Posee dos dominios transmembrana con topología de membrana resultando en que los dominios N- y C-terminal se encuentren expuestos en el citoplasma (Zhu et al. 2003). El sitio donde se ubica la actividad GTPasa es el sitio catalítico. La proteína puede oligomerizar para formar homotetrámeros (Zhu et al. 2003). Atlastina se localiza prominentemente en el

aparato de Golgi y en el RE, y se enriquece en células piramidales corticales cerebrales, una subpoblación celular que presenta una axonopatía en pacientes con PEH (Sanderson et al. 2006, Zhu et al. 2003). La formación de la red del RE requiere fusión homotípica de membranas, la cual necesita GTPasas de clase atlastina (Wu et al., 2014). El rol funcional preciso de atlastina en el Golgi o en otros organelos membranosos se desconoce (Sanderson et al. 2006).

Análisis *in vitro* e *in vivo* proveen fuerte evidencia que atlastina es una GTPasa vital requerida para la fusión homotípica de las membranas del RE. Como atlastina reside en el RE, presenta una localización consistente con el rol en mediar la interacción homotípica entre las membranas del RE. En respuesta a la pérdida de atlastina, la red del RE se fragmenta pero no se observa una discapacidad en el transporte, apoyando una función de mantenimiento de la integridad del RE más que en el tráfico secretor (Orso et al. 2009). Un tráfico de membrana reducido en *Drosophila* da como resultado defectos en el crecimiento celular (S. Lee et al., 2007), indicando que una discapacidad menor en el transporte secundario a una desorganización del RE, puede explicar el pequeño tamaño de las células mutantes con atlastina y en los individuos (Orso et al. 2009).

### ***Drosophila melanogaster* en el estudio de *atl* en las PEHs**

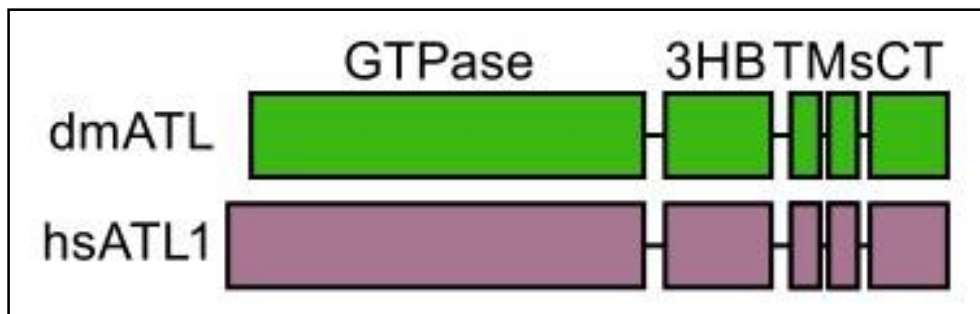
Este organismo artrópodo pertenece a la familia *Drosophilidae*. Son insectos dípteros que se encuentran en todo el planeta. El linaje artrópodo se separó del linaje vertebrado hace más de 600 millones de años atrás (Adoutte et al. 2000), sugiriendo

que *Drosophila* podría ser completamente diferente de los seres humanos. Sin embargo, análisis genéticos, moleculares y de comportamiento realizados desde hace más de un siglo sugieren lo contrario, y por eso *Drosophila* ha sido usada como organismo modelo pionero para estudios biológicos eucariontes multi-celulares (Sturtevant & Lewis 2001).

*Drosophila melanogaster* es un valioso organismo modelo para estudiar el envejecimiento y los procesos patológicos degenerativos en el sistema nervioso. Las ventajas de la mosca como sistema experimental incluyen su fácil manipulación genética, ciclo vital corto y la posibilidad de observar y analizar cuantitativamente comportamientos complejos. La expresión de genes vinculados a enfermedades en poblaciones neuronales específicas del cerebro de *Drosophila*, se puede utilizar para modelar enfermedades neurodegenerativas humanas como el Parkinson, Alzheimer y las PEHs entre otras (Hirth 2010).

En *Drosophila*, el gen *atl* se encuentra en el cromosoma 3. La pérdida de *atl* causa fragmentación del RE mientras que su sobreexpresión causa hiperfusión de los túbulos del RE (Orso et al. 2009). El gen *atl* es altamente expresado en el sistema nervioso central de la larva y en las paredes musculares del cuerpo, pero no está enriquecida en las sinapsis aunque si está presente (O'Sullivan et al., 2013).

Atlastina en *Drosophila* y humana tienen un alto % de similitud (Bian et al. 2011). Ambas contienen un dominio GTPasa N-terminal y un paquete de tres-hélices (3HB, three-helix bundle), seguido por dos segmentos transmembrana cercanos (TM, transmembrane) y una cola C-terminal (CT) (Figura 2) (Wu et al. 2014).



**Figura 2.** Comparación del gen *atlastina* en *Drosophila melanogaster* (*dm*) y *Homo sapiens* (*hs*) (Wu et al. 2014). En la figura se indica en la región N- terminal el dominio funcional GTPasa que se encarga de hidrolizar GTP para realizar la fusión de membranas en el RE; el dominio 3HB que permite un mejor plegamiento de la proteína; el dominio TM que permite que se ancle la proteína en la membrana y el dominio CT, ubicado en el extremo C-terminal que va hacia el citosol de la célula.

Casi todos los residuos clave identificados hasta la fecha en la familia *atl* pueden ser encontrados en la *atl* tanto de *Drosophila* como humana. Así, podría esperarse que la atlastina-1 humana muestre actividad de fusión de membranas *in vitro*, justo como lo hace la *atl* de *Drosophila*. Sin embargo, atlastina-1 *in vitro* es inactiva, incluso bajo las mismas condiciones que la *atl* de *Drosophila*. Análisis estructurales y bioquímicos revelaron que la actividad GTPasa es crítica para la reacción de fusión. Además, los dominios TM y CT de la molécula juegan roles importantes: el dominio TM en el plegamiento de la proteína y el CT en la unión de esta a la siguiente membrana del RE para permitir la fusión (Wu et al. 2014).

Considerando que existe una relación estructural y funcional del gen *atlastina* entre estas dos especies, es probable encontrar genes que modulen la función de este gen. Por ejemplo, VCP es una ATPasa que participa en la fusión de membranas del RE, al igual que lo hace atlastina y además forma un complejo con otra proteína para fusionar las membranas del complejo de Golgi (O'Sullivan et al. 2013). Se ha demostrado que la proteína del gen *vcp* interactúa con atlastina mediante análisis de inmunoprecipitación donde VCP co-inmunoprecipita con atlastina, sugiriendo que

estas proteínas interactúan directamente o son parte de un mismo complejo proteico (O'Sullivan et al. 2013). Además de esto, se ha comprobado que atlastina y VCP co-localizan en el RE neuronal, especialmente en las regiones perinucleares de los músculos, donde el RE tiende a ser abundante, sugiriendo una superposición sustancial de atlastina y la localización de VCP en el RE (O'Sullivan et al. 2013). La interacción física entre estas dos proteínas nos pregunta cómo esta interacción se encuentra mediada. Se piensa que VCP puede actuar modulando la expansión de las membranas del RE y también participando de la fusión de estas en el RE (Zeng et al. 2014).

Otro interactivo conocido de atlastina es espastina. Se ha comprobado que ambos co-localizan en el RE y en menor medida en el Aparato de Golgi (Sanderson et al. 2006). Al examinar los dominios de unión que median la interacción de espastina y atlastina, se observa que una isoforma de espastina contiene una región responsable de unirse con atlastina, sugiriendo que es la función de esta isoforma la que posee directa importancia en la patogénesis de las PEHs. Interesantemente, esta isoforma se encuentra enriquecida en el cerebro y la médula espinal, los sitios anatómicos de las PEHs (Sanderson et al. 2006). Estas dos proteínas interactúan físicamente remodelando proteínas de membrana y del citoplasma (Goyal & Blackstone, 2014).

*AtI* interacciona también con el gen *reep 5-6*. Numerosos estudios han sugerido que REEP 5-6 se localiza en el RE tubular, en el cual interactúa con *atl* y *spas* a través de un dominio hidrofóbico intramembrana (Park, 2010). Las proteínas codificadas por estos genes interactúan físicamente mediando la conformación del RE y las

interacciones de la red tubular del RE con los microtúbulos del citoesqueleto (Park, 2010).

Otro gen interactivo con *atl* es *thickveins (tkv)*. La proteína tkv es un receptor de tipo I de la vía de señalización de BMP (Bone Morphogenetic Protein), en donde se ha demostrado, mediante experimentos con el pez cebra que interactúa con *atl* (Fassier et al. 2010). Las proteínas *Atl* y *Tkv* co-localizan en estructuras endosomales a lo largo de las neuritas. Junto con esto *Atl* inhibe la localización de *Tkv* en la membrana plasmática. Estos datos en conjunto sugieren que *atl* podría inhibir la señalización de BMP regulando el tráfico de este receptor a la membrana (Fassier et al. 2010).

De esta manera, estudiando el comportamiento y las relaciones que se establezcan entre la *atl* de *Drosophila* con otros genes, se podrían encontrar potenciales blancos farmacológicos que puedan, potencialmente servir para atenuar los efectos de las PEHs en humanos. Con el objetivo importante de rastrear modificadores genéticos del fenotipo de escalada asociado a la disminución de la expresión de *atl* específicamente en motoneuronas. Junto con esto se muestra el análisis de *tkv*, uno de los genes candidatos en una de las regiones genómicas modificadoras de *atl*.

El proyecto en que está inmerso este trabajo contempla el rastreo de todos los cromosomas de la mosca. Este trabajo de tesis abarca el cromosoma 2, ya que este incluye aproximadamente un 40% del genoma total de la mosca. Cada deficiencia abarca regiones diversas del cromosoma 2 y cada una de ellas involucra varios genes.



## **HIPÓTESIS**

En *Drosophila* existen genes que modifican el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar genes que modifiquen el fenotipo motor asociado a la disminución de *atl* utilizando a *Drosophila* como modelo biológico para encontrar potenciales blancos en humanos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Estandarizar el rastreo genético de modificadores del fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atl* en neuronas motoras.**

Se verificó si el fenotipo de disminución de función de *atl* es modificado por la reducción de una copia de *atl* y por la reducción de una copia de otros genes involucrados en la morfogénesis del RE.

- 2) Rastrear el cromosoma 2 en busca de regiones cromosómicas que contengan posibles genes modificadores del fenotipo motor asociado a la disminución de *atl*.**

Se verificó si el fenotipo de disminución de función de *atl* es modificado por las deficiencias cromosómicas en heterocigosis y se analizará la actividad locomotora en el tiempo tal como se indica en la metodología.

**3) Seleccionar genes candidatos y comprobar su interacción con *atl*.**

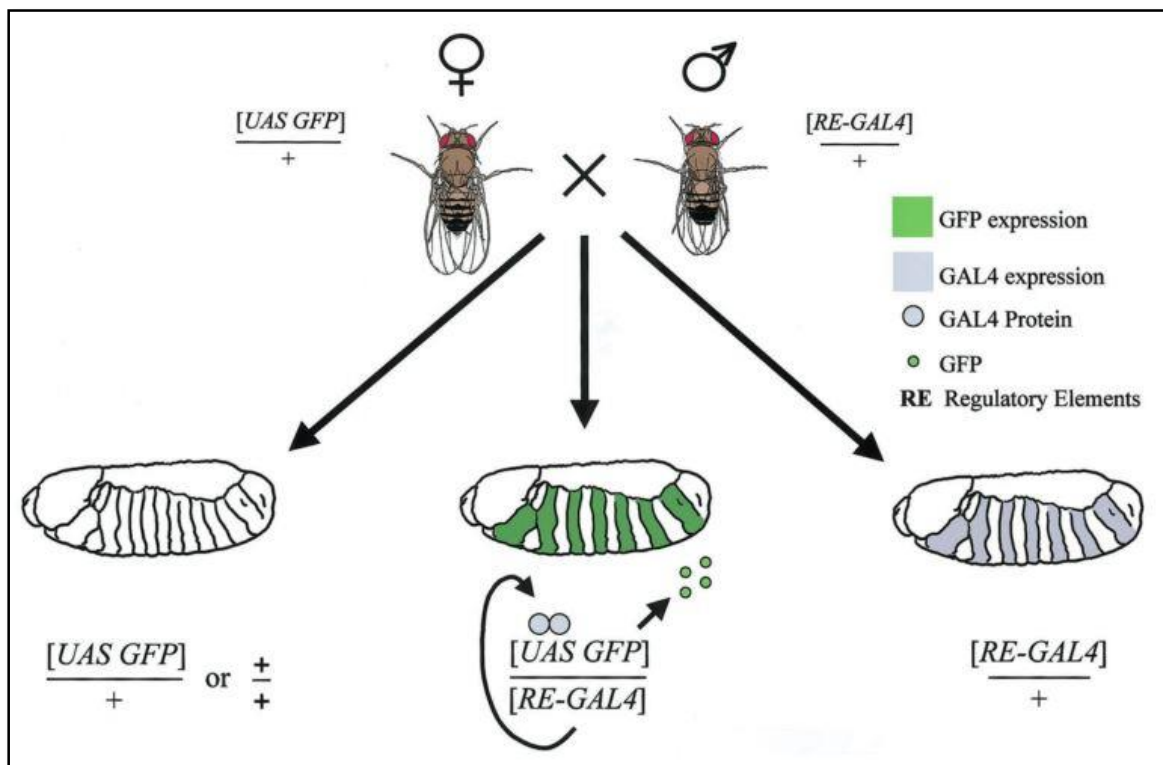
Se analizaron las deficiencias que hayan demostrado tener diferencias significativas con su control en el ensayo de escalada y se seleccionaron genes candidatos para analizar su función y demostrar su posible interacción con *atl*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sistema *UAS-GAL4*

*GAL4* corresponde a un factor de transcripción de la levadura, el cual se une a regiones específicas del DNA denominadas *UAS* (upstream activating sequence) y activa la expresión de los genes río abajo de este segmento de manera celular-específica, dependiendo del promotor que controla la expresión de *GAL4* (Duffy 2002). La Figura 3 muestra un ejemplo de cómo funciona este sistema.

Como el elemento regulador *GAL4* dirige la expresión de los genes, es al que se le denomina como “driver de expresión”.



**Figura 3.** Funcionamiento del sistema *UAS-GAL4* en *Drosophila*. Cuando las hembras que portan un gen bajo el control de *UAS*, en este caso la proteína fluorescente verde, (*UAS-GFP*) son cruzadas con machos que portan un driver *GAL4*, la progenie que contiene ambos elementos del sistema son producidas. La presencia del *GAL4* en el patrón alternativo segmental en los embriones representados en la figura, conduce la expresión de respuesta de la secuencia *UAS* en el patrón correspondiente (Duffy 2002).

## **Cepas utilizadas:**

### **- Cepa de prueba**

La cepa *w, C380-G4; dsRNAiatl/Cyo* la cual expresa RNA de doble hebra que tiene como blanco a *atl (dsRNAiatl)* específicamente en motoneuronas. Esta cepa se cruzó individualmente con cepas que poseen deficiencias cromosómicas parciales, mapeadas molecularmente, las cuales cubren el cromosoma 2. Todos estos animales se mantuvieron en viales estándar a una temperatura de 25°C. Por cada ensayo se utilizaron 15 moscas del genotipo de interés obtenidas de la F1. La cepa mutante *Df 7994* posee una deficiencia a una cadherina y se utilizará como control ya que no modifica el fenotipo asociado a la disminución de la expresión de *atl* ni tiene relación molecular con *atl*.

La cepa de prueba contiene un tipo de balanceador que se denomina *Cyo* ("curly"), que contiene un marcador dominante que permite a los investigadores seguir este balanceador a través de diversas cruzas y es letal cuando se encuentra en homocigosis. La utilidad del cromosoma balanceador es que, previene la recuperación de los cruzamientos entre la secuencia cromosómica normal y ellos mismos (Hartwell et al. 2011).

