

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Caracterización del rol de atlastina y sus modificadores genéticos en la unión neuromuscular y axones motores de adultos de *Drosophila melanogaster*”**

**ANDRÉS PATRICIO IBACACHE CHÍA**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN GENÉTICA

Directores de tesis: Dr. Patricio Olguín Aguilera  
Dra. Jimena Sierralta Jara

**2018**





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

**ANDRÉS PATRICIO IBACACHE CHÍA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster con mención en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día Miércoles 16 de Mayo del año 2018.

**Prof. Dr. Patricio Olguín Aguilera**

Director de Tesis

(Laboratorio Genética del Desarrollo)

**Prof. Dra. Jimena Sierralta Jara**

Director de Tesis

(Laboratorio Neurobiología celular y molecular)

## **COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dra. María Soledad Matus**

**Prof. Dra. Verónica Cambiazo Ayala**

**Prof. Dr. Raúl Godoy Herrera**

**Prof. Dra. Luisa Herrera Cisterna**

Presidenta Comisión

Dedico este logro a mis padres  
Juan y Rosa, a mis hermanos Rodrigo  
y Marjorie, y a mis amigos que han  
permitido que finalice esta etapa de  
mi vida con su apoyo y ayuda.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a toda la gente que ha sido parte fundamental durante toda mi estadía en este programa de magíster, ya que sin su valiosa ayuda no habría podido completar esta etapa de mi vida con éxito.

En primer lugar, quiero mencionar a la gente que forma parte del Laboratorio de Genética del Desarrollo de *Drosophila*, donde conocí personas como Gerardo, Franco, Mauricio, Catalina, Claudia, Noemí, Ignacio, Nolberto y Gonzalo, cada uno dispuesto a colaborar y prestar su ayuda cuando fuese necesario. También, me gustaría agradecer a uno de mis tutores de tesis del programa, el Dr. Patricio Olguín, investigador principal del laboratorio mencionado, quién además de confiar en mí para el desarrollo de este trabajo, me ayudó a comprender gran parte de las herramientas genéticas relevantes en el modelo de estudio *Drosophila melanogaster*.

Por otro lado, quiero agradecer a la gente del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular con quienes comparto día a día en el ámbito laboral, comenzando con los integrantes del laboratorio de *Drosophila* como Aquiles, Panchi, tío Kike, Esteban (*el topo*), Nía, el sr. Estrada y el gran tío Lalo, además de ex integrantes como Carlitos, Grace, Lorena y “Tomeche”, quienes con su simpatía y buena onda hicieron mucho más ameno el trabajo de laboratorio. Gracias a todos ellos por su humor negro y “aportes gráficos” que aportan constantemente. Agradezco a la Dra. Jimena Sierralta, investigador principal del laboratorio, quién además de guiarme me permitió estudiar este magíster y trabajar junto a ella al mismo tiempo, a pesar de no incorporarme al programa de postgrado que ella dirige, por lo cual estoy enormemente agradecido.

Junto a ellos, dirijo una mención especial a Angélica Figueroa, debido a su gran simpatía, calidad humana y “maestría” en la elaboración de la comida de moscas. También quiero agradecer al resto de los integrantes del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, a quienes no nombraré individualmente debido al gran número de personas que componen este grupo, pero que a pesar de no trabajar directamente junto a nosotros en el estudio de *Drosophila*, siempre estuvieron dispuestos a

colaborar en todo sentido, aportando además con sus bromas, apodos y carretes cuando fuese necesario.

Agradezco también a mi tutora del magíster, la Dra. Patricia Iturra, quién siempre estuvo atenta para colaborar y prestar su ayuda con temas que no necesariamente eran de índole académico. Gracias por toda su amabilidad.

Por último, agradezco todo el apoyo brindado por mi familia, comenzando con mis padres, quienes me apoyaron durante toda mi formación de pregrado y aún continúan haciéndolo a medida que prosigo con mis estudios de postgrado. A mis hermanos que igualmente me apoyaron para iniciar mis estudios de este magíster en genética y por prestarme su ayuda cuando fuese necesario.

# **ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i	
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii	
ABREVIATURAS.....	iv	
RESUMEN.....	vi	
ABSTRACT.....	vii	
1. INTRODUCCIÓN		
1.1 Sistema Nervioso, sinapsis y enfermedades neurodegenerativas.....	3	
1.2 Paraparesias Espásticas Hereditarias.....	6	
1.2.1 Modo de herencia y causas genéticas de las paraparesias espásticas hereditarias.....	7	
1.2.2 <i>Atlastina</i> : características, función y su relación con las paraparesias espásticas hereditarias.....	9	
1.2.3 <i>Atlastina</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> : un modelo de estudio de las paraparesias espásticas hereditarias.....	13	
2. HIPÓTESIS.....		19
3. OBJETIVOS		
3.1 Objetivo General.....	19	
3.2 Objetivos Específicos.....	19	
4. MATERIALES Y MÉTODOS		
4.1 Sistema de expresión GAL4-UAS.....	20	
4.2 Cepas de moscas.....	21	
4.3 Disección de extremidades de adultos de <i>Drosophila</i> .....	23	
4.4 Inmunofluorescencia.....	24	
4.5 Evaluación morfológica de axones y unión neuromuscular.....	24	
5. RESULTADOS		



5.1 La disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas altera la morfología de axones y UNM en extremidades de adultos de <i>D. melanogaster</i> .....	26
5.2 La disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas altera la disposición regular de las fibras musculares en extremidades de adultos de <i>D. melanogaster</i> .....	31
5.3 Existen regiones del genoma de <i>D. melanogaster</i> que alteran el fenotipo locomotor y morfológico de axones y UNM asociado a la disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas.....	34
5.4 Las regiones que alteran el fenotipo morfológico de axones y UNM asociados a la disminución de la expresión de <i>atf</i> también alteran la disposición regular de las fibras musculares en extremidades de adultos de <i>D. melanogaster</i> .....	41
5.5 Las regiones que alteran el fenotipo locomotor y morfológico de axones y UNM asociado a la disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas contienen genes que podrían actuar como modificadores genéticos.....	45
6. DISCUSIÓN	
6.1 La disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas altera el fenotipo morfológico de axones motores, UNMs y músculos de las extremidades de moscas adultas.....	50
6.2 Las deficiencias genómicas que modifican el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas, también alteran el fenotipo morfológico de axones motores, UNMs y músculos de las extremidades de moscas adultas.....	52
6.3 Las deficiencias genómicas que modifican el fenotipo motor y morfológico de axones motores, UNMs y músculos de las extremidades de moscas adultas contienen genes que podrían actuar como potenciales modificadores genéticos de las PEH asociadas a la disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas.....	54
6.4 <i>Atlastina</i> y el homólogo a <i>sly-1</i> serían fundamentales para mantener una comunicación neuronal adecuada.....	55
7. CONCLUSIONES.....	59
8. PROYECCIONES.....	60
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61

## 10. ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Evaluación de función motora: Ensayos de escalada.....	67
<b>Anexo 2.</b> Stocks de moscas y su respectivo origen empleados para el diseño de las moscas indicadas en el punto 4.2.....	68
<b>Anexo 3.</b> Cruzamientos generales realizados para la obtención de los diferentes genotipos de moscas empleadas para cada objetivo en este trabajo.....	69
<b>Anexo 4.</b> Cruzamientos para la obtención de los diferentes stocks de moscas utilizados como base para la generación de las cruas mostradas en el anexo 2.....	70
<b>Anexo 5.</b> Inmunofluorescencia de músculos de extremidades de adultos de <i>Drosophila</i> de 15 días de edad con disminución de la expresión de <i>atlastina</i> en motoneuronas.....	71
<b>Anexo 6.</b> Gráficos del porcentaje de escalada de adultos de <i>D. melanogaster</i> de 5 días de edad mostrando las deficiencias candidatas usadas como base para el estudio de neurodegeneración asociado a la disminución de la expresión de <i>atlastina</i> .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustración de sinapsis química mediada por neurotransmisores en vertebrados.....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema de mecanismos patogénicos involucrados en las PEH.....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema de los diferentes dominios de la proteína ATL-1 en humanos.....	10
<b>Figura 4.</b> Modelo de fusión homotípica de membranas del RE mediado por atlastina.....	11
<b>Figura 5.</b> Esquema de mutaciones de sentido erróneo conocidas en <i>ATL-1</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Esquema mostrando la composición general de una zona activa en <i>D. melanogaster</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Esquema comparando las atlastinas de humano y <i>D. melanogaster</i> .....	16
<b>Figura 8.</b> Esquema del sistema GAL4-UAS.....	20
<b>Figura 9.</b> Esquema de adulto de <i>Drosophila melanogaster</i> indicando las diferentes secciones en las que se encuentra dividida la extremidad de la mosca.....	23
<b>Figura 10.</b> Imagen obtenida con microscopio confocal de una extremidad de adulto de <i>Drosophila melanogaster</i> y su sinapsis neuromuscular.....	25
<b>Figura 11.</b> Imagen de microscopia confocal de axones de motoneuronas expresando un dsRNA que tiene como blanco a <i>atlastina</i> .....	27
<b>Figura 12.</b> Inmunofluorescencia de UNM de extremidades de adultos de <i>Drosophila</i> .....	28
<b>Figura 13.</b> Gráficos de la cuantificación de la densidad y tamaño de las zonas activas presentes en las UNMs de extremidades de moscas adultas.....	29
<b>Figura 14.</b> Inmunofluorescencia para validar la detección de zonas activas en la UNM de extremidades de moscas adultas usando el anticuerpo anti-BRP.....	30
<b>Figura 15.</b> Inmunofluorescencia de músculos de extremidades de moscas adultas con disminución de la expresión de <i>atlastina</i> en motoneuronas.....	32
<b>Figura 16.</b> Gráfico de la cuantificación del ancho de las diferentes fibras musculares presentes en las extremidades de moscas adultas.....	33
<b>Figura 17.</b> Inmunofluorescencia de axones de motoneuronas expresando un dsRNA para <i>atlastina</i> y cada una de las deficiencias que alteran el fenotipo motor de estas moscas.....	36