### **- Cepas estandarización**

Analizamos si el fenotipo de escalada asociado a la cepa *w, C380-G4; dsRNAiatl* que expresa el *dsRNAi* de *atl* en las motoneuronas, se modifica cuando se realiza un cruzamiento entre esta con cepas de moscas que poseen deficiencias en

otros genes relacionados con la PEH con la finalidad de estandarizar el estudio de genes y confirmar que las cepas a utilizar funcionan.

En la estandarización se cuantificaron dos alturas distintas de escalada: a los dos centímetros y a los cinco centímetros, ambas durante el mismo período de tiempo: tres segundos. Se observó el comportamiento de las moscas durante dos etapas distintas siendo estas, el día 5 de vida (cuando están más jóvenes) y la otra, el día 15 (estando en una etapa avanzada de vida).

Se utilizaron cepas con deficiencias que contienen atlastina (*atl*), espastina (*spas*), reep 5-6 (*reep 5-6*) y VCP (*vcp*), las cuales potencialmente podrían potenciar el fenotipo de disminución de la expresión de *atl*. También se utilizó una cepa de moscas que servirá como control, la cepa de la deficiencia 7994, que como se dijo inicialmente, posee deficiencia a una cadherina que se ha demostrado no poseer ningún efecto sobre atlastina. Por tanto, los cruzamientos para la estandarización quedaron ordenados de la siguiente forma:

- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7994* (deficiencia cadherina)
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7948* (deficiencia que contiene a *atl*)
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 28827* (deficiencia que contiene a *spas*)
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7875* (deficiencia que contiene a *reep-5,6*)
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 9539* (deficiencia que contiene a *vcp*)

Se grabaron los ensayos de escalada correspondiente a dichos cruzamientos. Las comparaciones se hicieron de la siguiente forma:

- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7994* vs. *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7948 (atl)*
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7994* vs. *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 28827 (spas)*
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7994* vs. *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7875 (reep-5,6)*
- *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 7994* vs. *w, C380-G4; dsRNAiatl x Df 9539 (vcp)*

**- Cepas con interferente para *tkv***

Se utilizaron dos *dsRNAi* distintos para *tkv*, localizados en el cromosoma 2 y 3 de la mosca de forma separada (a modo de *knockdown* para este gen). Cada uno de estos *dsRNAi* se cruzó con la cepa de moscas del *dsRNAi* para *atl*. En paralelo, se cruzaron las dos cepas con *dsRNAi* para *tkv* con el driver de expresión *w; C380-G4* para evitar los posibles efectos que pudiera generar el interferente para *atl* en los resultados. Como cepa control para estas cruzas se utilizó la cepa de moscas *w<sup>60.000</sup>* que es un tipo de cepa silvestre que pertenece al mismo background genético que los dos *dsRNAi* para *tkv* y que fue cruzada de manera individual con las cepas *w, C380-G4* y *w, C380-G4; dsRNAiatl* para ser utilizadas como controles. Se realizó el ensayo de escalada tanto para el día 5 como para el 15. Los genotipos de las cepas de moscas que poseen los *dsRNAi* para *tkv* que fueron utilizadas son las siguientes:

- ***dsRNAi tkv cromosoma 2: y, v; CG14026IR***
- ***dsRNAi tkv cromosoma 3: y, v; +/-; CG14026IR/TM3, Ser***

## **Evaluación de la función motora**

Se utilizaron hembras adultas obtenidas de la F1 y se realizó un ensayo de escalada a distintos intervalos de tiempo luego de haber eclosionado. Los ensayos se hicieron con moscas de dos edades distintas desde que salen de la pupa: día 5 y día 15. Al día 5 las moscas son jóvenes y están menos afectadas por las mutaciones que poseen en los genes. Al día 15 se espera que las moscas estén más afectadas ya que presentan una edad avanzada.

Se midió el tiempo que demoran las moscas en escalar un vial colocado en forma vertical de 15 cm de longitud. Una marca a los 2 y 5 cm desde la base del vial sirvió para realizar la cuantificación de las moscas capaces de sobrepasar dicha marca a distintos tiempos: 3 segundos para los 2 cm y 5 segundos para los 5 cm. El ensayo de escalada debe ser un ensayo grupal y no individual, ya que si bien, puede haber ciertas conductas de imitación o seguimiento por parte de algunas moscas, al subir cada una de ellas se puede comprobar cómo suben y de esa manera cuantificar lo observado.

Se dispuso de un kit de deficiencias que se encargó a un centro de investigación a cargo de una universidad estadounidense (Universidad de Indiana) con sede en el estado de Indiana, ciudad de Bloomington, llamado "Bloomington Drosophila Stock Center" (BDSC), que trabajan haciendo y manteniendo stocks de distintas cepas genéticas de *Drosophila* para su uso en investigación, abasteciendo en gran medida a investigadores y científicos de todo el mundo.

## **Cruzamientos**

- 1) Se pusieron 15 hembras con el genotipo del driver de expresión y 5 machos con el genotipo perteneciente a cada deficiencia en cada vial y se almacenaron a 25°C. Las moscas fueron transferidas cada tres días a un vial con comida fresca para asegurar que la progenie no tenga más de tres días de diferencia de edad. Los viales con las moscas transferidas se almacenaron en el incubador a 25°C, mientras que los viales con la progenie en desarrollo se almacenaron a 29°C. Este cambio en la temperatura es necesario ya que el sistema *UAS-GAL4* funciona mejor a esta temperatura.
- 2) Se utilizó una carta Gantt para realizar los cruces y transferencias de una manera más ordenada.

## **Recolección de moscas**

Después de diez días se recolectaron las hembras resultantes de la F1 de dichas cruces para realizar el ensayo de escalada. Con el objeto de eliminar efectos asociados a dimorfismo sexual se realizó el análisis sólo de hembras ya que estas, a diferencia de los machos, son más grandes y no tienen tendencia a pelear ni a desgarrarse cuando luchan por el territorio o por el interés del sexo opuesto.



## Ensayo de escalada

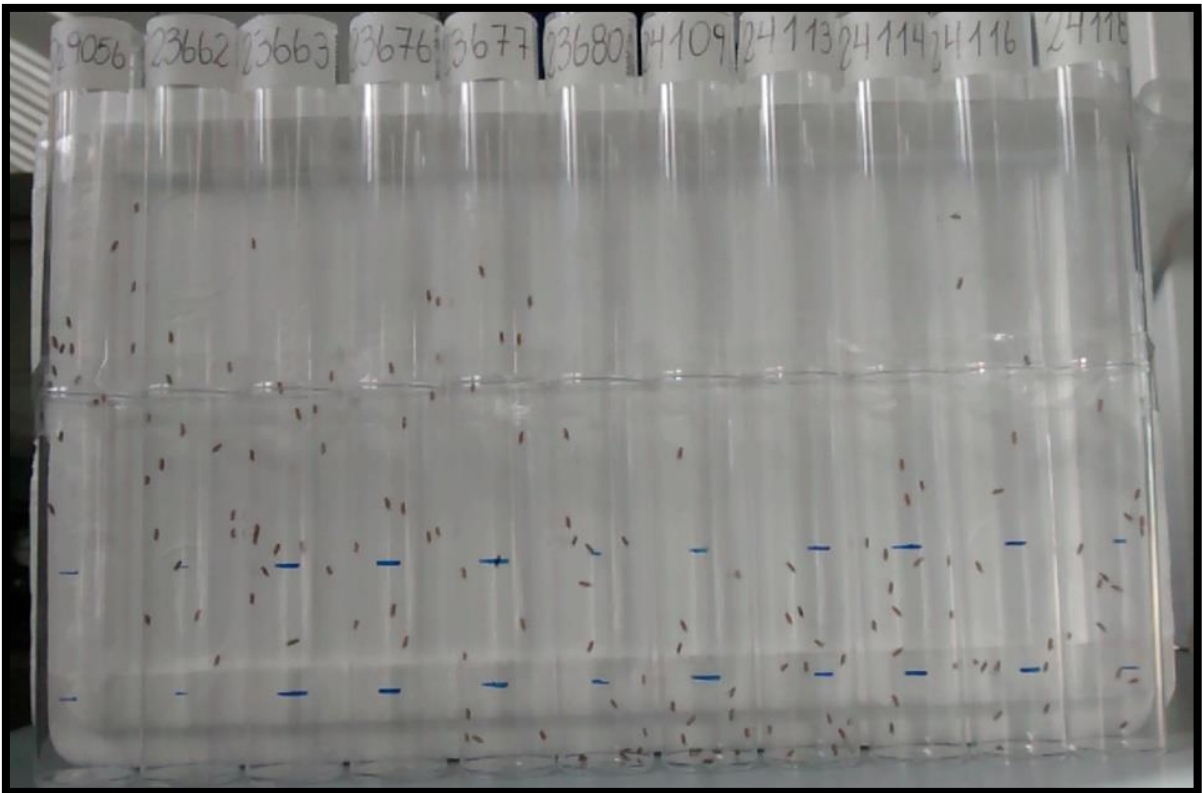
El tipo de ensayo que se utilizó para realizar la posterior cuantificación, el ensayo de escalada, es un procedimiento estándar que se utiliza comúnmente para observar el comportamiento de moscas que presentan algún fenotipo motor asociado a la disminución de un gen en particular en las motoneuronas.

El protocolo para el ensayo es el siguiente [adaptado de (Barone & Bohmann 2013)]:

- 1) Se seleccionaron las moscas del genotipo deseado, se separaron por género, se agruparon azarosamente en grupos en cohortes de 20 a 30 animales y fueron transferidas a viales con comida fresca cada 2 a 3 días.
- 2) Treinta minutos antes del ensayo, se anestesiaron las moscas con CO<sub>2</sub> y fueron ubicadas en tubos plásticos (previamente rotulados con el genotipo de la mosca) hechos con dos viales vacíos unidos por su apertura con cinta adhesiva. Se utilizaron aproximadamente 20 moscas por tubo.
- 3) Se marcó con lápiz permanente la altura para realizar el ensayo desde la base del tubo que se puso de forma vertical.
- 4) Los tubos se colocaron lo más cercano posible y se pegaron a una base de plumavit que sirvió de contraste para observar cómo las moscas suben.
- 5) Se colocó una cámara digital al frente de los tubos a una distancia de 20 a 30 cm de la base de plumavit. La cámara se puso sobre una plataforma sólida y plana. Se seleccionó la opción "película" para grabar. Al hacerlo, se procuró iniciar un cronómetro para realizar un seguimiento del tiempo que transcurre entre los ensayos.

- 6) Se acumularon las moscas al fondo de cada tubo golpeándolos suavemente (ya estando pegados a la base de plumavit) por unos cinco segundos. Este paso debe ser realizado de manera consistente (por la misma duración, la misma fuerza, la misma persona) a través de todo el experimento.
- 7) Se grabó el movimiento de las moscas con la cámara digital por 10 segundos.
- 8) Se repitieron los pasos 5) y 7) diez veces con un intervalo de un minuto.

La Figura 4 ilustra el proceso descrito anteriormente:



**Figura 4.** Representación del ensayo de escalada. A 2 cm sobre la base se encuentra la primera marca y a los 5 cm la segunda. Sobre estas se realizó el conteo de moscas a los 3 y 5 segundos, respectivamente.

Para lograr una maximización del tiempo y abarcar todas las deficiencias que hay para el cromosoma 2, primero se realizaron las cruces de la cepa con el *dsRNAi* de *atl* con las cepas de las deficiencias en el brazo 2L del cromosoma 2 y después de

hechas estas, se hicieron las del brazo 2R. Hay casi 200 deficiencias en cada brazo y, por tanto, se agruparon las deficiencias en set de diez cruzas por grupo más su control, teniendo entonces un total de once tubos con 15 moscas cada uno. Lo que se busca finalmente es comparar estadísticamente lo observado en base a los fenotipos obtenidos.

Todas las deficiencias cruzadas con la cepa *w*, *C380-G4; dsRNAiatl* y que mostraron diferencias significativas con el control, fueron cruzadas con la cepa de moscas que presentan solamente el driver de expresión para motoneurona, *w; C380-G4*. Se hace esto para descartar que la interacción entre la deficiencia y el driver es la que provoca que existan dichas significancias en los resultados.

### **Análisis de videos**

Para el análisis de los videos grabados se realizó lo siguiente:

- 1) Se contó el número de moscas que están sobre la marca realizada a los 2 cm después de 3 segundos.
- 2) Se tomó un promedio de los resultados de los diez ensayos hechos.
- 3) Se expresó el promedio como un porcentaje del número total de moscas en el tubo que fueron capaces de estar sobre la marca (= % actividad de escalada).

Se testearon 5 cohortes independientes para cada genotipo.

## **Análisis estadístico**

Para evaluar la significancia estadística entre los diferentes genotipos resultantes en el tiempo ya estandarizado, se cuantificaron las moscas que escalan sobre los 2 cm en 3 segundos para cada grupo con diez deficiencias que fueron cruzadas con el *dsRNAiat1* y que crecieron hasta la adultez. Se comparó a continuación cada uno de estos grupos con su respectivo control que creció bajo las mismas condiciones (cada set posee su propio control). Para realizar dicha comparación, se usó el programa estadístico GraphPad Prism 6 que permite, mediante un análisis ANOVA la comparación del control con cada uno de los genotipos resultantes en cada set. El *valor de p* que se consideró significativo es de 0.05 (95% de confianza).

Se aplicó el test de Dunnett (test de comparación múltiple) que permite comparar medias, escogiendo un control con las variantes que uno escoja y compararlo, de manera independiente, con cada dato agregado. Este test también se utilizó para analizar los datos cuantificados del número de botones sinápticos y botones satélites.

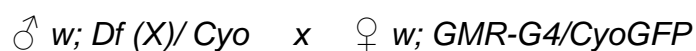
## **Obtención de sinapsis de larvas**

Para profundizar en el fenotipo celular que subyace a los defectos en la escalada, se compararon las sinapsis de las neuronas de la unión neuromuscular de larvas que posean en su genotipo las deficiencias de interés. Se utilizaron para tales efectos larvas y no moscas adultas ya que la sinapsis neuromuscular de la larva ha sido ampliamente caracterizada y porque algunas deficiencias son haploinsuficientes

y letales durante la etapa de pupa, o bien resultan en letalidad cuando se combinan con el *dsRNAi* de atlastina.

Para generar larvas que posean el genotipo deseado, se utilizó el siguiente procedimiento:

a) Para identificar el genotipo de las larvas se realizaron cruza con moscas que posean en su genotipo un balanceador de fácil identificación que segregue con un gen de expresión constitutiva que exprese una proteína fluorescente verde (GFP). De esta forma se pudo discriminar si una larva posee o no las deficiencias con los genes ya mencionados. Por tanto, la primera crusa consistió en obtener hembras vírgenes de moscas que presentaron en uno de los alelos del cromosoma 2 un gen que no interactuó con nada de lo que necesitamos observar y que esté por tanto en heterocigosis. En el otro alelo del cromosoma 2 se encontró el balanceador con el gen que codificará para GFP. Estas hembras se cruzaron con machos que presentaron las deficiencias de interés (*Df (X)*). La crusa se representa de la siguiente manera:



Las larvas de tercer estadio, previo a la etapa de pupa, son las que nos sirvieron ya que son larvas grandes, de fácil manipulación y disección. Por lo tanto, las larvas descendientes de esta crusa fueron seleccionadas, con ayuda de un microscopio de fluorescencia para ver la expresión de la proteína fluorescente verde, y así descartar las larvas que no nos eran útiles. Los descendientes, teóricamente, pueden poseer uno de estos genotipos:

***w; Df (X)/CyoGFP***      ***w; Df (X)/GMR-G4***      ***w; GMR-G4/Cyo***      ***w; Cyo/CyoGFP***  
**Se escoge**                      **Se descarta**                      **Es letal**

De estos posibles genotipos, el único útil en nuestro trabajo es el primero ( $w; Df(X)/CyoGFP$ ), ya posee lo que necesitamos, la deficiencia. El segundo,  $w; Df(X)/GMR-G4$ , que también presenta la deficiencia, no nos sirvió ya que no podemos identificarla en las larvas, por lo que se descartaron. Algo similar ocurre con las larvas con el tercer genotipo ( $w; GMR-G4/Cyo$ ), que no presentaban la deficiencia, por lo que también se descartaron. El cuarto genotipo ( $w; Cyo/CyoGFP$ ) no llegó a desarrollarse ya que presentaba el balanceador en homocigosis, siendo letal. Habiendo ya seleccionado las larvas, se colocaron en un vial con comida fresca y se les dejó ahí para que se desarrollaran con normalidad. Pasados unos días, las moscas con ese genotipo comenzaron a nacer y a cruzarse entre sí, generando un stock de moscas que pueden mantenerse a lo largo del tiempo.

b) Lo siguiente es obtener por separado moscas vírgenes del stock de moscas que presenten en su genotipo el driver de expresión para motoneuronas solamente ( $w; C380-G4$ ) y también de las que poseen el driver de expresión más el *dsRNAi* para atlastina ( $w, C380-G4; dsRNAiatl$ ). Como el driver de expresión está presente en homocigosis en las moscas que presentan el driver solamente, todas las vírgenes que se obtuvieron fueron útiles para cruzarlas con machos del stock de moscas que obtuvimos anteriormente y que presentaron deficiencias. Por tanto, esta cruce fue de la siguiente forma:

♂  $w; Df(X)/CyoGFP$  x ♀  $w; C380-G4$

Los descendientes de esta cruce fueron:

$w; Df(X)/C380-G4$        $w; C380-G4/CyoGFP$   
Se escoge                      Se descarta

Las larvas de esta cruce se analizaron en el microscopio con fluorescencia para descartar las que no nos son útiles. En este caso, las larvas que sean fluorescentes no sirven ya que solamente presentan el driver de expresión sin la deficiencia, por lo que se descartaron. Las otras, que no fluorescen, fueron seleccionadas para el tratamiento posterior.

A continuación, se sacaron hembras vírgenes del stock que presentan el driver más el *dsRNAi* para atlastina. Aquí encontramos moscas que en su genotipo presentan el *dsRNAi* de manera heterocigota y también el balanceador “curly” (*Cyo*) o, podemos encontrar moscas que sean homocigotas para el *dsRNAi* sin el balanceador. Como la idea de usar estas moscas era obtener larvas descendientes que tengan el *dsRNAiatl* en un alelo y la deficiencia en otro, sólo nos van a servir las moscas vírgenes que sean homocigotas, sin el balanceador. Teniendo ya estas moscas, se cruzaron con machos del stock originado anteriormente, que presenten la deficiencia y el balanceador con GFP. La cruce quedó de la siguiente forma:

♂ *w; Df(X)/CyoGFP* x ♀ *w, C380-G4; dsRNAiatl/C380-G4; dsRNAiatl*

Los descendientes de esta cruce fueron:

*w, C380-G4; dsRNAiatl/Df(X)*      *w, C380-G4; dsRNAiatl/CyoGFP*  
Se escoge                                      Se descarta

Estas larvas se seleccionaron en un microscopio de fluorescencia ya que solamente nos sirven las larvas que posean la deficiencia y el *w, C380-G4; dsRNAiatl* (*w, C380-G4; dsRNAiatl/Df(X)*), por lo que descartamos todas las larvas que expresen GFP ya que no poseen en su genotipo la deficiencia. De esta manera, obtuvimos las

larvas sabiendo con certeza el genotipo que presentan y listas para diseccionarlas para observar la sinapsis de la UNM.

### **Observación de la sinapsis de la UNM**

Para obtener imágenes de las sinapsis y que estas puedan ser comparables unas con otras en los diferentes preparados con tejido larval, se sacaron fotos solamente de las UNM de los segmentos del par 2 y 3 que, como se mencionó, pueden ser comparadas (Figura E, Anexo V). El par 1 como está cerca del cerebro, no es posible sacar buenas imágenes en esa zona por la gran cantidad de axones existentes y que pueden “contaminar” una buena imagen.

### **Disección de larvas**

Se utilizaron larvas con ocho genotipos distintos para realizar las disecciones y posterior inmunohistoquímica. Estos ocho genotipos son los siguientes:

1. *w, C380-G4/+*
2. *w, C380-G4/Df 7994*
3. *w, C380-G4/Df 7497* (que contiene a *tkv*)
4. *w, C380-G4/Df 7783* (que contiene a *dpp*)
5. *w, C380-G4; dsRNAiatl/+*
6. *w, C380-G4; dsRNAiatl/Df 7994*
7. *w, C380-G4; dsRNAiatl/Df 7497*
8. *w, C380-G4; dsRNAiatl/Df 7783*



Al tener ya las larvas necesarias, se procedió con la disección de estas para exponer las uniones neuromusculares. Las larvas de tercer estadio son larvas fácilmente identificables ya que son las que comienzan a escalar por las paredes de los viales, en busca de un lugar idóneo para pupar.

Aproximadamente diez larvas de cada genotipo se colocaron en una placa sobre hielo por diez minutos. Para evitar que las larvas se muevan demasiado al momento de la disección. Luego, se pasaron a otra placa que contiene un material semejante a la silicona, llamado "sillicard" que permitió realizar la disección de una manera más fácil, sin romper los tejidos necesarios para observarlos después. Una vez que se encontró la larva se agregaron 100  $\mu$ L de PBS 1x (buffer salino fosfato) para mantener los tejidos hidratados e intactos al momento de cortar. Se puso a la larva en posición dorsal, dejando dicha zona expuesta; se tomó una aguja de disección (o "pin") de metal con una pinza y cuidadosamente, mirando en la lupa se insertó una aguja en el extremo superior de la larva, donde se encuentran las mandíbulas y otra aguja, en el extremo inferior de la larva, en la zona intestinal (Figura A, Anexo I)

Una vez insertadas las agujas de disección se hizo un corte horizontal poco más arriba de donde se encuentra la zona intestinal. Se abrió la tijera, se introdujo la punta en la abertura recién hecha y se cortó con cuidado hacia arriba, donde se encuentra la zona mandibular (Figura B, Anexo II). Luego, con las pinzas se abrieron las paredes musculares y se sacaron todos los órganos internos de la larva con cuidado para no cortar o romper las uniones neuromusculares, tratando de dejar lo más limpio posible toda esa zona. Habiendo ya hecho esto, con cuidado se abrieron las paredes y se

colocaron dos agujas de disección más en cada lado para dejar absolutamente expuestas las uniones neuromusculares del interior de la larva (Figura B, Anexo II).

Una vez que se dejó a la larva en esa posición, se extrajo todo el PBS. Después, se agregó 100 µL de PAF al 4% (paraformaldehído) durante diez minutos para fijar la muestra. Pasado ese tiempo se extrajo el PAF y se hizo un lavado con PBT 1% (buffer salino fosfato más Tritón, resultando una solución tipo detergente) durante diez minutos por cuatro veces. A continuación, se guardaron las larvas ya fijadas y lavadas en una placa con Glicerol al 6% y se almacenaron a 4°C para trabajar con ellas después.

### **Inmunohistoquímica**

Se procedió a hacer una inmunohistoquímica para visualizar las sinapsis en las uniones neuromusculares.

Se utilizaron distintos anticuerpos primarios y secundarios a distintas concentraciones que marquen neuronas, axones y la sinapsis.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios en las diluciones señaladas:

1. GluRIIB (rabbit) -----> 1:400
2. NC82 (mouse) -----> 1: 200

El anticuerpo GluRIIB marca el músculo postsináptico, mientras que NC82 marca la neurona presináptica.

Una vez aplicados estos anticuerpos en las larvas, se incubó toda la noche o por 12 horas, agitando lentamente a 4°C. Pasado ya el tiempo y antes de aplicar anticuerpos secundarios, se utilizó BSA (albúmina de suero bovino) como agente bloqueador para evitar las uniones inespecíficas que puedan resultar de la aplicación del anticuerpo secundario. Se aplicó 200 µL de BSA con una micropipeta por una hora y después de pasado ese tiempo se elimina. Las muestras quedan así listas para la aplicación de los anticuerpos secundarios.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios las diluciones señaladas:

1. FITC (verde, anti-rabbit) -----> 1:200
2. TRITC (rojo, anti-mouse) -----> 1:200
3. Cy5 HRP (rojo lejano) -----> 1:200

Habiendo hecho ya la dilución se incubaron las muestras de larvas por dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo se lavaron las muestras con PBT al 1% cuatro veces por diez minutos cada una y se almacenan a 4°C en oscuridad. Las muestras quedan listas para ser montadas (HRP [horse radish peroxidase] emite fluorescencia color azul y permite amplificar señales débiles e incrementar la detección de una molécula objetivo).

El procedimiento de montaje de muestras consistió en lo siguiente:

1. Se agregó una gota pequeña de Vectashield (medio de montaje para fluorescencia) sobre el portaobjeto.

2. Sobre la gota se colocó con una pinza, una de las muestras a observar de manera que la zona ventral quede hacia arriba.
3. Se agregó aproximadamente tres o cuatro muestras sobre un portaobjeto y sobre cada una de ellas se agregó una gota de Vectashield.
4. Se taparon las muestras con un cubreobjeto de manera cuidadosa.
5. Se almacenaron las muestras en una carpeta a 4°C en oscuridad.
6. Se llevaron todas las muestras en una carpeta tapada a un microscopio confocal para observar las sinapsis de las UNM y se obtuvieron las fotos con la mayor resolución posible para su posterior análisis.

### **Cuantificación de los datos obtenidos de la sinapsis de la UNM**

Se observaron larvas de seis genotipos diferentes:

1. *w, C380-G4/Df 7994*
2. *w, C380-G4/Df 7497* (contiene a *tkv*)
3. *w, C380-G4/Df 7783* (contiene a *dpp*)
4. *w, C380-G4; dsRNAiatl/Df 7994*
5. *w, C380-G4; dsRNAiatl/Df 7497* (contiene a *tkv*)
6. *w, C380-G4; dsRNAiatl/Df 7783* (contiene a *dpp*)

Se agruparon los resultados de las cuantificaciones en dos grupos, de acuerdo a los genotipos. Un grupo lo forman los genotipos que solamente poseen el driver de expresión *C380-G4* y el otro, los que poseen el driver más el *dsRNAi*. Además, se graficaron dos condiciones cuantificadas: longitud de la neurona ( $\mu\text{m}$ )/botones

sinápticos y longitud de la neurona/botones satélites. Los gráficos que se obtuvieron a partir de la cuantificación son los siguientes:

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>
<i>C380-G4/Df 7994</i>	<i>C380-G4; dsRNAiatl/Df 7994</i>
<i>C380-G4/Df 7497</i>	<i>C380-G4; dsRNAiatl/Df 7497</i>
<i>C380-G4/Df 7783</i>	<i>C380-G4; dsRNAiatl/Df 7783</i>

## **RESULTADOS**

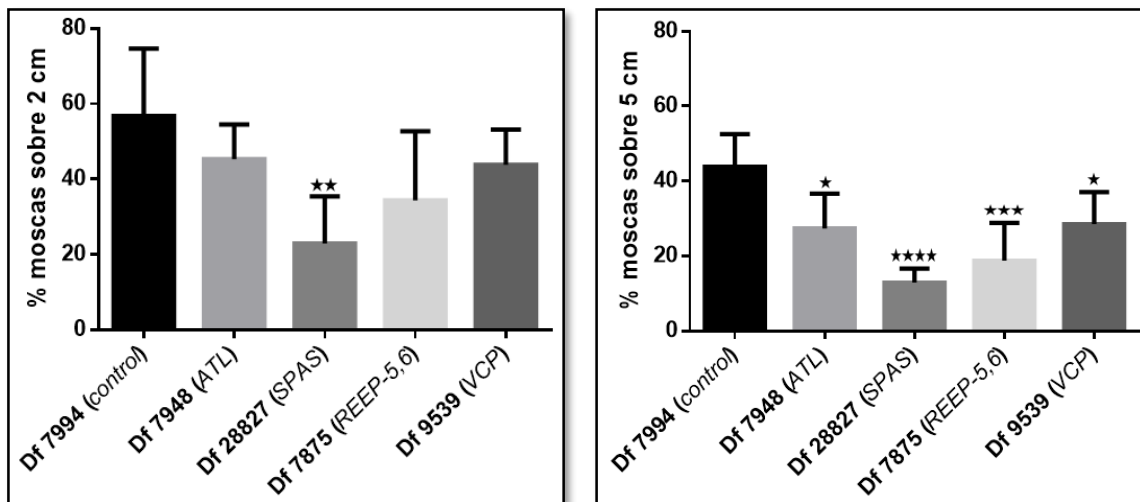
### **El fenotipo de escalada asociado a la disminución de atlastina es modificado por genes conocidos que interactúan con *atl***

Al cruzar la cepa con el interferente para *atl* con cepas que poseen deficiencias en genes las cuales han sido observada en casos de PEH, observamos que dos de ellos presentan la mayor diferencia para ambos días, siendo las deficiencias de los genes *atl* y *spas* las que mostraron mayor interacción con dicho interferente (Figura 5).

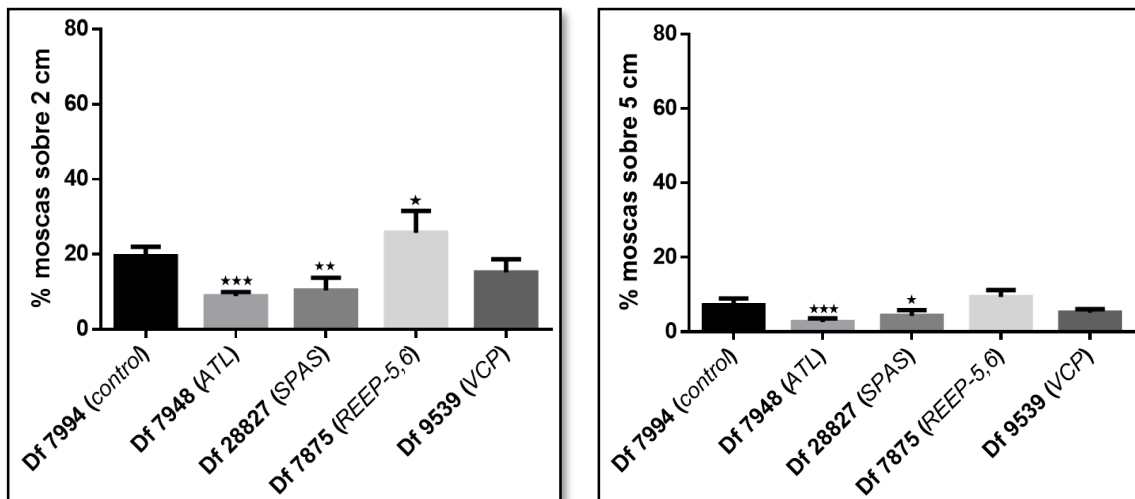
Para los 2 cm se observó que solamente hay diferencia significativa con las moscas que les falta una copia de *spas*, mientras que para las demás no hay significancia. Para los 5 cm se observa una clara disminución en la escalada en todos los genotipos. Por lo general, las moscas son menos capaces de llegar a los 5 cm en los tres segundos medidos. Además, las moscas de las cruzas con *spas* siguen mostrándose como las que poseen mayor dificultad para escalar, existiendo diferencias aún más notorias al compararlas con el control. Las moscas de los otros genotipos también presentan diferencias, pero menos acentuadas que *spas*.