<b>Figura 18.</b> Inmunofluorescencia de UNMs de extremidades de moscas adultas con motoneuronas expresando un dsRNA para <i>atlastina</i> y cada una de las deficiencias que alteran el fenotipo motor de estas moscas.....	38
<b>Figura 19.</b> Gráfico de la cuantificación de la densidad y tamaño de las zonas activas presentes en las UNMs de extremidades de moscas adultas expresando un dsRNA para <i>atlastina</i> más cada una de las deficiencias estudiadas.....	40
<b>Figura 20.</b> Inmunofluorescencia de fibras musculares de extremidades de adultos de <i>Drosophila</i> expresando un dsRNA para <i>atlastina</i> en motoneuronas, sumado a cada una de las deficiencias estudiadas.....	42
<b>Figura 21.</b> Gráfico de la cuantificación del ancho de las diferentes fibras musculares presentes en las extremidades de moscas adultas expresando un dsRNA para <i>atlastina</i> además de cada una de las deficiencias estudiadas.....	44
<b>Figura 22.</b> Imagen referencial de la disposición de los genes comprendiendo la región 7783. Se destaca al gen <i>homólogo a sly-1 (slh)</i> .....	47
<b>Figura 23.</b> Imagen de microscopia confocal de axones de motoneuronas expresando un dsRNA de <i>atlastina</i> y un dsRNA de <i>slh</i> .....	48
<b>Figura 24.</b> Inmunofluorescencia de UNMs de extremidades de moscas adultas cuyas motoneuronas expresan un dsRNA de <i>atlastina</i> y un dsRNA de <i>slh</i> .....	49
<b>Figura 25.</b> Modelo propuesto para el modo de acción de <i>atlastina</i> y sus potenciales modificadores genéticos en la neurodegeneración axonal.....	57

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Listado de genes causantes de PEH divididos en subgrupos funcionales.....	7
<b>Tabla 2.</b> Listado con las diferentes cepas de moscas diseñadas en este estudio.....	21
<b>Tabla 3.</b> Listado de deficiencias usadas y su respectivo código de Bloomington Stock Center.....	35
<b>Tabla 4.</b> Listado de deficiencias modificadoras del fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de <i>atlastina</i> y los genes presentes en ellas.....	45

## **ABREVIATURAS**

°C: Grados Celsius

ALS: Esclerosis Lateral Amiotrófica

AME: Atrofia Muscular Espinal

*Atf*: Atlastina

BSC: Bloomington Stock Center

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BRP: Bruchpilot

CAZ: citomatriz de la zona activa

CyO: Curly of Oster

Df: Deficiencia

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Dpp: Decapentaplegic

DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank

dsRNA: Double Stranded RNA-Mediated Interference

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EMN: Enfermedades de motoneuronas

GDP: Guanosin Difosfato

GFP: Green Fluorescent Protein

GTP: Guanosin Trifosfato

If: Irregular facets

MHC: Miosina de cadena pesada

Mkrs: Minute-Karmoisin-Rosy-Stubble

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NSH1: Neuropatía Sensorial Hereditaria Tipo I

PBS: Buffer Salino Fosfato  
PBT: Buffer Salino Fosfato + Tritón  
PEH: Paraparesia Espástica Hereditaria  
Pi: Fosfato inorgánico  
RE: Retículo Endoplásmico  
RFP: Red Fluorescent Protein  
RNA: Ácido Ribonucleico  
SBMA: Atrofia muscular bulbar y espinal  
*Slh*: Homólogo a *sly-1*  
SNARE: Soluble NSF Attachment Protein  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SOCE: Sotro-operated calcium entry  
Spas: Espastina  
SPG: Spastic Paraplegic Gene  
TDP-43: TAR DNA-binding protein 43  
Tidm: Músculo depresor de la tibia  
Tilm: Músculo elevador de la tibia  
Tirm: Músculo reductor de la tibia  
*Tkv*: Thickveins  
TM: Transmembrana  
Tm6b: Third Multiple 6B  
UAS: Upstream Activating Sequence  
UNM: Unión Neuromuscular  
VDRC: Viena Drosophila Resource Center  
*Wg*: Wingless

## **RESUMEN**

Las paraparesias espásticas hereditarias (PEH) corresponden a un grupo de desórdenes neurodegenerativos que generan debilidad y espasticidad de las extremidades inferiores producto de la degeneración de motoneuronas corticoespinales. Dentro de las PEH se encuentra una forma autosómica dominante pura producida por mutaciones de sentido erróneo en *atlastina-1*, que dan origen a alrededor del 10% de casos de aparición temprana de esta enfermedad.

En larvas de *Drosophila melanogaster* la disminución de la expresión de *atlastina* en motoneuronas causa defectos motores progresivos, similares a los observados durante la progresión de las PEH. En adultos de esta especie se han caracterizado regiones del genoma que actúan como modificadores dominantes asociados al déficit motor dado por estas mutaciones en *atlastina*.

En este trabajo, se estudiaron los efectos de la disminución de la expresión de *atlastina* en la morfología de axones motores y unión neuromuscular (UNM) de extremidades de moscas adultas. Además, se determinó si las regiones modificadoras del fenotipo motor también modifican estas estructuras. Nuestros resultados indican que mutaciones en *atlastina* son suficientes para generar un fenotipo morfológico de axones motores y UNM, los cuales pueden ser rescatados por algunos genes presentes en ciertas regiones del genoma de *Drosophila*. De esta forma, se identificó al *homologo a sly-1 (slh)* como un potencial modificador genético de esta mutación en *atlastina*, cuya disminución de expresión generó un nuevo fenotipo morfológico de las estructuras mencionadas.

Por tanto, en este trabajo identificamos potenciales modificadores de la función de *atlastina* en motoneuronas, lo cuales pueden ser posibles blancos terapéuticos y cuyo estudio podría contribuir a determinar la función molecular de este y otros genes asociados a las PEH.



## **ABSTRACT**

The hereditary spastic paraplegia (HSP) correspond to a group of neurodegenerative disorders that generate weakness and spasticity of the lower limbs, as a result of degeneration of corticospinal motor neurons. Within HSPs exist a pure autosomic dominant form produced by missense mutations in *atlastin-1*, which give rise to about 10% of cases of early onset of this disease.

In *Drosophila melanogaster* larvae, decreased *atlastin* expression in motor neurons causes progressive motor defects, similar to those observed during the progression of HSP. In adults of this specie, it has been characterized regions of the genome that act as dominant modifiers associated to the motor deficit caused by this *atlastin* mutation.

In this work, we studied the effects of a reduced expression of *atlastin* in the morphology of motor axons and neuromuscular junction (NMJ) of adult fly limbs. In addition, we determinated whether the modifying regions of the motor phenotype also modify these structures. Our results indicate that mutations in *atlastin* are enough to generate a morphological phenotype of motor axons and NMJ, which can be rescued by some genes present in certain regions of the *Drosophila* genome. In this way, the *homologous to sly-1 (slh)* was identified as a potential genetic modifier of this mutation in *atlastin*, whose decreased expression generated a new morphological phenotype of the mentioned structures.

Therefore, in this work we identified potential modifiers of *atlastin* function in motor neurons, which may be possible therapeutic targets and whose study could contribute to determinate the molecular function of this and other genes associated with HSP.

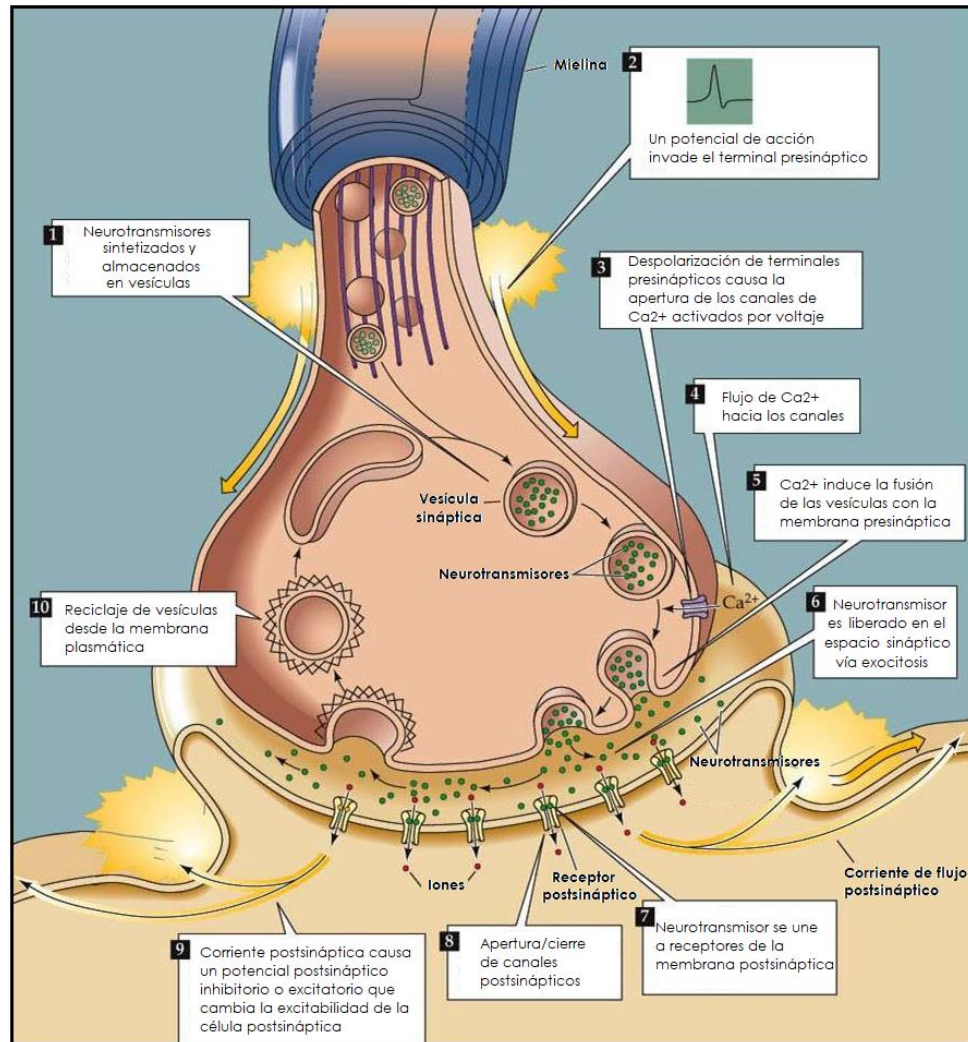
# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Sistema nervioso, sinapsis y enfermedades neurodegenerativas**

El sistema nervioso es una intrincada red interconectada que permite a los organismos interactuar y adaptarse al medioambiente a través de la transferencia de información en forma de impulsos nerviosos, donde la dirección y extensión del sistema, sumado a la mayor complejidad de las neuronas con respecto a otros tipos celulares, son aspectos fundamentales para la funcionalidad del mismo<sup>1</sup>.