Para el día 15 se observa que las significancias se dan con las moscas que presentan las deficiencias para atlastina (*atl*) y espastina (*spas*) para ambas alturas. De manera interesante, la deficiencia 7875 suprime el fenotipo motor asociado a la disminución de *atl* al medir a los 2 cm, mientras que al medir a los 5 cm 7875 y 9539 no muestran diferencias significativas con el control, sugiriendo que en estas condiciones otros mecanismos compensarían el fenómeno.

Día 5:



Día 15:



**Figura 5.** Cuantificación de moscas que escalan sobre los 2 y 5 cm (izquierda y derecha respectivamente) para los días 5 y 15. La barra sobre cada gráfico representa el error estándar (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ ).

Por lo tanto, se puede concluir que la estandarización ha funcionado de manera eficiente, mostrando claras interacciones entre las cepas de moscas que poseen el interferente para atlastina y los genes *atl* y *spas*. Además, como se observó en los ensayos de escalada realizados, al medir la cantidad de moscas a los 2 cm en 3 segundos da resultados más robustos y confiables que a los 5 cm, ya que el tiempo

que demoran las moscas en escalar no se ve afectado por el comportamiento innato de estos organismos, como, por ejemplo, detenerse en el transcurso de la escalada, parar o incluso bajar. Es por eso que más moscas alcanzan los 2 cm en el tiempo requerido. Esa será la distancia medida en los ensayos de escalada para hacer el rastreo, dejando de lado los 5 cm.



## **El rastreo del cromosoma 2 revela regiones que modifican el fenotipo de escalada asociado a la disminución de la expresión de *atl***

El cromosoma 2 y 3 son metacéntricos, grandes y se dividen en dos brazos cada uno, el brazo L y R (Figura C, Anexo III). Cada una de las deficiencias de cada brazo se cruzó con la cepa *w, C380-G4; dsRNA<sup>atl</sup>* y se realizaron los correspondientes ensayos de escalada.

Una vez realizado la fenotipificación del brazo 2L (Figura F, Anexo VI), se prosiguió con el brazo 2R (Figura G, Anexo VII). El brazo 2L consta de 102 deficiencias, mientras que el 2R abarca 92 (Figura D, Anexo IV). Para hacer del rastreo un proceso fluido y sin contratiempos, se hizo uso de un diagrama de flujo donde se muestran los principales puntos que se tomaron en cuenta al realizar este trabajo (Figura 6):

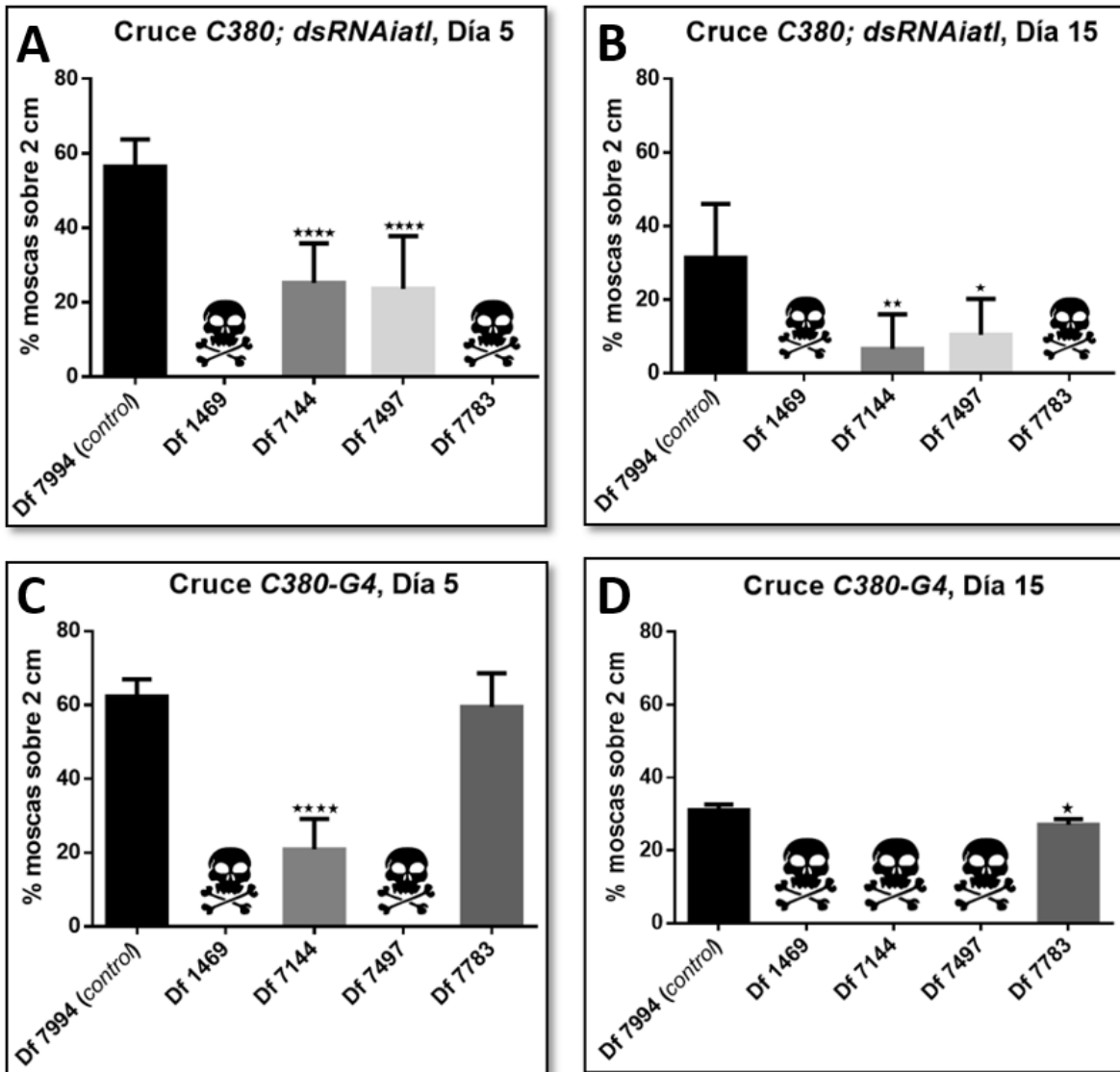


**Figura 6.** Esquema que muestra la forma en la que se seleccionaron las cepas de moscas que presentaron interacción genética con *atI* (candidatos) y también las que se descartaron después de la fenotipificación.

## **Rastreo Brazo 2L:**

Se analizaron 102 deficiencias correspondientes a aproximadamente un 19% del genoma de *Drosophila* (Figura D, Anexo IV). Sólo 4 de las 102 deficiencias analizadas nos dieron un resultado que presenta un interés para nuestro trabajo (Figura 7). Más adelante se presentan los criterios utilizados deficiencia por deficiencia.

De manera interesante, la deficiencia 7497 contiene a *tkv* (*thickveins*), un gen que ha sido mayormente estudiado por su participación en una vía de señalización que permite el correcto desarrollo de la UNM en *Drosophila*. Teniendo esto en consideración, enfocamos nuestros esfuerzos en conocer más sobre la interacción que puede tener este gen con *atf* para encontrar alguna posible relación que esté pasando entre estos dos genes. Además, como fue indicado en los antecedentes, el receptor de BMP codificado por *tkv*, permite que se inicie una cascada de reacciones intracelulares que promueven el crecimiento de la UNM.



**Figura 7.** Cuantificación de los ensayos de escalada para los días 5 y 15 (A y B respectivamente) para las condiciones con *C380-G4; dsRNAiatl* y con *C380-G4* (C y D respectivamente) en las deficiencias candidatas del brazo 2L. La barra sobre cada gráfico representa el error estándar (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ ).

**Representación de las deficiencias que nos dieron diferencias significativas en el brazo 2L**

BRAZO 2L						
	<i>C380-G4; dsRNAiatl</i>			<i>C380-G4</i>		
Deficiencia N°	Eclosión	Escalada		Eclosión	Escalada	
		5	15		5	15
<b>1469</b>	x	ND	ND	x	ND	ND
<b>7144</b>	✓	+	+	✓	+	ND
<b>7497</b>	✓	+	+	x	ND	ND
<b>7783</b>	x	ND	ND	✓	=	+

**Tabla N°1.** El símbolo "x" significa que no nacen; "✓", que nacen; "+" que en su escalda presenta diferencias con el control; "=" que su escalda no es significativamente diferente al control; "ND" es no determinada ( $p \leq 0.05$ ).

Regiones candidatas Brazo 2L:

**Deficiencia 1469:**

Esta deficiencia es haploinsuficiente para el carácter ya que no nace ni con el *w, C380-G4; dsRNAiatl* ni con el driver sólo, por lo que **se descarta**.

**Deficiencia 7144:**

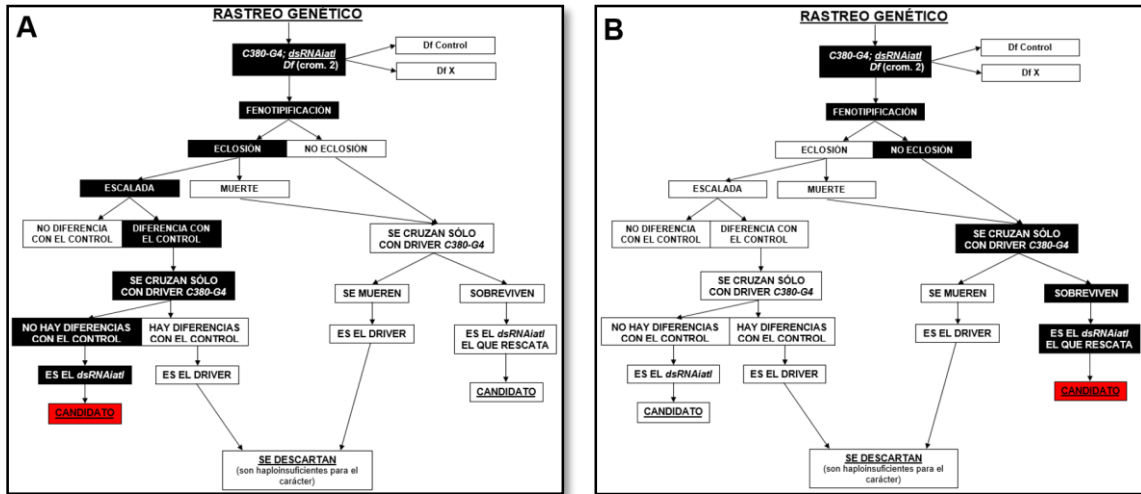
Esta deficiencia presenta diferencias significativas tanto con el *w, C380-G4; dsRNAiatl* como con el driver sólo *C380-G4*, por lo que **se descarta**.

**Deficiencia 7497:**

En esta deficiencia es el *w, C380-G4; dsRNAiatl* el que rescata el fenotipo de nacimiento, por tanto, es una **deficiencia candidata** (Figura 8).

## Deficiencia 7783:

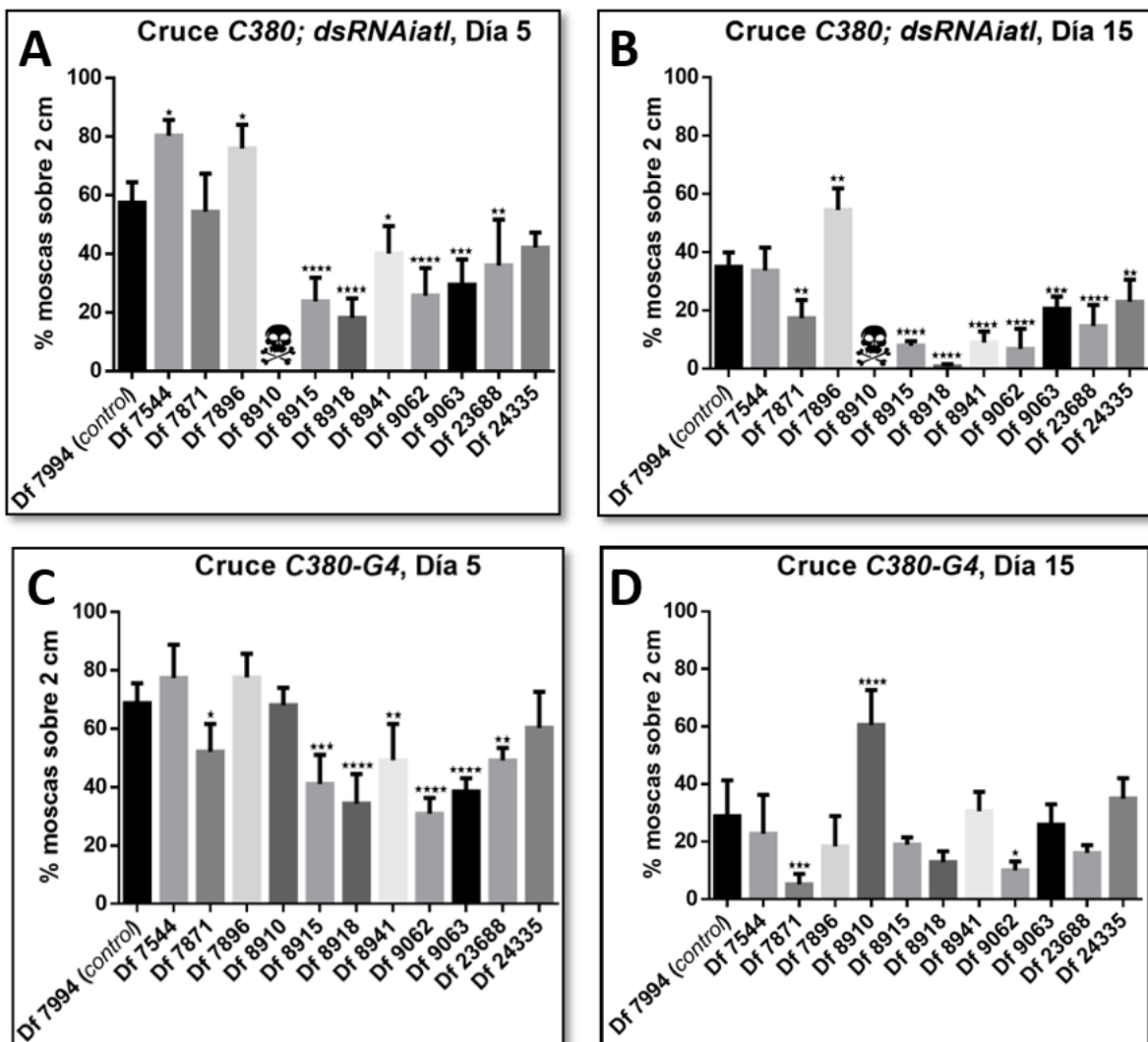
En este caso, es el *w*, *C380-G4; dsRNAiatl* el que causa que estas moscas no nazcan, por tanto, es una **deficiencia candidata** (Figura 8).



**Figura 8.** Criterios de selección de las deficiencias que son candidatas. En “A” se muestra el criterio para seleccionar como candidata a la deficiencia 7497; en “B” se muestra el criterio para seleccionar como candidata a la deficiencia 7783.

## Rastreo Brazo 2R:

Se analizaron 92 deficiencias correspondientes a aproximadamente un 21% del genoma de *Drosophila* (Figura D, Anexo IV). Dentro de todos los resultados que obtuvimos, 2 de las 92 deficiencias analizadas nos dieron un resultado que presenta un interés para nuestro trabajo.



**Figura 9.** Cuantificación de los ensayos de escalada para los días 5 y 15 (A y B respectivamente) para las condiciones con C380-G4; dsRNAiatl y con C380-G4 (C y D respectivamente) en las deficiencias candidatas del brazo 2R. La barra sobre cada gráfico representa el error estándar (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ ).

En la Tabla N°2 se muestran las deficiencias que tienen diferencias significativas cuando se cruzaron con la cepa de moscas que posee el w, C380-G4; *dsRNAiatI*.

**Representación de las deficiencias que nos dieron diferencias significativas en el brazo 2R**

BRAZO 2R						
Deficiencia N°	<i>C380-G4; dsRNAiatI</i>			<i>C380-G4</i>		
	Eclosión	Escalada		Eclosión	Escalada	
		5	15		5	15
7544	✓	+	=	✓	=	=
7871	✓	=	+	✓	+	+
7896	✓	+	+	✓	=	=
8910	x	ND	ND	✓	=	=
8915	✓	+	+	✓	+	+
8918	✓	+	+	✓	+	+
8941	✓	+	+	✓	+	+
9062	✓	+	+	✓	+	+
9063	✓	+	+	✓	+	+
23688	✓	+	+	✓	+	+
24335	✓	=	+	✓	=	+

**Tabla N°2.** El símbolo "x" significa que no nacen; "✓", que nacen; "+" que en su escalda presenta diferencias con el control; "=" que su escalda no es significativamente diferente al control; "ND" es no determinada ( $p \leq 0.05$ ).



## Regiones candidatas Brazo 2R:

### **Deficiencia 7544:**

Esta deficiencia sólo posee una disminución de las moscas que escalan al día 5 con el *dsRNAiatl*, mientras que al día 15 se comporta igual que el control. Con el driver solo no presenta diferencias, por lo que **se descarta**.

### **Deficiencia 7871:**

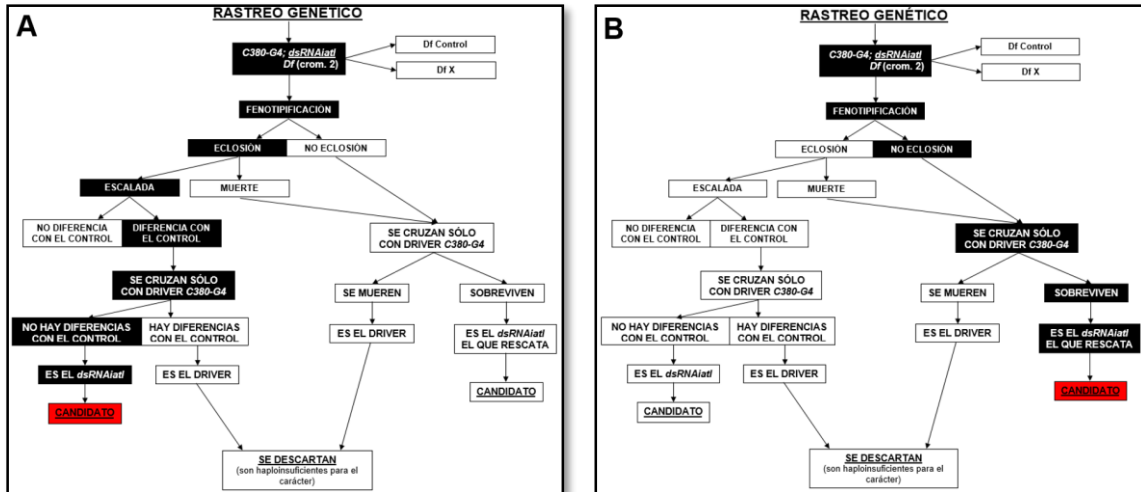
Esta deficiencia al día 5 no presenta diferencias cuando se cruza con el *dsRNAiatl*, mientras que al día 15 sí. Cuando se cruza con el *C380-G4* hay diferencias para ambos días, por lo que **se descarta**.

### **Deficiencia 7896:**

Esta deficiencia presenta diferencias significativas cuando se cruza con el *dsRNAiatl* para ambos días y cuando se cruza con el *C380-G4*, no presenta diferencias con el control, por lo que es una **deficiencia candidata** (Figura 10).

### **Deficiencia 8910:**

En este caso, es el *w, C380-G4; dsRNAiatl* en combinación con la deficiencia el que causa que estas moscas no nazcan, por tanto, es una **deficiencia candidata** (Figura 7).



**Figura 10.** Criterios de selección de las deficiencias que son candidatas. En “A” se muestra el criterio para seleccionar como candidata a la deficiencia 7897; en “B” se muestra el criterio para seleccionar como candidata a la deficiencia 8910.

### Deficiencias 8915, 8918, 8941, 9062, 9063 y 23688:

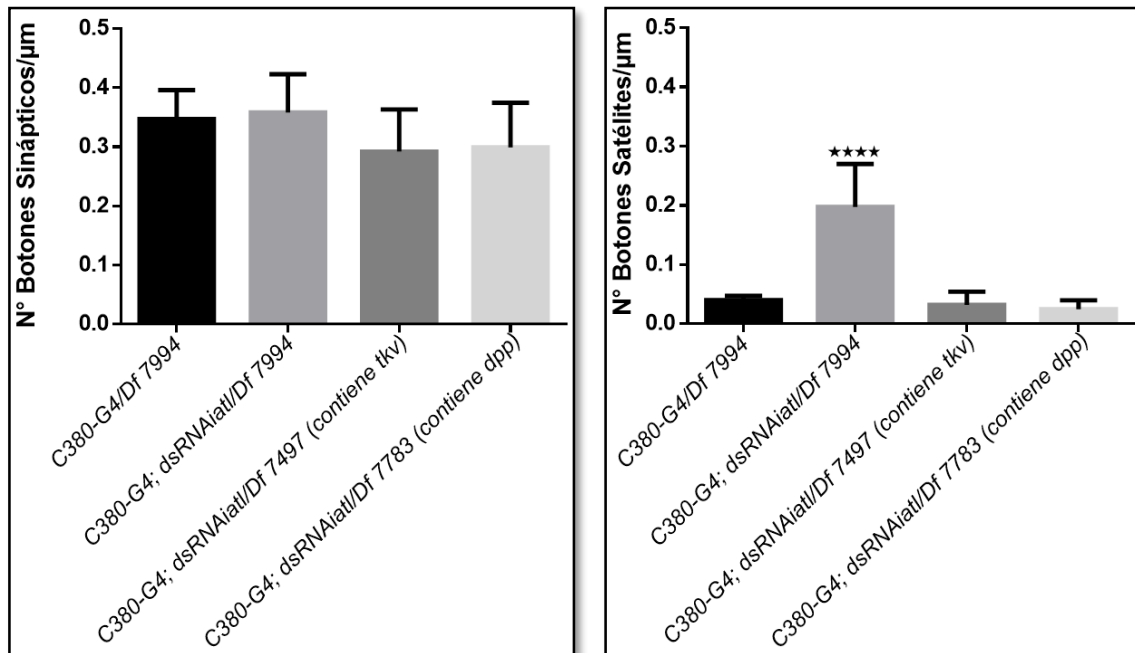
Estas deficiencias presentan diferencias cuando se cruzan con el *w*, *C380-G4*; *dsRNAiatl*, y esas mismas diferencias la presentan cuando se cruzan con el driver sólo, por lo que persiste la interacción en ausencia del *dsRNAi*. Por lo tanto, estas deficiencias **se descartan**.

### Deficiencia 24335:

Esta deficiencia sólo posee una disminución de las moscas que escalan, pero que no presenta diferencias significativas cuando se cruza con el *dsRNAiatl* en el día 5, pero sí para el día 15. Algo similar ocurre cuando se cruza con el *C380-G4*, por lo que **se descarta**.

**Las UNM de larvas con expresión disminuida de *atl* en motoneuronas presentan un aumento de botones satélites, lo cual es revertido al quitar una copia de la región correspondiente a las deficiencias 7497 y 7783**

En primer lugar analizamos la cantidad de botones sinápticos en moscas que expresan el *dsRNAi* de *atl* en combinación con la deficiencia control y con las deficiencias para *tkv* (7497) y *dpp* (7783). La tinción con HRP (ver métodos) revela que el número de botones sinápticos no se ve alterada significativamente por la presencia de ninguna deficiencia (Figura 11 izquierda y Figura 12).



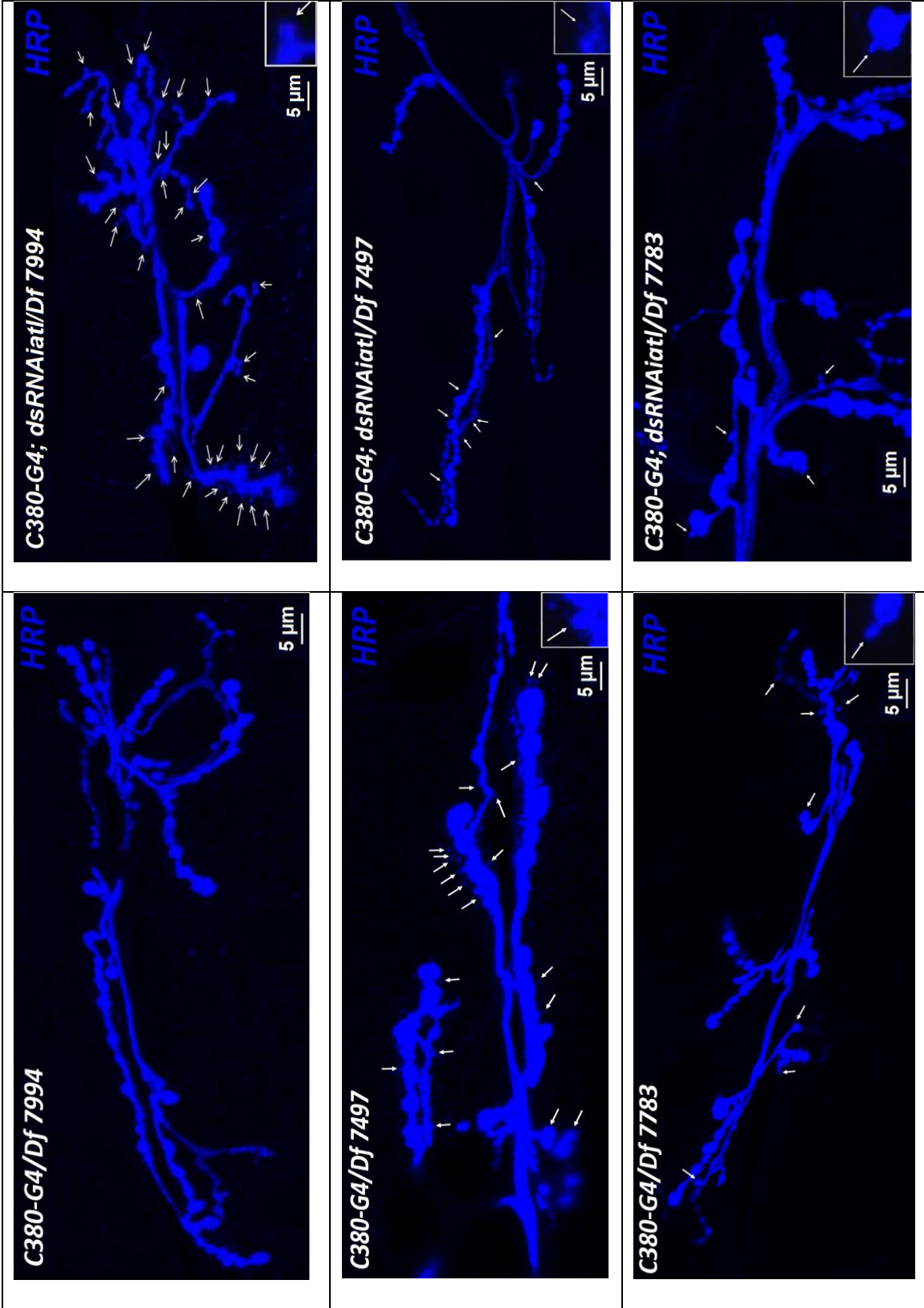
**Figura 11.** Cuantificación realizada al contar la cantidad de botones sinápticos y botones satélites (izquierda y derecha, respectivamente) dividido por la longitud de la neurona en cada genotipo analizado. Cada condición se comparó con el control C380-G4/Df 7994. La barra sobre cada gráfico representa el error estándar (\*\*\*\*= $p < 0.0001$ ).

En segundo lugar, analizamos la cantidad de botones satélites en las mismas moscas que expresan el *dsRNAi* de *atl* en combinación con la deficiencia control y con las deficiencias que contienen a *tkv* (7497) y a *dpp* (7783).

La tinción con HRP revela que el número de botones satélites sí se ve alterada por la presencia de las deficiencias, observándose diferencias significativas (Figura 11 derecha y Figura 12).

Podemos observar que el efecto del *dsRNAiatl* se manifiesta de manera diferente en las condiciones analizadas.

- a) En la condición *C380-G4; dsRNAiatl/Df 7994*, se observa que es el *dsRNAiatl* el que hace que aumente significativamente la cantidad de botones satelites por  $\mu\text{m}$  con respecto al control.
  
- b) En las otras dos condiciones, las que contienen a *tkv* y *dpp* (*C380-G4; dsRNAiatl/Df 7497* y *C380-G4; dsRNAiatl/Df 7783* respectivamente) se observa un rescate del fenotipo normal mostrando una cantidad de botones satélites similar a las que se pueden observar en el control ya que estas dos no presentan diferencias significativas con él. Esto nos indica que es el *dsRNAiatl* el que causa esto.

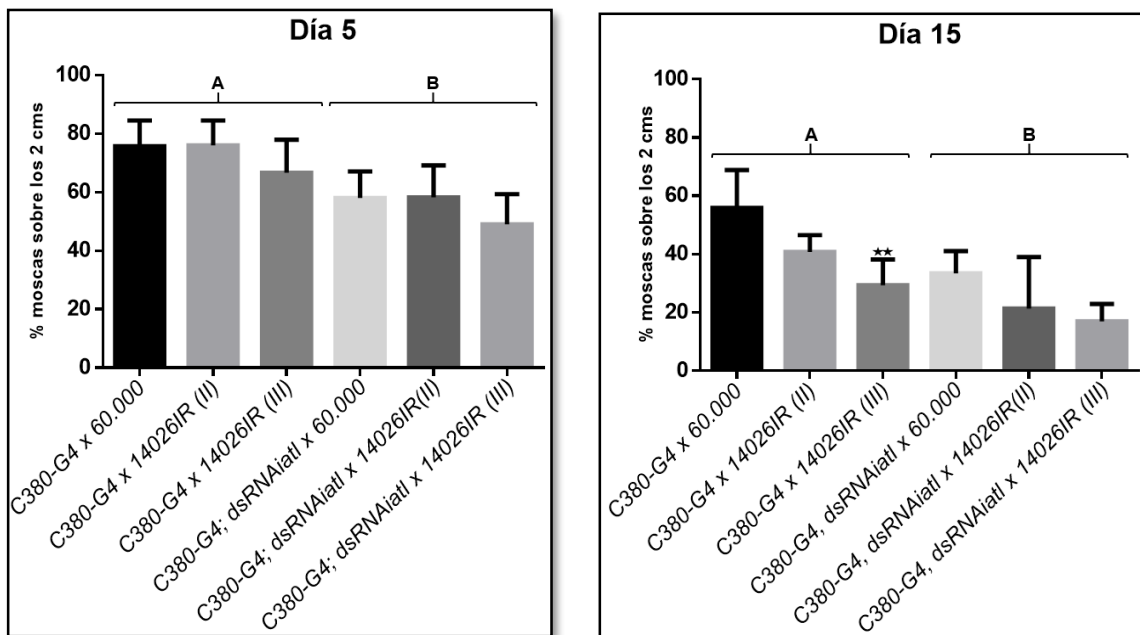


**Figura 12.** Representación de las neuronas con los diversos genotipos que muestran las sinapsis. Las flechas blancas representan los botones satélites que presentan cada uno. El cuadro en la esquina inferior derecha representa un ejemplo de botón satélite. Escala: 5  $\mu$ m.