La comunicación entre neuronas es mantenida por las sinapsis, que actúan como sitios de comunicación primarios entre ellas, involucrando la presencia de señales bidireccionales entre neuronas pre y postsinápticas.

Las sinapsis se encuentran subdivididas en las formas eléctrica y química, siendo esta última la que finalmente conducirá al desarrollo de estructuras especializadas para la liberación y detección de neurotransmisores<sup>2</sup>. El flujo de información neuronal que ocurre en la sinapsis química inicia en los terminales presinápticos de una neurona, con la liberación de neurotransmisores que son almacenados en compartimentos endosómicos (vesículas sinápticas) y liberados al espacio sináptico desde las respectivas zonas activas, donde son reconocidos por receptores específicos presentes en la membrana de la neurona/músculo postsináptico, induciendo así un cambio en su potencial de membrana<sup>3</sup> (figura 1).



**Figura 1.** Sinapsis química mediada por neurotransmisores en organismos vertebrados, donde se indican cada uno de los pasos que ocurren durante este proceso, comenzando con la síntesis y almacenamiento de los neurotransmisores en las vesículas sinápticas que finalmente serán liberados en el espacio sináptico para inducir un cambio en el potencial de membrana de la neurona o músculo postsináptico. Imagen tomada de Neuroscience, 4<sup>th</sup> edition<sup>4</sup>.

Cada zona activa está constituida por las llamadas “*proteínas de zonas activas*” que dan lugar a la citomatrix de la zona activa (CAZ), formada por un conglomerado de proteínas entre las que se encuentran Bassoon<sup>5</sup>, Munc13<sup>6</sup>, RIM1/2<sup>7</sup>, Piccolo<sup>8</sup> y la familia de proteínas CAST/ELKS/Erc<sup>7</sup>.

Cualquier alteración en el número, tamaño y distribución de las zonas activas presentes en la membrana de los terminales presinápticos, tiene un profundo impacto en cómo la información es procesada en el circuito neuronal y en cómo éste se adapta en respuesta a los diferentes estímulos internos y/o externos, ya que refleja el número de vesículas que se pueden liberar frente a un determinado estímulo<sup>8</sup>.

Debido al papel trófico de las sinapsis y sus zonas activas, que mantiene la capacidad de conexión y la sobrevivencia neuronal, numerosos estudios se han enfocado en los efectos neurodegenerativos que podrían tener los defectos en la función y morfología sináptica<sup>9</sup>. Sin embargo, el pequeño tamaño y la variabilidad intrínseca de las sinapsis del sistema nervioso central limitan el estudio de los defectos en las estructuras presentes en las sinapsis, complicando las investigaciones de este tipo<sup>10</sup>. Para resolver este problema, los investigadores han hecho uso de la unión neuromuscular (UNM), un tipo de sinapsis formada entre una motoneurona y una fibra muscular específica, que cuenta con zonas activas de gran tamaño (~1  $\mu\text{m}$ ) y posee un patrón regular y estereotipado<sup>11</sup>. Esta escasa variabilidad de la UNM permite realizar estudios de envejecimiento y de algunos desórdenes patológicos enfocándose especialmente en sus zonas activas, ya que la densidad de estas estructuras en general disminuye bajo estas situaciones, lo que conlleva una transmisión sináptica débil y la eventual denervación de la UNM<sup>8</sup>.

Las enfermedades neurodegenerativas pueden ser descritas como una condición clínica caracterizada por la pérdida selectiva y progresiva de neuronas, llevando a la aparición de defectos conductuales, físicos y cognitivos de los pacientes<sup>12</sup>. Pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen, si la forma de la enfermedad es hereditaria o no; de acuerdo al tipo de neurona afectada, si afecta a neuronas motoras, dopaminérgicas o gabaérgicas y; de acuerdo a la sintomatología clínica y su patología, donde se dividen en enfermedades afectando el movimiento y demencias<sup>13</sup>.

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan las funciones motoras se conocen comúnmente como enfermedades de las motoneuronas (EMN), caracterizadas por una degeneración progresivamente rápida del sistema motor, y a

pesar de que clínicamente solo están dadas por un deterioro neurológico progresivo, nuevos descubrimientos han indicado una naturaleza heterogénea de estas enfermedades<sup>14</sup>.

Dentro de la amplia gama de EMN existentes, entre las más comunes se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las paraparesias espásticas hereditarias (PEH) y la atrofia muscular espinal (AME)<sup>15</sup>. A diferencia de la mayoría de las EMN, las PEH son un grupo de desórdenes neurodegenerativos que muestran una heterogeneidad clínica relacionada a una notable variabilidad genética, lo que la han convertido en el foco de constantes investigaciones acerca de las bases genéticas que la asocian a otras enfermedades neurodegenerativas<sup>16</sup>.

## **1.2 Paraparesias Espásticas Hereditarias**

Las paraparesias espásticas hereditarias (PEH) corresponden a un grupo de desórdenes neurodegenerativos de carácter heterogéneo con una prevalencia a nivel mundial de entre 3-10 individuos afectados por cada 100.000 y con un inicio de la enfermedad variando desde una niñez temprana hasta incluso los 70 años de edad<sup>17</sup>.

Las PEH constituyen el segundo grupo más importante de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la degeneración de motoneuronas, mostrando como principal síntoma la espasticidad y debilidad progresiva de las extremidades inferiores de los afectados<sup>18</sup>. Esto ocurre como consecuencia de la degeneración de los extremos distales de los axones de las motoneuronas corticoespinales superiores que finalmente resultará en la pérdida de conectividad neuronal con el músculo esquelético<sup>19</sup>.

Las PEH pueden manifestarse en forma pura, si la paraparesia se presenta como único síntoma, o bien, en forma compleja, cuando viene acompañada de otras anomalías neurológicas como retinopatía, neuropatía óptica, sordera, ataxia, demencia, algún grado de retardo mental y epilepsia<sup>20</sup>.

Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo contra los diferentes subtipos de PEH, pero los síntomas pueden ser aminorados mediante el uso de drogas

destinadas a la relajación muscular<sup>21</sup>, inyecciones botulínicas para reducir la espasticidad y terapia física regular que permita mejorar la velocidad de movimiento al caminar y aumentar la fuerza de las extremidades inferiores de los pacientes<sup>22</sup>.

### 1.2.1 Modo de herencia y causas genéticas de las paraparesias espásticas hereditarias

Las PEH pueden mostrar un patrón de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al cromosoma X, a los cuales se han asociado molecularmente mutaciones en más de 40 genes, haciendo de las PEH un grupo de desórdenes neurodegenerativos genéticamente heterogéneo<sup>23</sup> (tabla 1).

Gen	Proteína	Fenotipo	Función biológica
<b>Relacionados al tráfico de membrana</b>			
SPG3A	Atlastina-1	AD pura	Morfogénesis del RE, señalización BMP
SPG4	Espastina	AD pura	Morfogénesis del RE, tráfico endosomal, señalización BMP, citocinesis, regulación del citoesqueleto
SPG6	NIPA1	AD pura	Tráfico endosomal, señalización BMP
SPG8	Estrumpelina	AD pura	Morfogénesis endosomal, regulación del citoesqueleto
SPG10	KIF5A	AD compleja	Proteína motora de microtúbulos
SPG11	Espatacsina	AD compleja	¿Tráfico de membrana?
SPG15	Espasticina	AD compleja	¿Tráfico de membrana?, citocinesis
SPG17	Seipina	AD compleja	Proteína de membrana de RE, biogénesis de gotas lipídicas
SPG20	Espartina	AD compleja	Tráfico endosomal, señalización BMP, biogénesis de gotas lipídicas, ¿mitocondrial?
SPG21	Masparcina	AD compleja	Tráfico endosomal
SPG31	REEP1	AD pura	Morfogénesis del RE
<b>Mitocondrial</b>			
SPG13	HSP60	AD pura	Chaperona mitocondrial
SPG7	Paraplegina	AR compleja	Proteasa mitocondrial
<b>Mielinización</b>			
SPG2	PLP	RLX compleja	Proteína de mielina

SPG35	2-Hidroxilasa de ácidos grasos	AR compleja	Hidrolización de lípidos de mielina
<b>Misceláneos</b>			
SPG1	L1CAM	RLX compleja	Adhesión celular y señalización
SPG5	CYP7B1	AR pura	Metabolismo de colesterol
SPG39	Esterasa blanco de neuropatía	AR compleja	Homeostasis de fosfolípidos, blanco de organofosfatos
SPG42	SLC33A1	AD pura	Transportador Acetil-CoA
SPG48	KIAA0415	AR compleja	Reparación de DNA

**Tabla 1.** Genes conocidos como causantes de PEH divididos en grupos funcionales. Además del símbolo o loci de cada gen, se indican la proteína que codifican, el fenotipo producido y la función biológica de cada uno de ellos. AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; RLX: recesiva ligada al cromosoma X<sup>23</sup>.

Existen varias hipótesis conducentes a explicar la disfunción neuronal presente en las PEH producto de las mutaciones que afectan a gran parte de los genes que codifican proteínas localizadas en el retículo endoplásmico (RE), sin embargo, el mecanismo preciso por el cual las alteraciones de este organelo conducen a la aparición de esta enfermedad es poco claro<sup>23</sup>. En este sentido, se han planteado como posibles causas a la regulación espacial de los túbulos del RE y la desregulación de calcio en la sinapsis, aunque el rol de proteínas no limitadas únicamente al RE mantiene las dudas con respecto al funcionamiento neuronal anormal común en esta enfermedad<sup>24</sup>.

Por estas razones, existe un gran desafío en determinar el grado de participación de cada una de las vías involucradas en las PEH, dado que los genes causantes de esta enfermedad tienen múltiples funciones y participan en más de una vía, los que además pueden ser intrínsecos a las motoneuronas o ser expresados en neuronas vecinas y tener efectos sobre las primeras, complicando aún más entender los mecanismos involucrados<sup>17</sup> (figura 2).