**Cruzas con *dsRNAi* específicos para *tkv* demostró una disminución en el fenotipo motor en el ensayo de escalada**

Para confirmar que *tkv* está interactuando con *atl*, se realizaron las cruzas señaladas en los grupos A y B (Figura 13), donde se compara un control con el resto de los genotipos (*C380-G4 x 60.000* o *C380-G4; dsRNAiatl x 60.000* con cada una de las dos condiciones donde están presentes los *dsRNAitkv*). Esto se hizo tanto para el día 5 como para el 15, que se detallan a continuación:

Grupo A	Grupo B
<i>C380-G4 x 60.000</i>	<i>C380-G4; dsRNAiatl x 60.000</i>
<i>C380-G4 x 14026IR (II)</i>	<i>C380-G4; dsRNAiatl x 14026IR (II)</i>
<i>C380-G4 x 14026IR (III)</i>	<i>C380-G4; dsRNAiatl x 14026IR (III)</i>



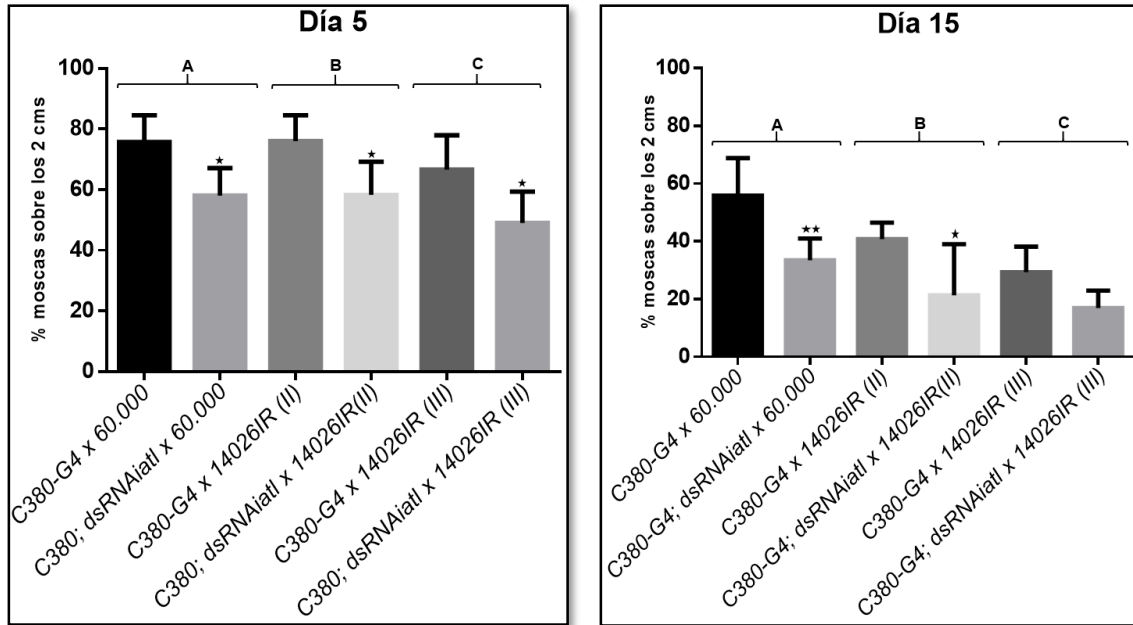
**Figura 13.** Comparación entre las cepas de moscas que contienen una disminución a la expresión de *atl* (*C380-G4; dsRNAiatl*) y los interferentes para *tkv* ubicados en el cromosoma 2 y 3. También se realizó la misma crusa con los interferentes para *tkv*, pero con el driver de expresión únicamente (*C380-G4*). Se encuentran representados el día 5 (izquierda), el día 15 (derecha) y los grupos de comparación, A y B. La barra sobre cada gráfico representa el error estándar (\*\* $p < 0.005$ ).

Al día 5, no existen diferencias significativas al compararlas con el control en ninguna de las condiciones, donde se puede rescatar que hay un comportamiento algo mejor en las moscas que están cruzadas solamente con el driver *w*; *C380-G4* donde suben en promedio unas once moscas (~80%), mientras que para las que están con el *w*, *C380-G4; dsRNAiatl* suben en promedio ocho.

Para el día 15, se observa que, a pesar que las moscas cruzadas con *C380-G4* presentan un comportamiento general mejor que las cruzadas con el *w*, *C380-G4; dsRNAiatl*, sólo hay unas moscas que fueron significativas al compararlas con su control (*C380-G4 x 60.000 vs C380-G4 x 14026IR [III]*). De las moscas cruzadas con el *w*, *C380-G4; dsRNAiatl* se puede rescatar que aparentemente el control de estas se comporta de manera más deficiente que el control del *C380-G4* y que no hay diferencias significativas con el resto de las moscas comparadas.

Para recabar la mayor cantidad de datos posibles con esta información, se compararon ahora las moscas *C380-G4* con las que presentan *w*, *C380-G4; dsRNAiatl*, de manera que queden ordenadas en tres grupos (para día 5 y 15, Figura 14). Las moscas cruzadas con *C380-G4* serán en este caso el control en cada condición, de manera que existirán tres controles distintos para cada día. Los grupos quedan ordenados de la siguiente forma:

<b><i>C380-G4 vs C380-G4; dsRNAiatl</i></b>
<i>C380-G4 x 60.000 vs. C380-G4; dsRNAiatl x 60.000 (Grupo A)</i>
<i>C380-G4 x 14026IR (II) vs. C380-G4; dsRNAiatl x 14026IR (II) (Grupo B)</i>
<i>C380-G4 x 14026IR (III) vs. C380-G4; dsRNAiatl x 14026IR (III) (Grupo C)</i>



**Figura 14.** Comparación realizada entre las cepas de moscas que contienen una disminución a la expresión de *atl* (C380; *dsRNAiatl*) y los interferentes para *tkv* ubicados en el cromosoma 2 y 3. Se utilizó como control las moscas cruzadas con el driver de expresión únicamente (C380-G4). Se encuentran representados el día 5 (izquierda), el día 15 (derecha) y los grupos de comparación, A, B y C. La barra sobre cada gráfico representa el error estándar (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$ ).

Para el día 5, se puede observar que en el control las moscas escalan más que las moscas que presentan el *w*, C380-G4; *dsRNAiatl*, obteniéndose diferencias significativas en la comparación.

Para el día 15 podemos observar algo similar, que los controles escalan más llegando a tener incluso dos niveles de significancia (C380-G4 x 60.000 vs. C380-G4; *dsRNAiatl* x 60.000). En la última cruza, C380-G4 x 14026IR (III) vs. C380-G4; *dsRNAiatl* x 14026IR (III) se observa que si bien, hay diferencias, estas no son significativas. Así el fenotipo motor asociado a disminución de los niveles de *tkv* enmascaran el asociado a la disminución de *atl*. Este resultado sugiere que *tkv* podría ser epistático sobre *atl*. Lo que está de acuerdo con la idea de que *atl* regula negativamente la señalización mediada por *tkv*.



## **DISCUSIÓN**

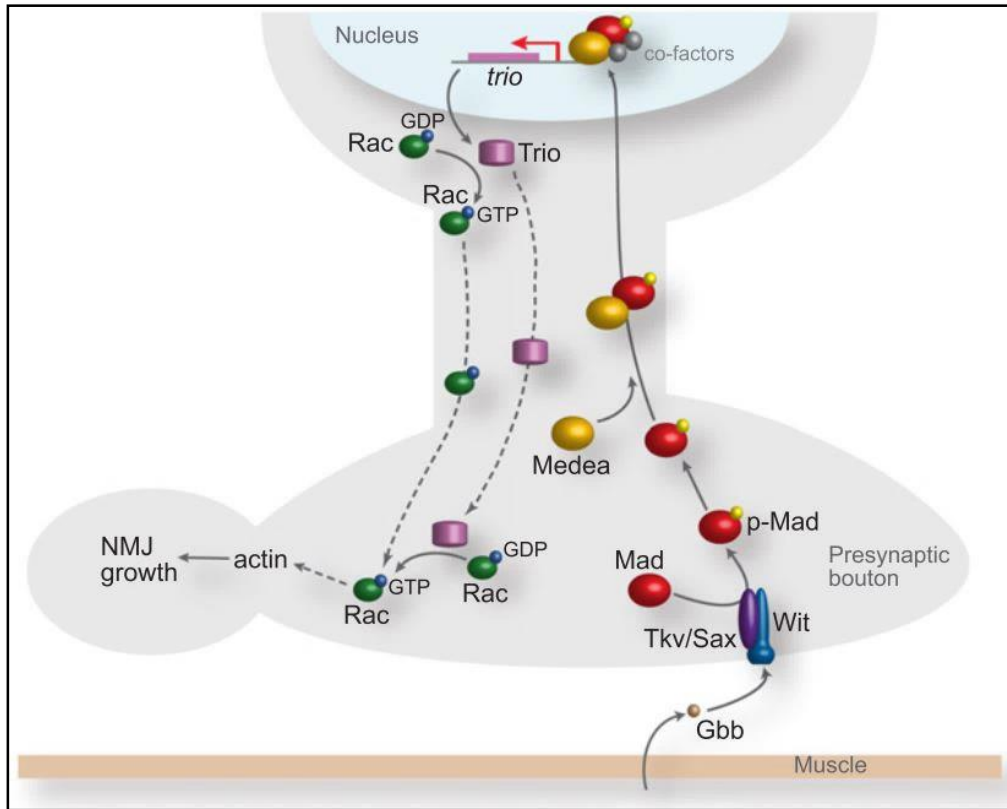
En este trabajo rastreamos el cromosoma 2 de *D. melanogaster* para identificar regiones de su genoma que modificaran el fenotipo de escalada asociado a la disminución de la expresión de *atlastina*, específicamente en neuronas motoras. La función de *atl* en neuronas no ha sido estudiada en profundidad, así que nuestros hallazgos constituyen el inicio de una potencial línea de investigación que ayude a estudiar esta problemática. En la estandarización de nuestro rastreo elegimos los genes candidatos que han demostrado ser importantes en el estudio de la PEH (Noreau et al. 2014) en lo que respecta a que mutaciones en ellos causan un deterioro importante de las neuronas motoras, causando el síndrome. Esto nos sirvió como punto de entrada para el comienzo de nuestra investigación.

Dentro de los resultados que obtuvimos al hacer la estandarización observamos que para el día 5, tanto para los 2 como para los 5 cm, todas las moscas que fueron cruzadas con las deficiencias de los genes candidatos (*atl*, *spas*, *reep 5-6* y *vcp*) demostraron escalar menos que el control. Para el día 15, para los 2 y para los 5 cm, las cepas con deficiencia a *atl* y *spas* presentan diferencias significativas con respecto al control alterando más el fenotipo de escalada, haciendo que las moscas escalen menos. El gen *vcp* por su parte hace que las moscas también escalen menos, pero la diferencia con el control no es significativa. Sin embargo, las moscas que presentan deficiencia en el gen *reep-5,6* demostró tener un comportamiento distinto ya que hay un rescate del fenotipo de escalada, haciendo que las moscas escalen más que el control. El gen *reep* es un morfógeno que se localiza en el RE (González & Couve 2014) y que se ha comprobado que interactúa

con *atl* (Noreau et al. 2014). Por tanto, lo que podría estar pasando aquí puede deberse a que *atl* regula negativamente a *reep*. Por tanto, cuando hay una disminución de la expresión de *atl*, la actividad de *reep* aumentaría, pero cuando a la menor expresión de *atl* le sumamos una menor expresión de *reep*, esto genera que exista una manifestación fenotípica normal de las motoneuronas, produciendo el rescate. Más trabajo es necesario para entender a nivel celular y molecular la naturaleza de esta interacción. En resumen, el trabajo realizado en la estandarización, utilizando estos genes que interactúan con *atl* validó nuestro método de rastreo.

Al rastrear los brazos L y R del cromosoma 2 pudimos encontrar que la cantidad de deficiencias que muestran cierta interacción con *atl* son 15 en total (4 en el brazo 2L y 11 en el 2R). De las analizadas en el 2R, una sola no mostró interacción con el driver, sugiriendo que las restantes son haploinsuficientes para el carácter analizado y, por tanto, se descartaron. De las cuatro encontradas en el 2L, dos de ellas son haploinsuficientes, mientras que las otras dos al parecer interactúan con *atl*, siendo estas las deficiencias 7497 y 7783, que contiene a *tkv* y a *dpp*, respectivamente.

Debido al tiempo, no fue posible realizar el mapeo de los genes de cada deficiencia para esta tesis, sin embargo, nos enfocamos en la deficiencia 7497, la cual contiene a *thickveins (tkv)*, que participa en la vía de señalización de BMP (Figura 15) (Kang et al. 2014). Esta vía actúa en diversas especies animales, desde humanos hasta insectos. Este es la que promueve el correcto crecimiento de las uniones neuromusculares en la mosca (McCabe et al. 2004).



**Figura 15.** Representación de la vía de señalización BMP que participa en promover el crecimiento de la unión neuromuscular en *Drosophila* (Ball et al. 2010). La señalización de la vía BMP comienza en el músculo post-sináptico por el ligando de BMP, Glass bottom boat (Gbb) que induce la actividad del receptor en las neuronas motoras pre-sinápticas que culmina con un incremento en la fosforilación del factor de transcripción, Mothers against decapentaplegic (Mad), y su consecuente acumulación en el núcleo para sintetizar Trio, la proteína resultante de la señalización de la vía BMP-Smad que induce el crecimiento de la UNM. La vía BMP actúa durante el desarrollo generando competencia para el crecimiento sináptico rápido mediante la regulación de los niveles de la proteína Trio.

La estructura y la función de la sinapsis son características fundamentales de la plasticidad durante el desarrollo del sistema nervioso en adulto, y son requeridas para el establecimiento de circuitos neuronales y la correcta actividad cerebral (Ball et al. 2010). En *Drosophila*, potenciar la señalización de la vía BMP causa un fenotipo anormal caracterizado por un sobrecrecimiento axonal distal en la unión neuromuscular de la neurona presináptica (Tsang et al. 2009).

Nuestros resultados muestran que la letalidad de *tkv* en combinación con *w*; *C380-G4* es rescatada al combinarla con la disminución de la expresión de *atl*. Este hallazgo es compatible con la evidencia mostrada en pez cebra donde *Atl* inhibiría

la localización de Tkv en la membrana, regulando negativamente la vía de BMP (Fassier et al. 2010). Así la disminución de *atl* mediante la expresión de un *dsRNAi* en neuronas aumentaría la actividad de la vía de BMP en las neuronas. Esto hace por consiguiente que se transcriba en mayor cantidad el gen *trio*, el cual es un gen diana que se encuentra río abajo de la vía de BMP, lo que conlleva a un sobrecrecimiento de la sinapsis, reflejado por la aparición de botones satélites en la UNM de la larva.

La disminución de *tkv* en conjunto con *atl* podría conducir a un rescate del fenotipo de escalada de los adultos, sin embargo, nuestros resultados utilizando un *dsRNAi* para *tkv* en combinación con el *dsRNAi* de *atl* no mostraron rescate del fenotipo motor. Dado que aún es necesario caracterizar la eficiencia del *dsRNAi* para *tkv*, no es posible concluir acerca de este resultado.

El método de rastreo demostró ser efectivo en lo que respecta a encontrar deficiencias que podrían contener genes que interactúan con *atl*, ya que fue posible escoger dos deficiencias candidatas (la 7497 y la 7897). Además, se observaron resultados interesantes cuando se cruzó la cepa de prueba con los *dsRNAi* para *tkv*, lo que estaría confirmando que es un método válido para encontrar fenotipos y posteriormente analizarlos. Como algo desfavorable es que las deficiencias 7783 y la 8910 fueron escogidas como candidatas no por presentar diferencias significativas con el control al ser cruzadas con la cepa de prueba, sino por no eclosionar.

Cuando quedan solamente pupas negras, puede deberse a que probablemente estas moscas presentan una incapacidad para salir de la pupa,

debido a una marcada debilidad muscular, ya que no tienen la fuerza necesaria para salir del pupario, quedando atrapadas en él y muriendo ahí mismo.

El trabajo aquí propuesto podría ayudar en el futuro al tratamiento contra la PEH ya que, de acuerdo a los resultados obtenidos, existen genes (como *tkv*) que podrían estar interactuando con *atf*. Entonces, ahora queda por comprobar con otras técnicas dicha interacción para así confirmar que se pueden atacar otros genes como este en humanos para ayudar a tratar a las personas que poseen este síndrome.

## CONCLUSIONES

- ✓ Se identificaron regiones del genoma que modifican predominantemente el fenotipo de escalada asociado a la disminución de *atl* en neuronas motoras de *D. melanogaster*.
- ✓ Se sugiere que el gen *thickveins* podría ser un candidato en estar interactuando con *atlastina* de acuerdo a lo observado en moscas, lo que queda demostrado al observar los resultados obtenidos con uno de los dos distintos interferentes utilizados para este gen (el interferente III) que demostró que podría estar ocurriendo una eventual interacción entre estos dos genes.
- ✓ La interacción de las deficiencias que contiene a *tkv* y *dpp* con *atl* queda demostrada cuando se observan las UNM de larvas donde hay un rescate del fenotipo normal en las larvas que presentan las deficiencias 7497 y 7783, ya que presentan una cantidad casi nula de botones satélites similar al control (*C380-G4/Df7994* vs *C380; dsRNA<sub>atl</sub>/7497*, Figura 6).

## PROYECCIONES

Dentro de las cosas que me propongo a realizar una vez terminada mi tesis es seguir contribuyendo a completar el rastreo del resto del genoma de la mosca y por eso, las cosas a realizar y con las cuales puedo colaborar son:

- Realizas las cruzas con las deficiencias pequeñas para restringir las regiones genómicas a las más pequeñas posibles.
- Realizar los ensayos para día 5 y 15 con los *dsRNAs* específicos para estas regiones.
- Completar el rastreo del resto del genoma de la mosca (cromosomas 1, 3 y 4).
- Caracterizar más profundamente la sinapsis de la UNM de larvas de moscas en condiciones de disminución de la expresión de *tkv* y *atl*.

## **BIBLIOGRAFÍA**

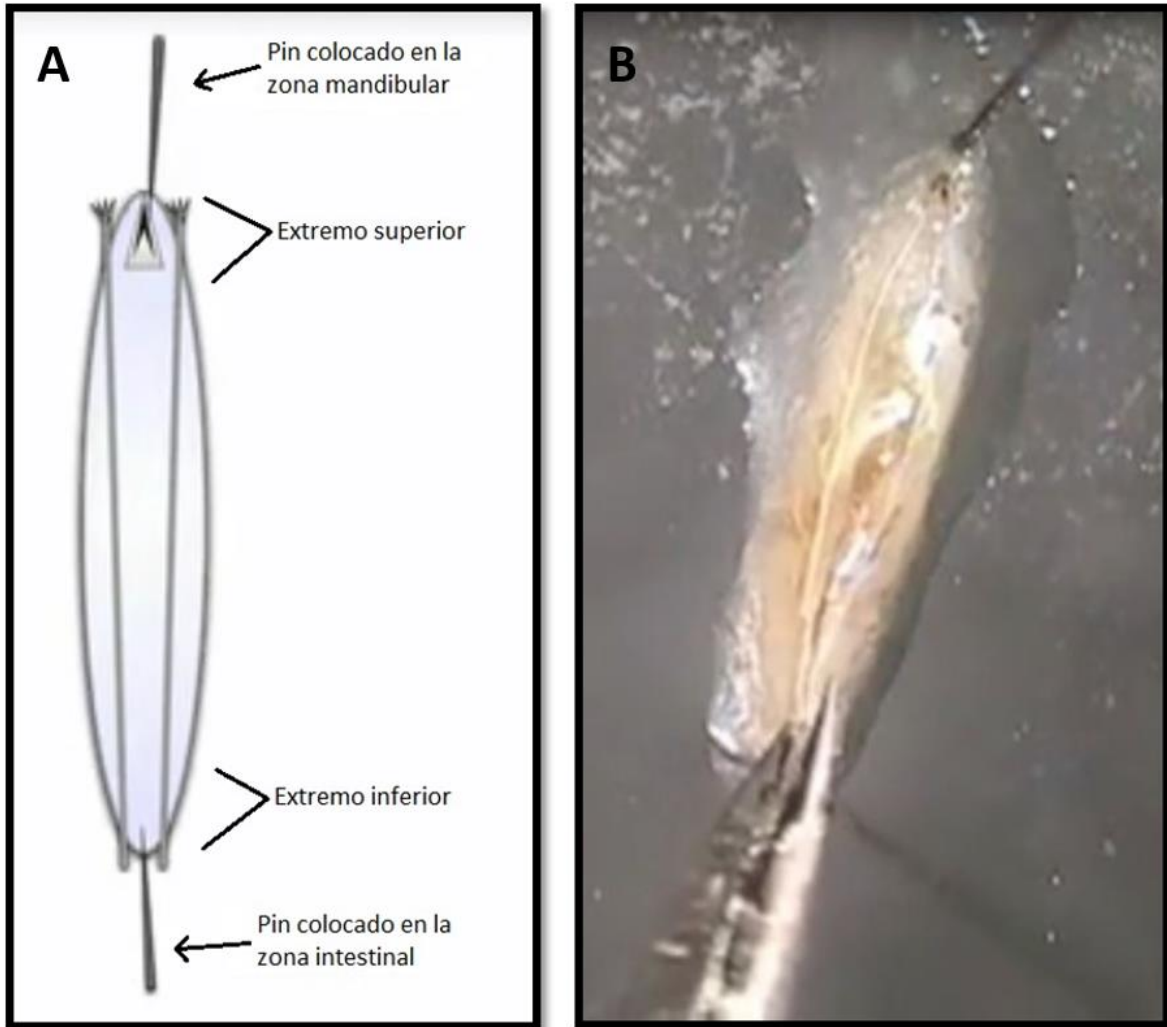
- Adoutte, A. et al., 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp.4453–4456.
- Ball, R.W. et al., 2010. Retrograde BMP signaling controls synaptic growth at the nmj by regulating trio expression in motor neurons. *Neuron*, 66, pp.536–549.
- Barone, M.C. & Bohmann, D., 2013. Assessing neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining. *Journal of visualized experiments : JoVE*, p.e50339.
- Beetz, C. et al., 2013. A spastic paraplegia mouse model reveals REEP1-dependent ER shaping. *Journal of Clinical Investigation*, 123, pp.4273–4282.
- Bian, X. et al., 2011. Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, pp.3976–3981.
- Björk, S. et al., 2013. REEPs Are Membrane Shaping Adapter Proteins That Modulate Specific G Protein-Coupled Receptor Trafficking by Affecting ER Cargo Capacity. *PLoS ONE*, 8, pp.1–28.
- Blackstone, C., O’Kane, C.J. & Reid, E., 2011. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nature reviews. Neuroscience*, 12, pp.31–42.
- Calleja, J. & Berciano, J., 1993. Hereditary “ pure ” spastic paraplegia : study of families, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, pp.175–181.
- Denora, P.S., Santorelli, F.M. & Bertini, E., 2013. *Hereditary spastic paraplegias : one disease for many genes , and still counting* 1st ed., Elsevier B.V.
- Du, F. et al., 2010. Functional conservation of human Spastin in a *Drosophila* model of autosomal dominant-hereditary spastic paraplegia. *Human Molecular Genetics*, 19, pp.1883–1896.
- Duffy, J.B., 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist’s Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34, pp.1–15.
- Fassier, C. et al., 2010. Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nature neuroscience*, 13, pp.1380–1387.



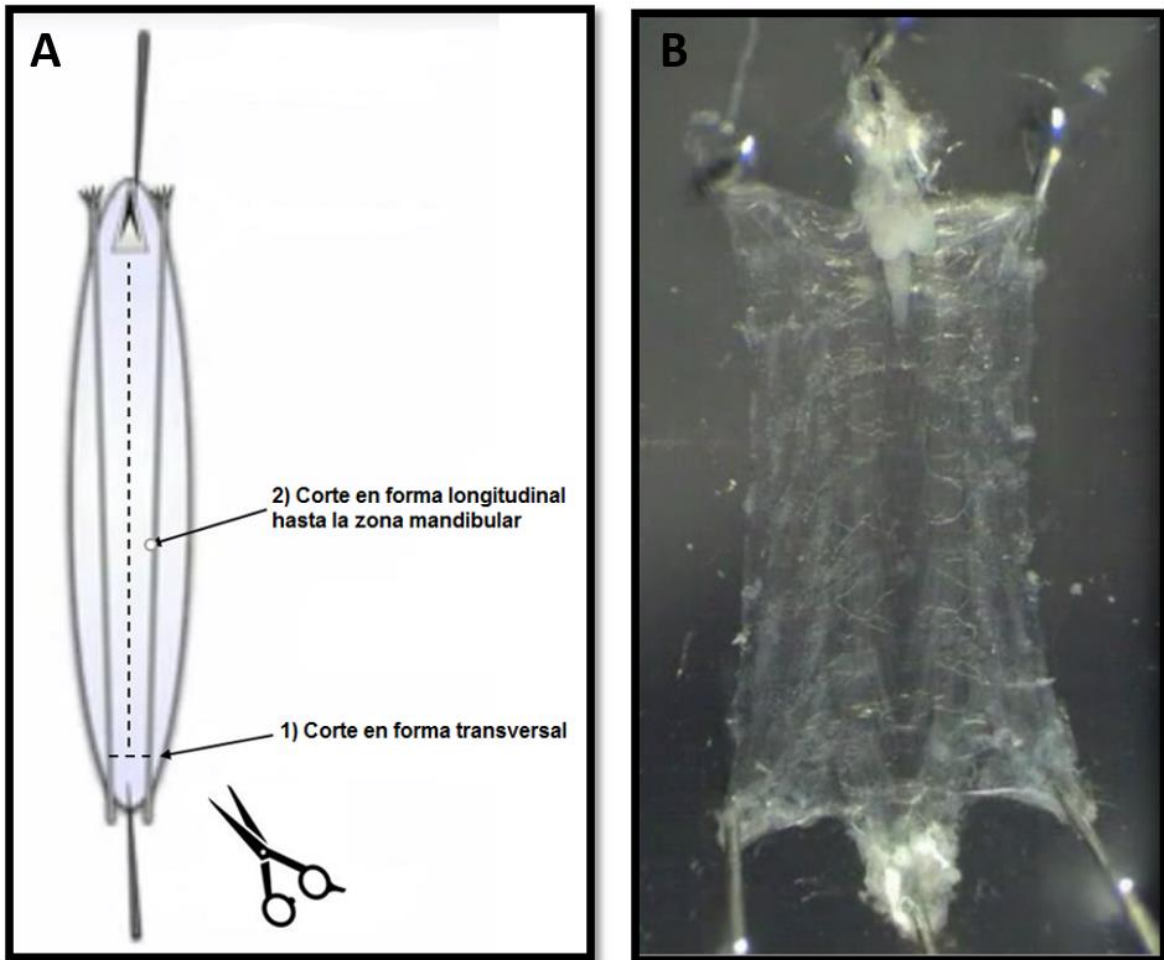
- Lo Giudice, T. et al., 2014. Hereditary spastic paraplegia: Clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Experimental neurology*, 261, pp.518–539.
- González, C. & Couve, A., 2014. The axonal endoplasmic reticulum and protein trafficking: Cellular bootlegging south of the soma. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 27, pp.23–31.
- Goyal, U. & Blackstone, C., 2014. Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation, *Biochim Biophys Acta*, 1833, pp.2492–2498.
- Hartwell, L.H. et al., 2011. *Drosophila melanogaster*: Genetic Portrait of the Fruit Fly. *Genetics: From Genes to Genomes, 4th Edition*, pp.75–107.
- Hirth, F., 2010. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9, pp.504–523.
- Kang, M.J. et al., 2014. Disruption of Axonal Transport Perturbs Bone Morphogenetic Protein (BMP) - Signaling and Contributes to Synaptic Abnormalities in Two Neurodegenerative Diseases. *PloS one*, 9, p.e104617.
- Klebe, S., Stevanin, G. & Depienne, C., 2015. Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias : From SPG1 to SPG72 and still counting ´ tique et clinique des paraplegies spastiques hereditaires : de SPG1 a. *Revue Neurologique*, 171, pp.505–530.
- Lee, M. et al., 2009. *Drosophila* Atlastin regulates the stability of muscle microtubules and is required for synapse development. *Developmental Biology*, 330, pp.250–262.
- Lee, S. & Cooley, L., 2007. Jagunal is required for reorganizing the endoplasmic reticulum during *Drosophila* oogenesis. *Journal of Cell Biology*, 17, pp.941–952.
- Mccabe, B.D. et al., 2004. Signaling Essential for Synaptic Growth. *Neuron*, 41, pp.891–905.
- McDermott, C.J. et al., 2003. Hereditary Spastic Paraparesis: Disrupted Intracellular Transport Associated with Spastin Mutation. *Annals of Neurology*, 54, pp.748–759.
- Noreau, A., Dion, P. a. & Rouleau, G. a., 2014. Molecular aspects of hereditary spastic paraplegia. *Experimental Cell Research*, 325, pp.18–26.
- O’Sullivan, N.C., Dräger, N. & O’Kane, C.J., 2013. Characterization of the *Drosophila* Atlastin Interactome Reveals VCP as a Functionally Related Interactor. *Journal of Genetics and Genomics*, 40, pp.297–306.

- Orso, G. et al., 2009. Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature*, 460, pp.978–983.
- Park, S., 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network, *The Journal of Clinical Investigation*, 120.
- Salinas, S. et al., 2008. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *The Lancet Neurology*, 7, pp.1127–1138.
- Sanderson, C.M. et al., 2006. Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Human Molecular Genetics*, 15, pp.307–318.
- Sturtevant, Alfred H. Lewis, E.B., 2001. Note from the Publishers, Introduction and Author's Preface. *A History of Genetics*, pp.VII – XI.
- Trotta, N., 2004. The Hereditary Spastic Paraplegia Gene, spastin, Regulates Microtubule Stability to Modulate Synaptic Structure and Function. *Elsevier*, 128, pp.189–190.
- Tsang, H.T. et al., 2009. The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Human molecular genetics*, 18, pp.3805–3821.
- Wu, F. et al., 2014. Comparison of human and Drosophila atlastin GTPases. *Protein & Cell*, 6, pp.139–146.
- Zeng, Z. et al., 2014. Ter94/VCP is a novel component involved in BMP signaling. *PloS one*, 9, p.e114475.
- Zhao, X. et al., 2001. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nature genetics*, 29, pp.326–331.
- Zhu, P.P. et al., 2003. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp.49063–49071.

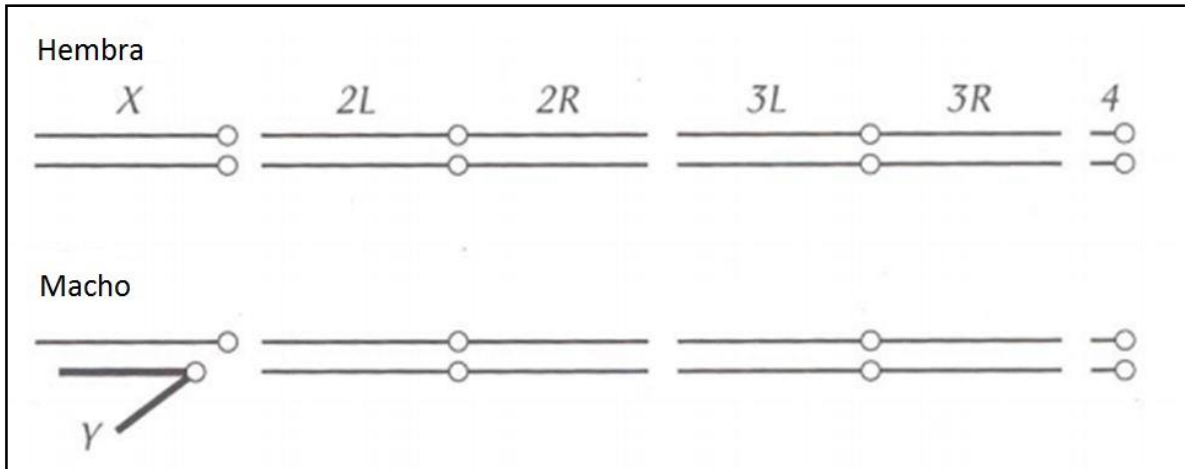
## ANEXO



**Figura A.** Ubicación de las agujas de disección (“pin”) en la larva. **A:** esquema que muestra la forma en que deben ser colocadas las agujas de disección para realizar la disección en la larva de tercer estadio y exponer así las paredes musculares para ver posteriormente la unión neuromuscular. **B:** Imagen que muestra cómo se colocan las agujas de disección para realizar la disección.