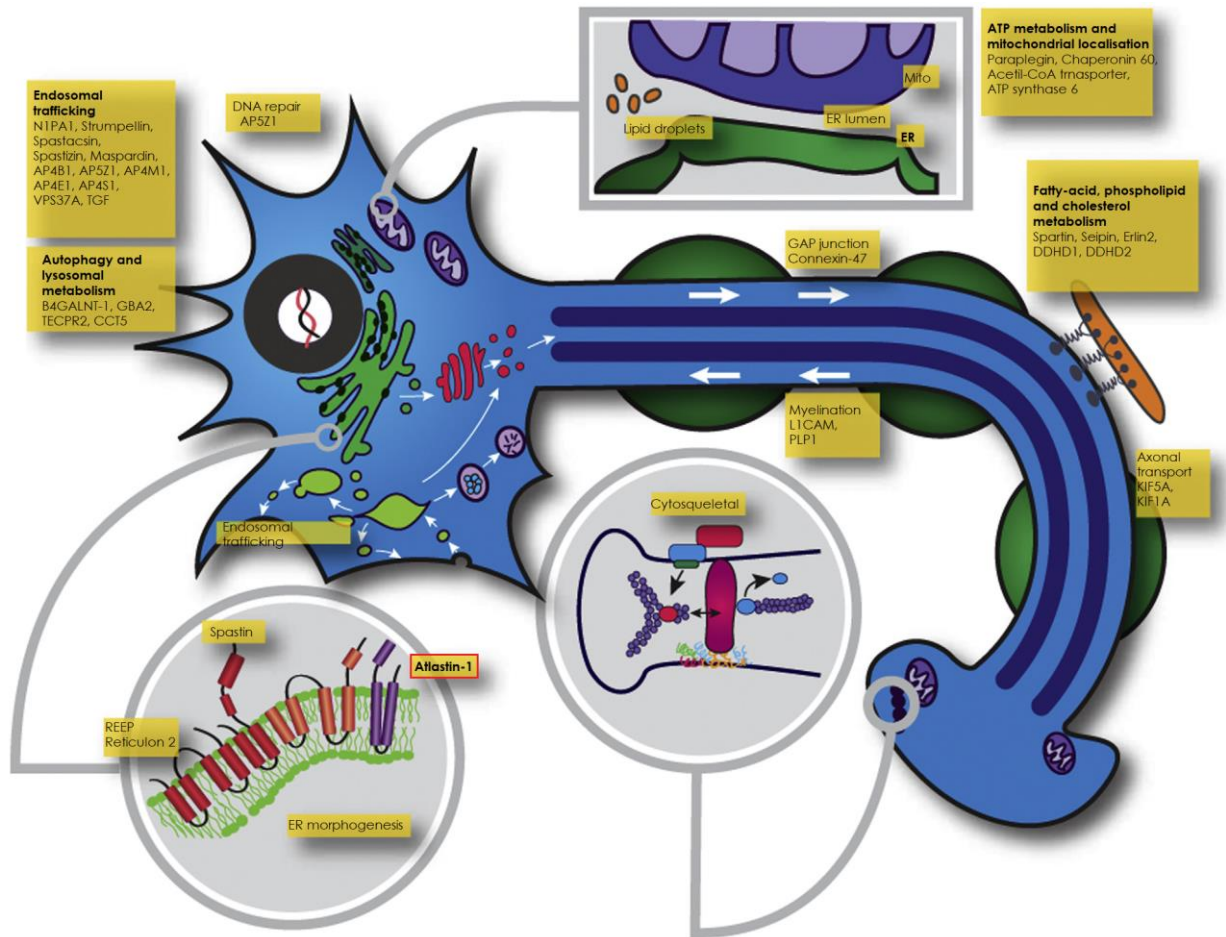


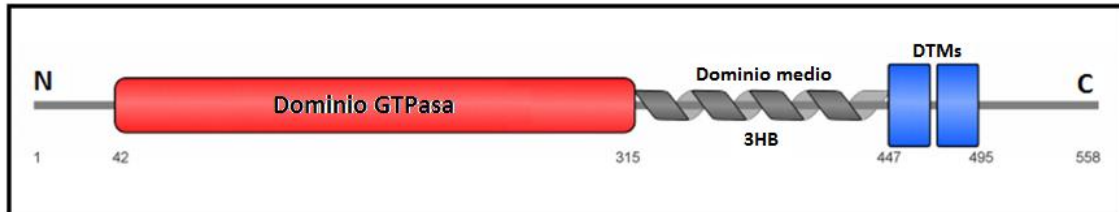
Figura 2. Esquema de los posibles mecanismos patogénicos involucrados en las PEH, ejemplificando una motoneurona con la localización de los diferentes genes involucrados en la generación de esta enfermedad<sup>17</sup>.

### 1.2.2 *Atlastina*: características, función y su relación con las paraparesias espásticas hereditarias

Entre los diferentes genes causantes de PEH se encuentra *atlastina* (ATL), una proteína integral de membrana perteneciente a la superfamilia de dinaminas de grandes GTPasas en células eucariontes, donde media la fusión homotípica de membranas del RE, proceso fundamental para la formación de la red tubular del mismo<sup>25</sup>.



Estructuralmente, esta familia de proteínas posee en su dominio citosólico, un fragmento N-terminal corto, seguido por un dominio GTPasa catalítico bien conservado y un dominio medio (3HB) que es fundamental para su dimerización, luego dos dominios transmembrana (TM) dispuestos en tándem por el cual se unen a la membrana del RE, para terminar con un fragmento C-terminal (figura 3), también citosólico<sup>26</sup>.



**Figura 3.** Esquema de los diferentes dominios de la proteína ATL-1 de humano. GTPasa: dominio GTPasa catalítico. 3HB: dominio de tres hélices. DTMs: dominios transmembrana. CT: extremo C-terminal<sup>26</sup>.

ATL fue identificada por primera vez como el producto del gen mutante SPG3A en humanos<sup>24</sup>. En vertebrados existen tres miembros pertenecientes a la subfamilia de atlastina: *ATL-1*, *ATL-2* y *ATL-3*, que se encuentran presentes en diferentes tejidos, con una alta expresión de *ATL-1* en el sistema nervioso central y bajos niveles en tejidos no neuronales, a diferencia de *ATL-2* y *ATL-3* que muestran una elevada expresión en estos últimos<sup>27</sup>. ATL también está presente en otras especies como *Arabidopsis thaliana* y *Saccharomyces cerevisiae*, donde su único miembro fue denominado como *RHD3* y *Sey1p*, respectivamente<sup>23</sup>.

A nivel subcelular, *ATL-1* se localiza predominantemente en el cis-Golgi y, en menor medida, en el RE<sup>28</sup>, mientras que *ATL-2* y *ATL-3* solo se encuentran en el RE y complejos vesiculares-tubulares<sup>27</sup>.

Existen una serie de estudios de localización de ATL que han apuntado a su asociación con el RE, Golgi, dinamina y neuritas, aportando evidencia de que podría estar involucrada en el tráfico y procesamiento de proteínas que ocurre entre el Golgi y el RE<sup>29</sup>.

En la fusión homotípica de las membranas del RE (figura 4), las moléculas de ATL pueden estar situadas en la misma membrana o en membranas diferentes, ejerciendo una interacción *cis* o *trans*, respectivamente, aunque solo esta última permite el anclaje y fusión de membranas opuestas. Este mecanismo comienza cuando un monómero de ATL se une a GTP (paso 1), luego de lo cual los monómeros forman rápidamente un dímero (pasos 2 y 3). Posteriormente, con la hidrólisis del GTP, los dímeros de ATL pasan a un estado de transición (paso 4) en el que adoptan una alta afinidad debido a una fuerte interacción entre los dominios 3HB. Por último, con la liberación de GDP y Pi, producto de la hidrólisis del GTP, ocurre la disociación de los dímeros de ATL en monómeros (pasos 5 y 6). Sin embargo, para completar un evento de fusión exitoso, se requieren de múltiples ciclos de acción de ATL, dado que la rápida hidrólisis de GTP hace del dímero un estado transitorio, por lo que esta GTPasa vuelve rápidamente a su forma monomérica antes de que la fusión de las membranas haya ocurrido por completo (paso 7)<sup>25</sup>.

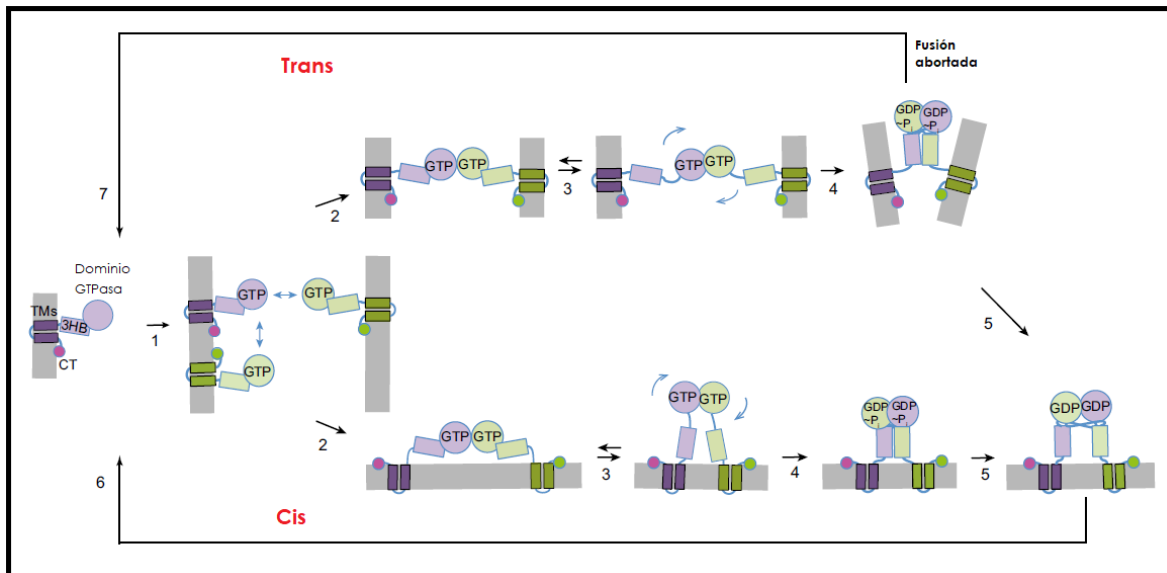


Figura 4. Modelo de fusión homotípica de membranas del RE mediado por atlasina. En la parte inferior se muestra la interacción de tipo *cis* que ocurre entre dos ATL situadas en la misma membrana del RE, mientras que en la parte superior se muestra la interacción de tipo *trans* que ocurre entre dos ATL situadas en membranas diferentes. Los números indican cada uno de los pasos que se propone que ocurran durante la de fusión<sup>25</sup>.