**Figura B.** Esquema que muestra la forma en cómo hacer el corte en la larva para diseccionarla. **A:** esquema que muestra la forma en que debe realizarse el primer corte con la tijera para después cortar suavemente en dirección hacia la zona mandibular. **B:** Imagen real que muestra cómo quedan las agujas de disección colocadas a ambos lados después de haber hecho el corte desde la zona intestinal hacia la zona mandibular.

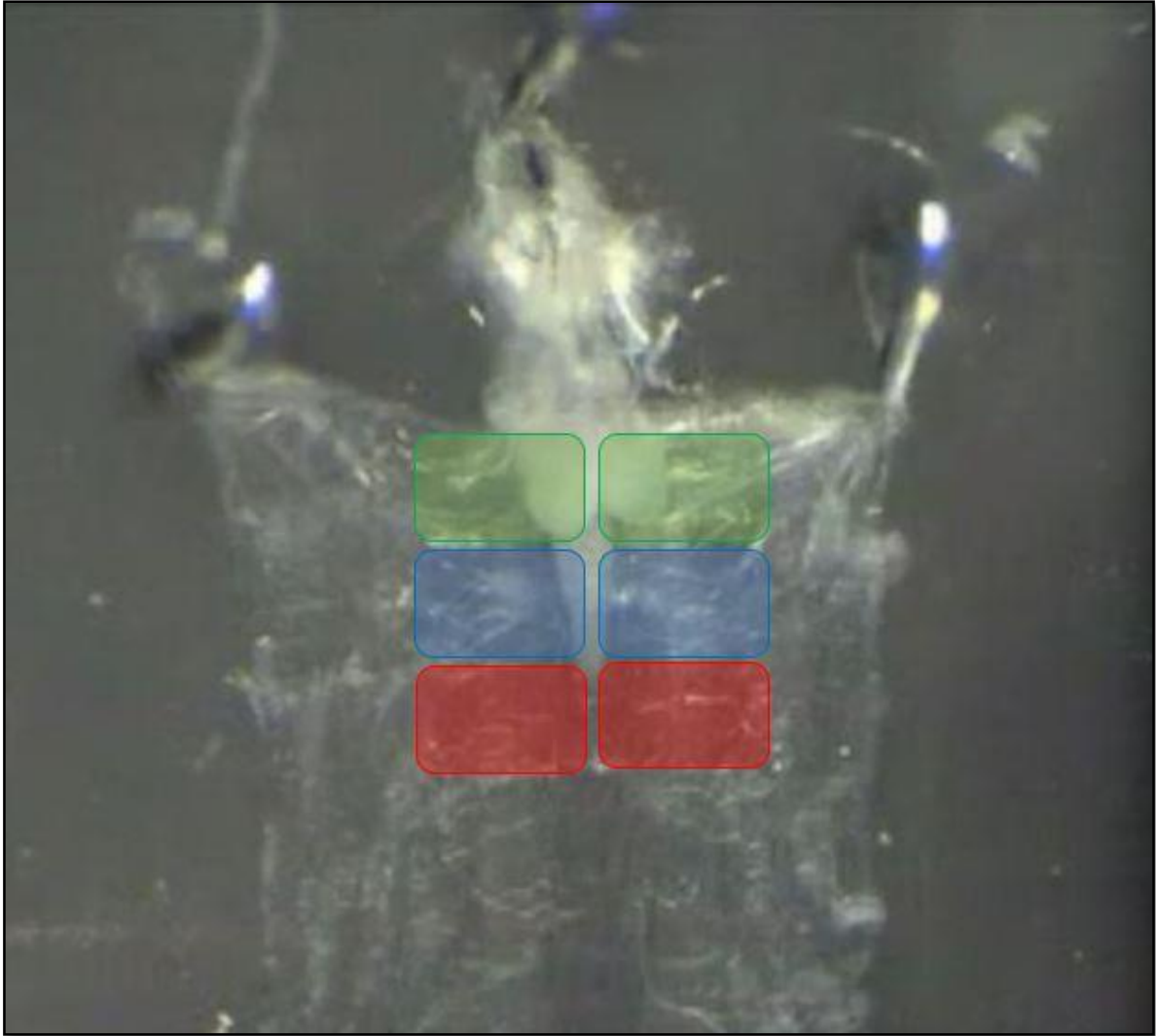


**Figura C.** Esquema que representa los cromosomas de la mosca. Imagen que representa los cromosomas de *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* posee cuatro pares de cromosomas, representados con líneas para los brazos y círculos para los centrómeros. "L" hace referencia al brazo izquierdo, mientras que "R" lo hace al brazo derecho. Los cromosomas X y 4 tienen diminutos brazos derechos. El cromosoma 4 es únicamente 1/5 en largo comparado al X, 2L, 2R, 3L y 3R.

Arm	# of euchromatic genes	# undeleted euchromatic genes
1	2288	43
2L	2765	30
2R	3089	46
3L	2845	71
3R	3535	40
4	88	5
All	14610	235

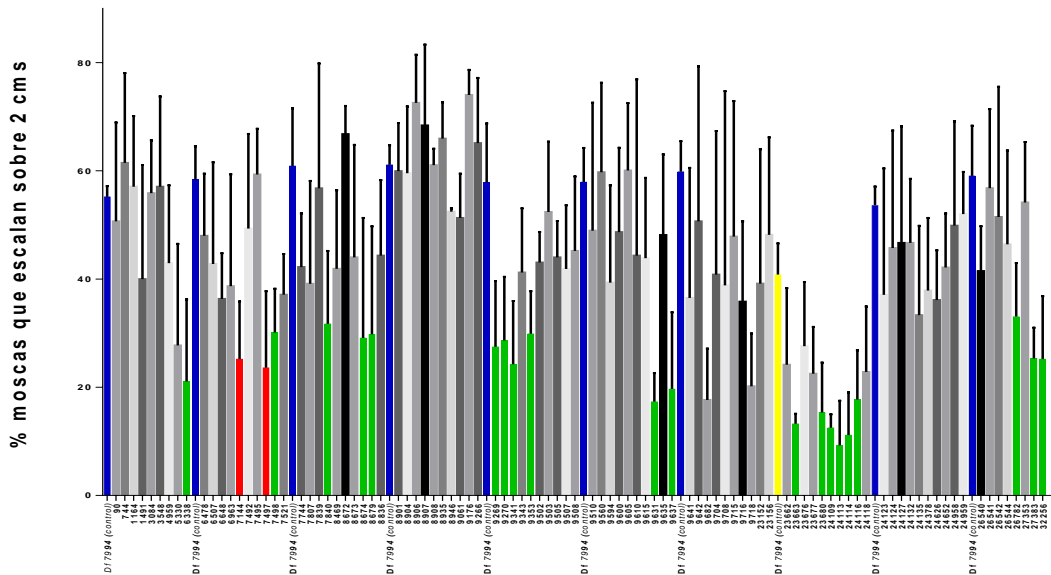
Arm	% euchromatic coverage	Number of stocks
1	98.1	93
2L	98.9	102
2R	98.5	92
3L	97.5	77
3R	98.9	103
4	94.3	7
All	98.4	473

**Figura D.** Esquema que muestra las deficiencias existentes en cada brazo de los cuatro cromosomas de la mosca. Imagen de las deficiencias que existen en cada brazo de los cuatro cromosomas de la mosca. Extraída de: <http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df/dfkit-info.htm>

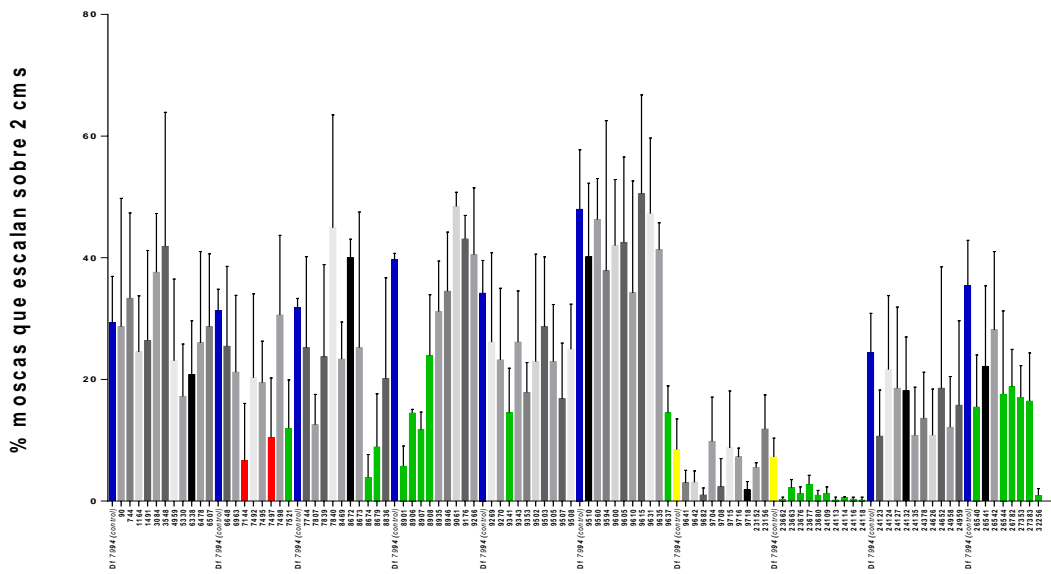


**Figura E.** Pares de segmentos usados para observar las sinapsis de la UNM. Segmentos musculares de las larvas de los cuales se sacaron imágenes de las sinapsis de la unión neuromuscular. Estos tres pares de segmentos son comparables entre sí. En verde: par uno; azul: par dos; rojo: par tres.

## 2L Día 5

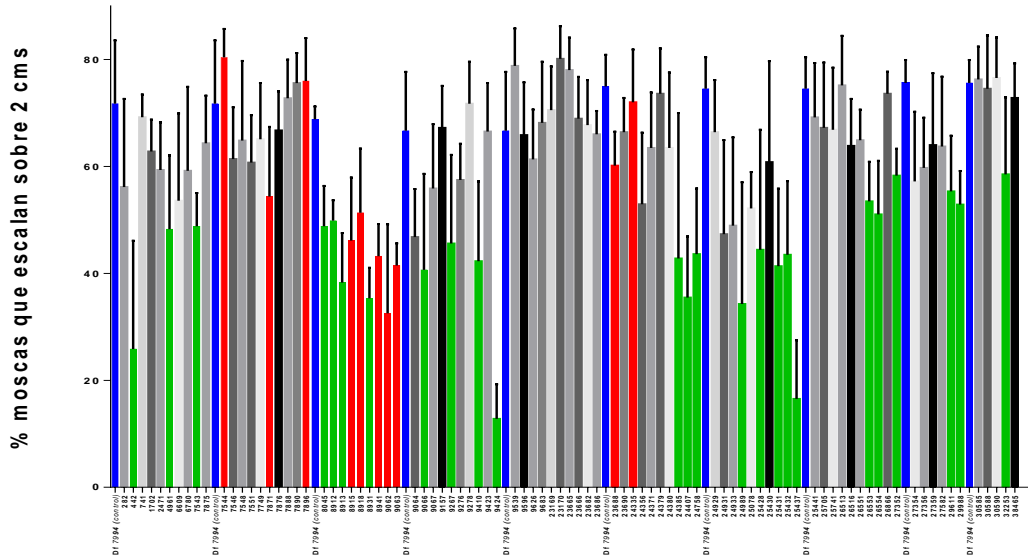


## 2L Día 15

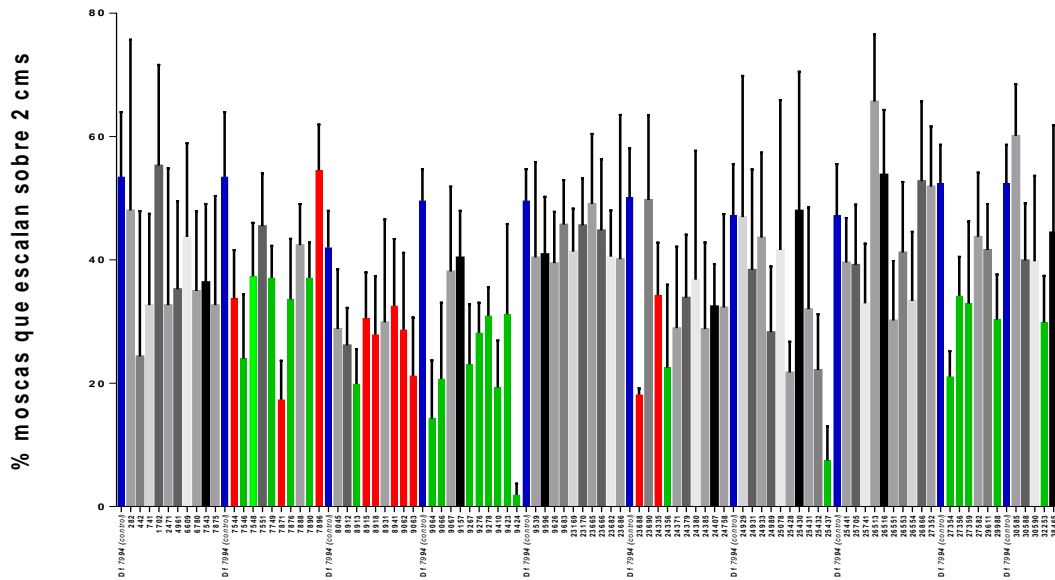


**Figura F.** Representación gráfica de la fenotipificación completa del brazo 2L. La imagen muestra la fenotipificación completa al cuantificar los datos obtenidos de todas las cruzas realizadas. En azul se representan los controles para cada grupo de cruzas realizadas; en rojo se muestran las cruzas con diferencias significativas y que son blancos para un análisis posterior en donde fueron cruzadas con la cepa *w*, *C380-G4*; en verde se representan las cruzas con diferencias significativas y que son blancos a los que falta cruzarlos con la cepa *w*; *C380-G4*; en amarillo se representan los controles que dieron en la fenotipificación muy por debajo de lo normal y que cada set de cruzas deben repetirse necesariamente. La **Df 1469** y la **Df 7783** no se representan en los gráficos porque no nacen al cruzarse con la cepa *w*, *C380-G4*; *dsRNAiatl*. La barra sobre los gráficos corresponde al error estándar.

### 2R Día 5



### 2R Día 15



**Figura G.** Representación gráfica de la fenotipificación completa del brazo 2R. La imagen muestra la fenotipificación completa al cuantificar los datos obtenidos de todas las cruzas realizadas. En azul se representan los controles para cada grupo de cruzas realizadas; en rojo se muestran las cruzas con diferencias significativas y que son blancos para un análisis posterior en donde fueron cruzadas con la cepa *w*, *C380-G4*; en verde se representan las cruzas con diferencias significativas y que son blancos a los que falta cruzarlos con la cepa *w*; *C380-G4*. La **Df 8910** no se representa en los gráficos porque no nace al cruzarse con la cepa *w*, *C380-G4*; *dsRNAiatl*. La barra sobre los gráficos corresponde al error estándar.