En humanos, *ATL-1* puede ser afectada por más de 30 mutaciones, generalmente de sentido erróneo<sup>27</sup> (figura 5), que dan origen a la aparición de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como la neuropatía sensorial hereditaria tipo I (NSH1)<sup>30</sup> y un tipo de paraparesia espástica hereditaria (PEH)<sup>20</sup>. Sin embargo, casi la totalidad de estas mutaciones se asocian a la PEH autosómica dominante pura, lo que hacen que *ATL-1* represente aproximadamente el 10% de las PEH<sup>19</sup>. Esto la convierten en la segunda causa más común de esta enfermedad, después de espastina, y en la principal causa de su origen temprano<sup>27</sup>.

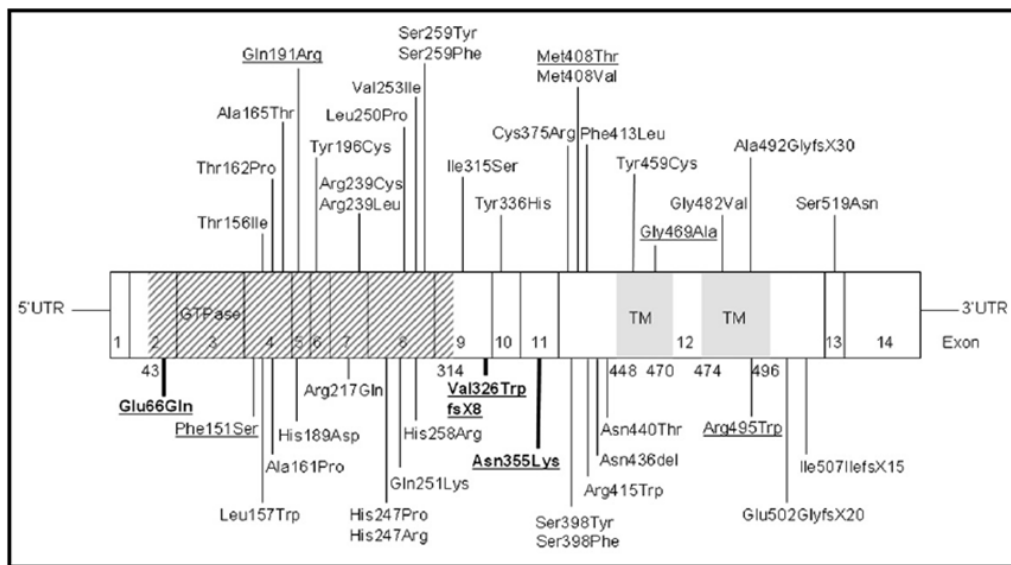


Figura 5. Esquema de mutaciones de sentido erróneo conocidas en *ATL-1*. Las mutaciones subrayadas están asociadas a la neuropatía sensorial hereditaria tipo I (NSH1), mientras que el resto de las mutaciones están asociadas a PEH autosómica dominante. Los números de 1-14 representan los exones<sup>31</sup>.

Desde un punto de vista estructural, gran parte de las mutaciones que afectan a atlastina están situadas en la cola N-terminal, donde se encuentra el dominio GTPasa, ejerciendo efectos patogénicos a través de la introducción de una estructura secundaria aberrante que afecta la multimerización de atlastina o sus interacciones moleculares con otras proteínas, lo cual podría explicar su característica dominante<sup>31</sup>.

Por otro lado, un estudio realizado por Li y colaboradores (2017)<sup>32</sup> identificó un rol clave de *ATL-1* en el crecimiento de neuritas inducido por el factor de crecimiento

nervioso (NGF) en células PC-12 transfectadas con *ATL1-Myc*. Tanto la sobreexpresión de *ATL-1* como la mutación de sentido erróneo K80A que afecta a su dominio GTPasa suprimió este mecanismo en una forma dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RE (SOCE), dado que este tipo de transporte de calcio depende de los puntos de unión entre el RE y la membrana plasmática, que inevitablemente se ven afectados por el cambio conformacional en la morfología del RE inducido por mutaciones en *ATL-1*.

Sumado a esto, Namekawa y colaboradores (2007)<sup>28</sup> demostraron, mediante ensayos de inmuprecipitación, la relación de atlastina y el aparato de Golgi en enfermedades neurodegenerativas. Mutaciones en atlastina causan deficiencias en la morfología de este organelo y en el mecanismo de gemación de vesículas, aportando evidencia de que atlastina también podría interactuar o interferir con el sistema Golgi-RE de las neuronas, regulando el tráfico intracelular, que finalmente se podría traducir en una pérdida de la mantención del crecimiento y desarrollo axonal<sup>33</sup>.

### **1.2.3 *Atlastina* en *Drosophila melanogaster*: un modelo de estudio de las paraparesias espásticas hereditarias**

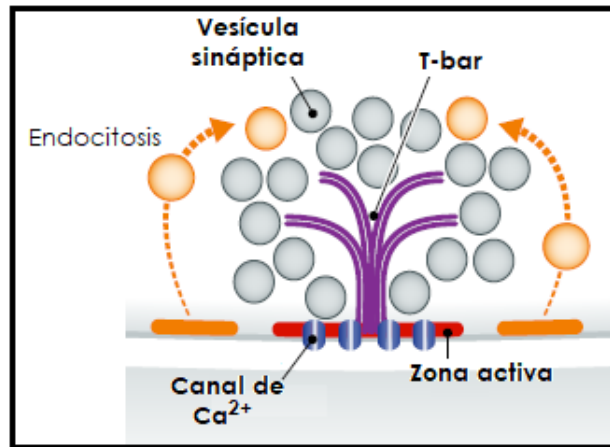
En la actualidad, existe una gran variedad de modelos disponibles para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en las PEH, con modelos vertebrados murinos, por ejemplo, *knockout* para genes como *espastina* y *paraplegina*<sup>34</sup>. Estos modelos recrean la enfermedad al manifestar defectos en actividades locomotoras de forma dependiente de la edad, observándose en los nervios de cada uno de estos ratones la acumulación de organelos membranosos y proteínas del citoesqueleto en los axones de las motoneuronas<sup>35</sup>, sumado a defectos en el transporte axonal anterógrado y retrógrado y al aumento del diámetro axonal correlacionado a eventos tempranos de neurodegeneración<sup>36</sup>.

Sin embargo, debido a su fácil manipulación y bajo costo, los modelos invertebrados para el estudio de este tipo de enfermedades han surgido como alternativa, donde la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* ha sido objeto de

estudio esencial para identificar algunos de los mecanismos biológicos de las PEH<sup>37</sup>. Este insecto holometábolo otorga un sin número de ventajas para el modelamiento de mecanismos celulares y moleculares subyacentes a algunas enfermedades humanas, dado que alrededor de un 75% de los genes causantes de enfermedades poseen un ortólogo en moscas y muchos de los principios biológicos, fisiológicos y neurológicos se encuentran conservados entre mamíferos y esta especie<sup>38</sup>.

Además de las características ya mencionadas, otras ventajas de la mosca del vinagre se dan con su corto ciclo de vida, el gran número de descendencia obtenido en una generación, su bajo costo de mantención en condiciones de laboratorio, un sistema nervioso y comportamiento conductual bien estudiados y caracterizados, y las diferentes herramientas genéticas disponibles que permiten expresar o silenciar prácticamente cualquier gen en un tejido o grupo de células deseado<sup>37</sup>. Esto último resulta fundamental para el estudio de enfermedades afectando el sistema nervioso, ya que permite estudiar genes de forma autónoma en un tejido o tipo celular determinado, permitiendo enfocarse específicamente a los circuitos neuronales mucho más simples y accesibles que este insecto posee, situación de gran importancia para estudios en biomedicina<sup>13</sup>.

Por otro lado, a diferencia de las sinapsis de vertebrados, la UNM de *Drosophila* es un modelo más simple para el estudio del desarrollo y función de esta estructura, donde las zonas activas presentes en la UNM son llamadas “T-bars”, dada su morfología similar a una malla de filamentos dispuesta sobre un pedestal<sup>2</sup> (figura 6). Al igual que en vertebrados, la UNM de *Drosophila* cuenta con un conglomerado de proteínas, entre las que se encuentran RIM y Dunc13, que promueven el acoplamiento de vesículas sinápticas<sup>39</sup>; RBP, involucrada en la formación de clústers de canales de calcio<sup>40</sup>; un ortólogo de Piccolo de mamífero (Fife), involucrada en la organización de la zona activa<sup>39</sup> y el único miembro de la familia de proteínas CAST/ELKS/Erc en *Drosophila*, Bruchpilot (Brp), principal componente de las T-bars y responsable de la formación de clústers de canales de calcio bajo estas estructuras en el centro de cada zona activa<sup>41</sup>.



**Figura 6.** Esquema mostrando la composición general de una zona activa, con la estructura de una T-bar común en *Drosophila melanogaster*. Las zonas activas y endocíticas son marcadas en rojo y naranja, respectivamente<sup>11</sup>.

Otra importante ventaja de este modelo para el estudio de este tipo de enfermedades se da con la oportunidad que confiere el realizar rastreos genéticos de forma rápida y eficiente, facilitando la identificación de potenciales modificadores genéticos que puedan contribuir de forma positiva o negativa al desarrollo de una enfermedad. Estos modificadores genéticos pueden actuar bajo un modelo “monogénico” y exhibir fuertes efectos sobre la variabilidad de la expresión de la enfermedad o, bien, como modificadores genéticos de carácter “multifactorial” y contribuir a potenciar los efectos neurodegenerativos de la enfermedad, siendo incapaces de generar un fenotipo dado por si solos, pero cooperando con el gen causante de la degeneración<sup>42</sup>.

En el caso de *atlastina*, un gen causante de PEH, el año 2008 se caracterizó un ortólogo en *Drosophila* que ha aportado valiosa información para la comprensión de la función de esta proteína *in vivo*<sup>20</sup>. Este único ortólogo reside predominantemente en el RE<sup>43</sup> y se localiza en el cromosoma 3 de la mosca, con alrededor de un 68% de similitud y un 51% de identidad con respecto a *ATL-1* de humanos<sup>20</sup> (figura 7).

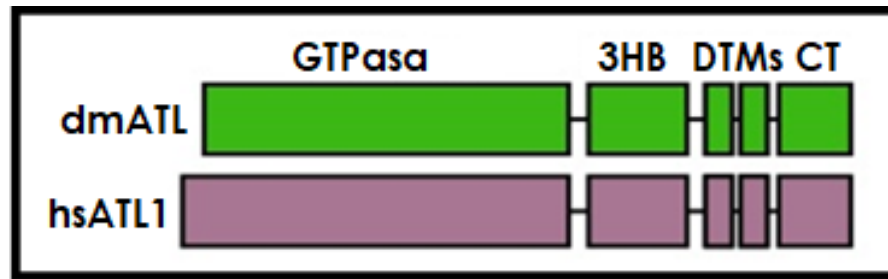


Figura 7. Esquema representativo que muestra la comparación entre las atlastinas de humano y *D. melanogaster*<sup>20</sup>.

La eliminación de esta proteína en *Drosophila*, al igual que en otras especies como pez cebra, conduce a defectos neuronales<sup>44</sup>, situación que en humanos provoca defectos en la ramificación del RE a nivel celular y la aparición temprana de PEH<sup>45</sup>.

Una serie de estudios han ubicado a atlastina predominantemente en el sistema nervioso central y somático de *D. melanogaster*<sup>46</sup>. Además, estudios *in vivo* han demostrado que la pérdida de esta proteína también causa la fragmentación del RE y su sobreexpresión induciría la hiperfusión de los túbulos del mismo organelo<sup>43</sup>.

Cuando la atlastina de *Drosophila* es purificada y reconstituida puede fusionar vesículas *in vitro*<sup>43</sup> y, la depleción o sobreexpresión de una forma dominante negativa de *atl*, induciría una deficiencia en la fusión de las membranas del RE dada la presencia de túbulos no ramificados de este organelo bajo esta situación<sup>26</sup>.

Otros estudios sugieren que atlastina puede tener un rol fundamental en la formación de sinapsis, ya que en larvas mutantes nulas para el homólogo de *ATL-1*, se tienden a formar grupos de botones sinápticos con aglomeración de botones satélites, además de una red de microtúbulos más densa<sup>47</sup>.

Estudios de locomoción en larvas de tercer estadio, determinaron que tanto la velocidad como la frecuencia de contracción disminuyeron significativamente en larvas mostrando una disminución de la expresión o una sobreexpresión de *atl*. Además, alrededor del 60% de las larvas con disminución de la expresión de este gen mostraron un fenotipo tail-flip característico de defectos en el transporte axonal y disminución de la expresión de la proteína motora kinesina<sup>16</sup>.

De esta forma, el sistema nervioso de las larvas de *Drosophila* se ha convertido en un modelo invaluable para la investigación del programa genético subyacente al desarrollo y función neuronal, dadas sus ventajas para acceder fácilmente a sus componentes neuronales<sup>2</sup> y a las herramientas genéticas disponibles en esta especie, que permiten a los investigadores identificar los mecanismos claves para el desarrollo neuronal, incluyendo mecanismos de especificación neuronal, guía axonal, formación de dendritas y sinaptogénesis<sup>41</sup>.

Sin embargo, a pesar de todas estas características, el hecho de ser insectos holometábolos hace que se presenten muchas diferencias en la organización y funcionamiento del sistema nervioso entre las etapas de larva y adulto<sup>2</sup>, dada la existencia de una fase de metamorfosis entre ambas etapas, donde la preparación sináptica más utilizada, la UNM, solo puede ser empleada por un período de 3 a 4 días de vida larval, lo cual limita su uso para analizar cambios y/o enfermedades dependientes del envejecimiento en las motoneuronas<sup>48</sup>, sumado a los problemas en la interpretación de los diferentes fenotipos neurodegenerativos debido al crecimiento acelerado que muestran los axones y UNM en esta etapa de vida de la mosca<sup>48</sup>.

Por tal motivo, se han generado recientemente investigaciones orientadas al estudio de procesos neurodegenerativos usando adultos de *Drosophila* como modelo de análisis, enfocándose principalmente en los efectos de la neurodegeneración sobre los diferentes tipos celulares que constituyen el cerebro de moscas adultas<sup>49</sup>, las sinapsis o UNMs presentes en los músculos indirectos de vuelo situados en el tórax<sup>50</sup> y, en menor medida, en la capacidad motora de los adultos mediante el análisis de los diferentes músculos y axones presentes en las extremidades de las moscas<sup>48,51</sup>. Como ejemplo de esto último, actualmente, existe una única publicación disponible acerca de estudios de neurodegeneración en las extremidades de adultos de *Drosophila*<sup>48</sup>, analizando específicamente los efectos de TDP-43, una proteína involucrada en el procesamiento de RNA y sindicada como central para la patogénesis de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), sobre axones motores y sinapsis neuromuscular, donde la disminución de la expresión de este gen demostró alterar el fenotipo morfológico de estas estructuras de forma dependiente de la edad.



Además del estudio de la sinapsis neuromuscular, en nuestro laboratorio también se ha determinado que moscas adultas con disminución de la expresión de *atf* en motoneuronas pierden progresivamente su capacidad de escalar, situación que en larvas de esta especie produce defectos morfológicos y fisiológicos en los botones de la UNM, con un mayor número de botones sinápticos y satélites, sumado a la formación de clústers de los mismos. El protocolo de escala empleado en los estudios mencionados se muestra en la sección anexos (anexo 1).

Sumado a esto, mediante un rastreo genético en el cromosoma 2 de adultos de *Drosophila*, hemos identificado regiones genómicas que modifican predominantemente la expresión de este fenotipo motor, actuando como potenciales modificadores genéticos asociados a la disminución de la expresión de *atf*. De manera interesante, dentro de estas regiones analizadas e identificadas como candidatas se encuentran algunos genes involucrados en el tráfico de vesículas, tales como el *homólogo a sly-1 (slh)*, la cual es una proteína requerida para la fusión de vesículas en humanos y es conocida por interactuar con proteínas SNARE específicas de RE como las sintaxinas 17 y 18<sup>52</sup>.

Por tanto, y en base a estos antecedentes, en este trabajo se evaluó el uso de axones y sinapsis neuromuscular de las extremidades de adultos de *Drosophila melanogaster* para el estudio *in vivo* de fenotipos neurodegenerativos asociados a la disminución de la expresión de *atf* en motoneuronas, ya que, a diferencia de la larva, este modelo nos permite evaluar de forma más adecuada los procesos neurodegenerativos asociados a defectos en la expresión de este gen a lo largo del tiempo. Además, el análisis del comportamiento y relación de *atf* con otros genes presentes en las regiones genómicas del cromosoma 2 estudiadas anteriormente en nuestro laboratorio<sup>53</sup>, nos permitió identificar al *homólogo a sly-1 (slh)*, como potencial modificador del fenotipo motor asociado a esta disminución de la expresión de *atf*, que podría ser utilizado como potencial blanco farmacológico destinado al tratamiento de los efectos de las PEH en humanos.

## **2. HIPÓTESIS**

Los defectos motores que presentan las moscas adultas con expresión disminuida de *atlastina* en motoneuronas están asociados a defectos morfológicos de la unión neuromuscular y/o de los axones de las motoneuronas, los que a su vez son alterados por los modificadores genéticos de *atlastina*.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los efectos de la disminución de la expresión de *atlastina* y de sus potenciales modificadores genéticos en la morfología de los axones y la unión neuromuscular de las extremidades de adultos de *Drosophila melanogaster*.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1 Determinar los efectos de la disminución de la expresión de *atlastina* en la morfología de los axones motores y de la unión neuromuscular de las extremidades de *Drosophila* durante la vida adulta.

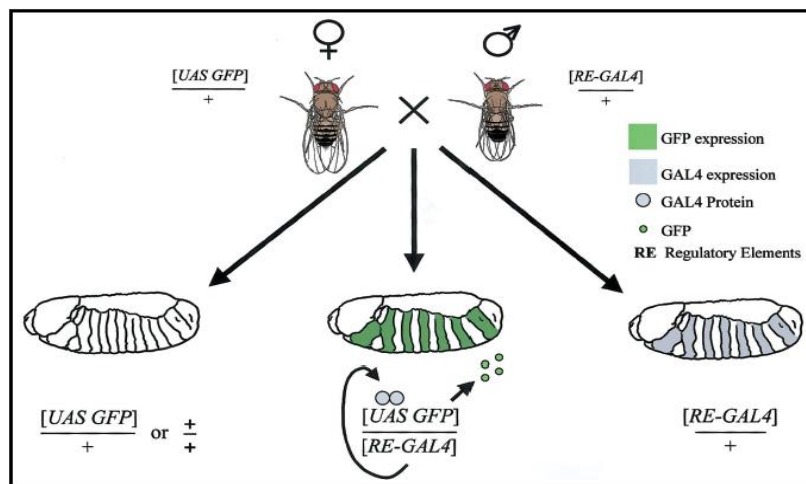
3.2.2 Determinar si los segmentos cromosómicos modificadores del fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atlastina* alteran también sus fenotipos morfológicos.

3.2.3 Determinar los efectos de la disminución de la expresión de los genes candidatos incluidos en las regiones modificadoras de *atlastina* en el fenotipo locomotor y en el desarrollo y mantención de la morfología de los axones motores y la unión neuromuscular.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sistema de expresión GAL4-UAS

Para el diseño de las moscas empleadas en este trabajo, se utilizó el sistema GAL4-UAS<sup>54</sup>, el cual consiste en la expresión de un gen de interés mediante la presencia del factor de transcripción proveniente de la levadura, GAL4, el cual se une a regiones específicas del DNA denominadas UAS (upstream activating sequence). Así, cuando las moscas con el gen de interés situado río abajo de la secuencia UAS fueron apareadas con moscas llevando el driver GAL4, dirigido a motoneuronas, se generó un porcentaje determinado de la progenie llevando ambos elementos del sistema, lo que nos permitió activar la expresión del gen de interés junto a la secuencia UAS solamente en motoneuronas dadas por el driver GAL4 (figura 8).



**Figura 8.** Esquema del sistema GAL4-UAS. Cuando hembras de *Drosophila* llevando una secuencia UAS son apareadas con machos llevando el driver GAL4, se produce una progenie llevando ambos elementos del sistema, las cuales serán capaces de expresar el gen de respuesta a la secuencia UAS (GFP) en una forma característica dada por el driver GAL4<sup>55</sup>.

## 4.2 Cepas de moscas

Las moscas usadas en este estudio fueron mantenidas en tubos con un medio fresco compuesto por agar, harina, azúcar, levadura, nipagin y ácido propiónico disueltos en agua, los que además fueron almacenados a diferentes temperaturas (18°C, 25°C, 29°C) de acuerdo a los requerimientos de cada experimento.

De esta forma, y en base a cada objetivo planteado, las cepas de moscas utilizadas y sus respectivas características se muestran en la siguiente tabla (tabla 2) (los stocks de moscas utilizados, sus códigos de referencia y los cruces pertinentes para la obtención de cada una de ellas son mostrados en la sección anexos como anexos 2, 3 y 4).

OBJETIVO 1	
Cepa mosca	Característica
C380-Gal4; UAS-mCD8-GFP	Expresa la proteína de membrana mCD8-GFP en motoneuronas mediante el driver C380-GAL4. Usadas como control de motoneuronas
C380-Gal4; UAS-dsRNA <i>atf</i> / UAS-mCD8-GFP	Expresa un RNA de doble hebra que tiene como blanco a atlastina, específicamente en motoneuronas mediante el uso del driver C380-GAL4, cuyas membranas además se encuentran marcadas con mCD8-GFP
C380-Gal4 / x; MHC-GFP / 3	Moscas portando el driver de motoneuronas C380-GAL4 sumado a la expresión de GFP bajo el control de MHC. Usadas como control muscular.
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atf</i> / 2; MHC-GFP / 3	Expresa un RNA de doble hebra que tiene como blanco a atlastina en motoneuronas usando el driver C380-GAL4. Además, expresa GFP bajo el control de MHC para observar los efectos de la disminución de la expresión de <i>atf</i> en motoneuronas sobre los músculos
OBJETIVO 2	
Cepa mosca	Característica
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atf</i> / 2; UAS-mCD8-RFP / 3	Moscas portando un RNA de doble hebra que tiene como blanco a atlastina, dirigido a motoneuronas con el driver C380-GAL4, cuyos axones están marcados con la proteína de membrana mCD8-RFP
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atf</i> / Df(2L); UAS-mCD8-RFP / 3	Moscas portando un RNA de doble hebra para atlastina, sumado a cada una de las deficiencias candidatas del brazo L del cromosoma 2 (7783, 7840, 9704 y 23156), cuyos axones motores están marcados con la proteína de membrana mCD8-RFP

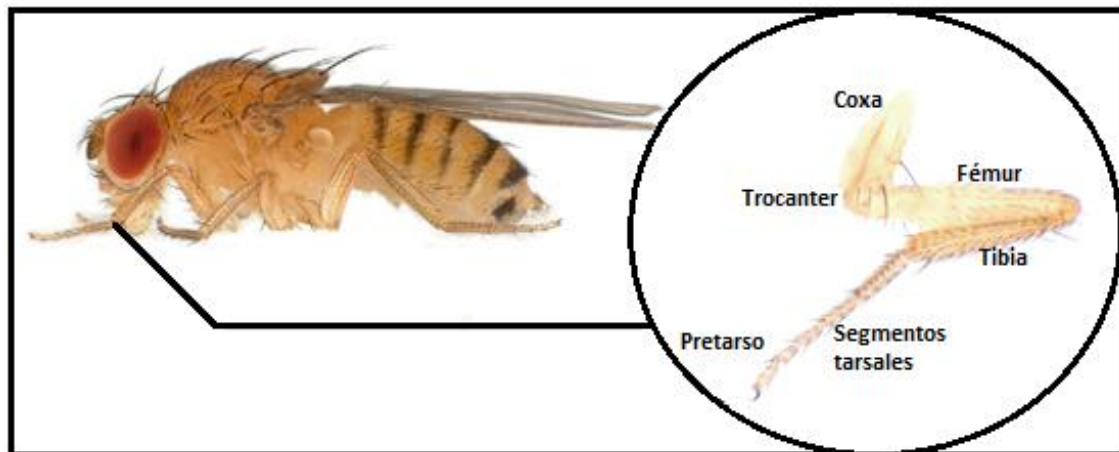
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atl</i> / 2; MHC-GFP / 3	Portan un RNA de doble hebra que tiene como blanco a atlastina en motoneuronas mediante el uso del driver C380-GAL4, sumado a la expresión de GFP bajo el control de MHC
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atl</i> / Df(2L); MHC-GFP / 3	Expresan un RNA de doble hebra que tiene como blanco a atlastina en motoneuronas usando el driver C380-GAL4 y, además, portan cada una de las deficiencias del brazo L del cromosoma 2. También, expresan GFP bajo el control de MHC para observar los efectos de la disminución de la expresión de <i>atl</i> y de la eliminación de las regiones candidatas en el genoma en motoneuronas sobre los músculos
<b>OBJETIVO 3</b>	
<b>Cepa mosca</b>	<b>Característica</b>
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atl</i> / 2; UAS-mCD8-RFP / 3	Expresan un RNA de doble hebra que tiene como blanco a atlastina dirigido a motoneuronas con el driver C380-GAL4, cuyos axones están marcados con la proteína de membrana mCD8-RFP
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atl</i> / UAS-dsRNA <i>slh</i> ; UAS-mCD8-RFP / 3	Expresan RNAs de doble hebra que tienen como blanco a atlastina y a los genes candidatos presentes en la región de la deficiencia 7783 mencionada en el objetivo 2 (en este caso el gen <i>slh</i> , también conocido como homólogo a <i>sly-1</i> en <i>Drosophila</i> ), que además están dirigidos a motoneuronas con el driver C380-GAL4, cuyos axones están marcados con la proteína de membrana mCD8-RFP
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atl</i> / 2; MHC-GFP / 3	Portan un RNA de doble hebra que tiene como blanco a un gen candidato, presente en la región eliminada por las deficiencias mencionadas en el objetivo 2, que además está dirigido a motoneuronas con el driver C380-GAL4, sumado a la expresión de GFP bajo el control de MHC. Usadas como control muscular
C380-Gal4 / x; UAS-dsRNA <i>atl</i> / UAS-dsRNA <i>slh</i> ; MHC-GFP / 3	Expresan RNAs de doble hebra que tienen como blanco a atlastina y al gen candidato <i>slh</i> , dirigidos a motoneuronas usando el driver C380-GAL4. Además, expresa GFP bajo el control de MHC para observar los efectos de la disminución de la expresión de <i>atl</i> y del gen de interés en motoneuronas sobre los músculos

**Tabla 2.** Tabla con las diferentes cepas de moscas diseñadas para el desarrollo de este estudio. Se indican el genotipo y la respectiva característica de cada cepa.

### 4.3 Disección de extremidades de adultos de *Drosophila*

Para poder examinar las extremidades de las diferentes cepas de moscas diseñadas e indicadas en el punto 4.2, se procedió a anestesiarlas, luego de lo cual fueron dispuestas por alrededor de 30 minutos en hielo para después cortar rápida y cuidadosamente sus extremidades a la altura de la articulación que une el fémur con el trocánter y usarlas para los respectivos ensayos de inmunofluorescencia. Esto se realizó con moscas de 5, 10 y 15 días de edad.

Las diferentes secciones que componen la extremidad de una mosca adulta se muestran en la figura 9, donde se destaca la extremidad correspondiente al primer par de patas de la mosca, conocidas como extremidades protorácicas. En este caso, se decidió utilizar el primer par de patas debido a que antecedentes previos han demostrado que el patrón de las fibras musculares es relativamente invariable entre todas las extremidades<sup>56</sup>, sumado al hecho de que en los distintos análisis realizados por nosotros no se observaron diferencias significativas entre los tres pares de extremidades usadas, por lo que finalmente optamos por usar el par mencionado. De ahora en adelante solo nos referiremos al primer par de patas usado en esta tesis como extremidad en general.



**Figura 9.** Esquema de adulto de *Drosophila melanogaster* indicando las diferentes secciones en las que se encuentra dividida la extremidad de la mosca<sup>57</sup>.

#### **4.4 Inmunofluorescencia**

Para el ensayo de inmunofluorescencia, las extremidades de las moscas disectadas anteriormente fueron mantenidas en pocillos con PBS 1X frío.

Luego, estas fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% en PBT (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1M a Ph: 7.5; TritónX-100 0.3%) durante 20 minutos, después se lavaron 3 veces con PBT por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino) por 20 minutos, luego de lo cual se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios respectivos: anti-GFP rabbit de Invitrogen (1:1000) y anti-BRP/nc82 mouse de DSHB (1:200) para marcar axones y zonas activas de la UNM, respectivamente. En algunos casos también se utilizó anti-GFP para marcar las fibras musculares de las extremidades.

Por último, se volvieron a lavar las muestras 3 veces con PBT (por 15 minutos c/u) y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo (AlexaFluor 488 y rodamina redX) durante 3 horas, para nuevamente lavar las muestras 3 veces con PBT e incubarlas con glicerol durante al menos 1 hora.

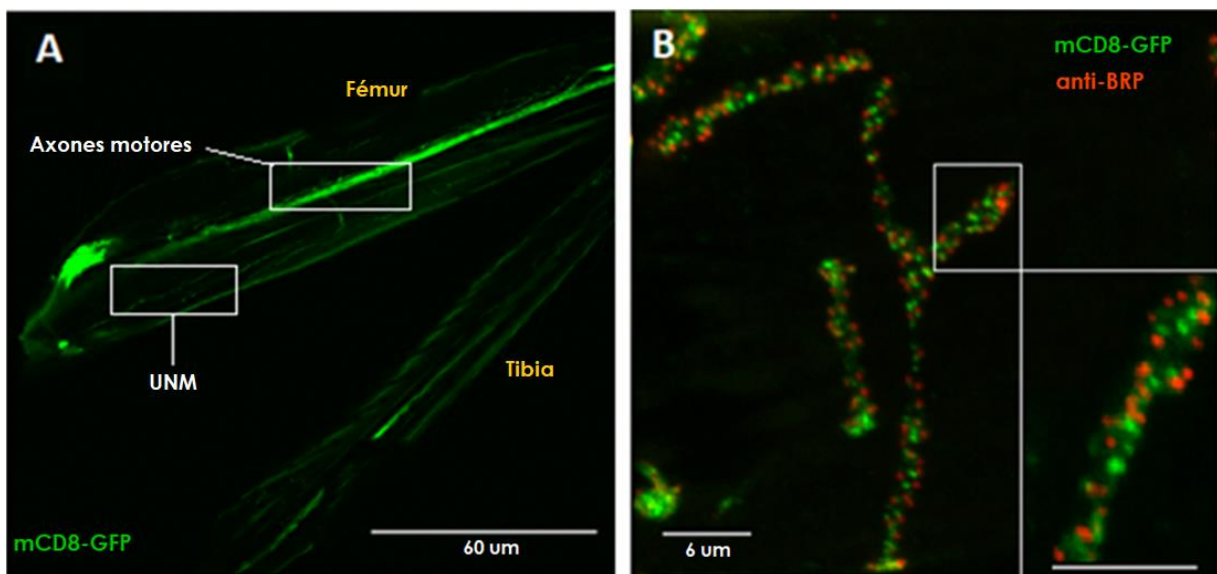
Las muestras (extremidades) fueron montadas utilizando el medio de montaje comercial Vectashield (Vectorlabs).

#### **4.5 Evaluación morfológica de axones y unión neuromuscular**

Para examinar los axones y UNM de las extremidades de moscas adultas, nos basamos en el protocolo de Sreedharan *et al.* (2015)<sup>48</sup>, para lo cual se tomaron al menos 6 moscas de cada genotipo de interés, captando las imágenes de las extremidades en un microscopio invertido confocal Olympus FV1000. En el caso de los axones, se consideraron aquellos situados en la zona media del fémur, mientras que las uniones neuromusculares evaluadas correspondieron a las situadas en la zona proximal del mismo. La morfología de los axones y UNM se evaluaron considerando factores como la pérdida de integridad de membrana, el calibre de los axones y la densidad y tamaño de zonas activas en la UNM. Para esto último, se consideró a la densidad de zonas activas como el número de zonas activas por área de UNM.

En la figura 10, se muestra una visión general de las extremidades de adultos de *Drosophila melanogaster* captadas mediante microscopía confocal, cuyas

motoneuronas fueron marcadas endógenamente con el marcador de membrana mCD8-GFP. Además, se especifican las regiones media y proximal del fémur usadas para la recolección de imágenes de axones y UNMs, respectivamente. El empleo de estas regiones de estudio se justifica por la posibilidad de tener complicaciones anexas producto del largo e irregularidad de los axones en la zona distal y de la cercanía con los somas neuronales en la zona proximal. Además, la mayor homogeneidad observada entre las UNMs en la región proximal del fémur, no se mantuvo en regiones más distales, donde observamos una mayor variación de estas estructuras.



**Figura 10.** **A)** Imagen obtenida con microscopio confocal de una extremidad de adulto de *Drosophila melanogaster* con motoneuronas marcadas con mCD8-GFP mediante el promotor de motoneuronas C380-GAL4. Los recuadros indican las regiones de la extremidad en las cuales se consideraron los axones y UNMs. **B)** Imagen de confocal de mayor magnificación de una UNM con la membrana axonal y zonas activas marcadas con mCD8-GFP y anti-BRP, respectivamente.

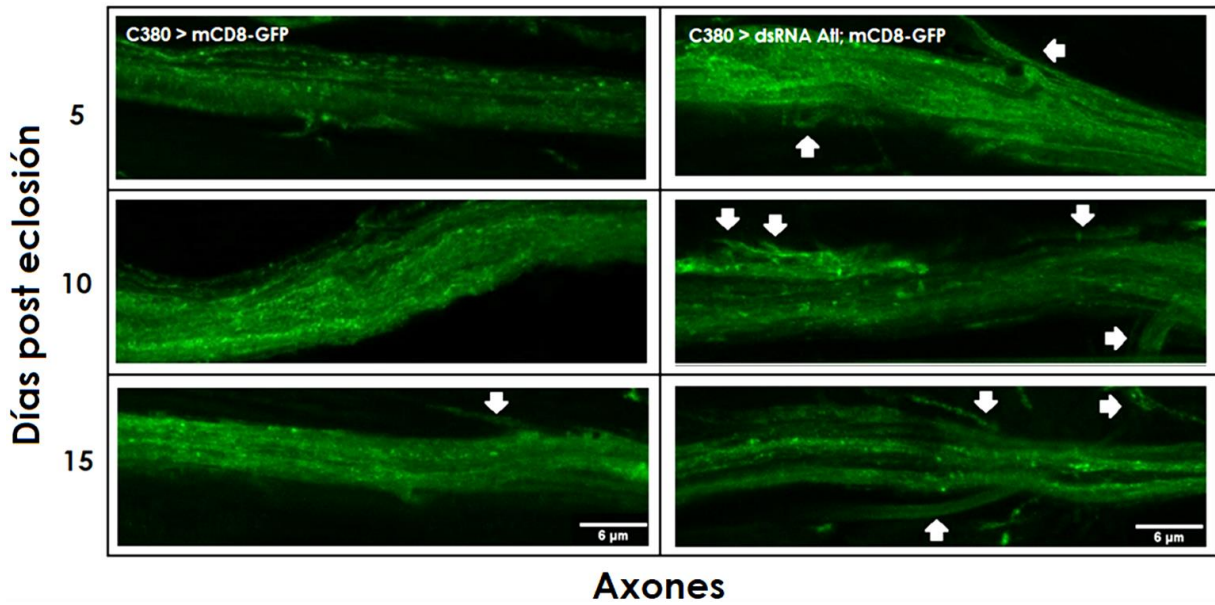


## **5. RESULTADOS**

### **5.1 La disminución de la expresión de *atI* en motoneuronas altera la morfología de axones y UNM en extremidades de adultos de *D. melanogaster***

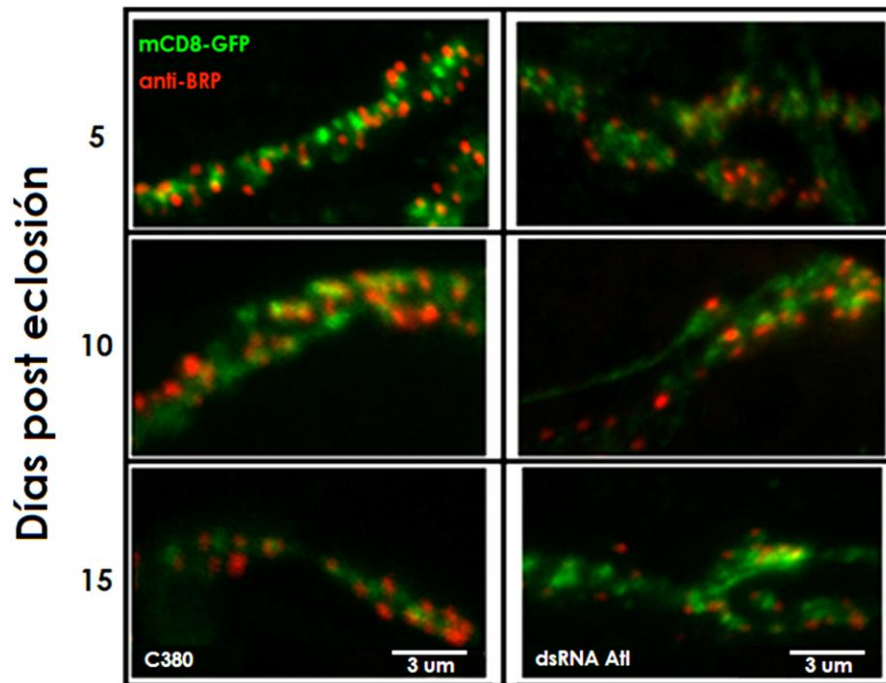
Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de estudios sinápticos relacionados con procesos neurodegenerativos en modelos adultos de *Drosophila* permite a los investigadores analizar cambios en la morfología de las conexiones sinápticas y axones motores con una gran resolución y, especialmente, de forma dependiente de la edad. Además, el hecho de que las personas afectadas con PEH inevitablemente ven afectadas las funciones motoras de sus extremidades inferiores producto de la disfunción de sus axones motores<sup>18</sup>, podría ser perfectamente comparable a lo ocurrido en extremidades de moscas adultas mostrando el mismo tipo de daño.

Así, desde el punto de vista morfológico, las motoneuronas expresando el dsRNA de atlastina (usando el driver C380-GAL4), mostraron un menor empaquetamiento o compactación de sus axones con respecto a las moscas control a lo largo del tiempo, lo que se vio reflejado por el mayor grado de desfasciculación o mayor cantidad de fibras axonales emergiendo de la rama axonal principal del fémur, especialmente en aquellas moscas de 15 días de edad (figura 11). Por tanto, atlastina sería necesaria para mantener la integridad de la estructura axonal de las motoneuronas dispuestas a lo largo de las extremidades de moscas adultas.



**Figura 11.** La disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas altera el fenotipo morfológico de los axones de la región media del fémur de extremidades de moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad. Las moscas con esta deficiencia de *atl* mostraron axones con un fenotipo desfasciculado (derecha), indicado por las flechas blancas. Mientras que las moscas control mostraron axones más compactos y ordenados en una única fibra nerviosa (izquierda). Las motoneuronas fueron marcadas con mCD8-GFP. n= 6.

En el caso de las UNMs, analizadas a lo largo del tiempo y situadas en la región proximal del fémur de las extremidades de moscas adultas (figura 12), se observaron marcas más irregulares de mCD8-GFP en las regiones terminales de las UNMs de moscas con disminución de la expresión de *atl*, con los botones sinápticos adquiriendo una forma más difusa con respecto al control y con regiones de acumulación de GFP que no colocalizaron con el marcador de zonas activas en *Drosophila*, BRP (esto último en ambos tipos de moscas). También se apreció un menor número de zonas activas marcadas con el anticuerpo anti-BRP, que además se observa con menor marca. De esta forma, se podría inferir que mutaciones afectando la expresión de atlastina también conducirían a la alteración de las zonas activas presentes en las sinapsis neuromusculares de las extremidades de moscas adultas.

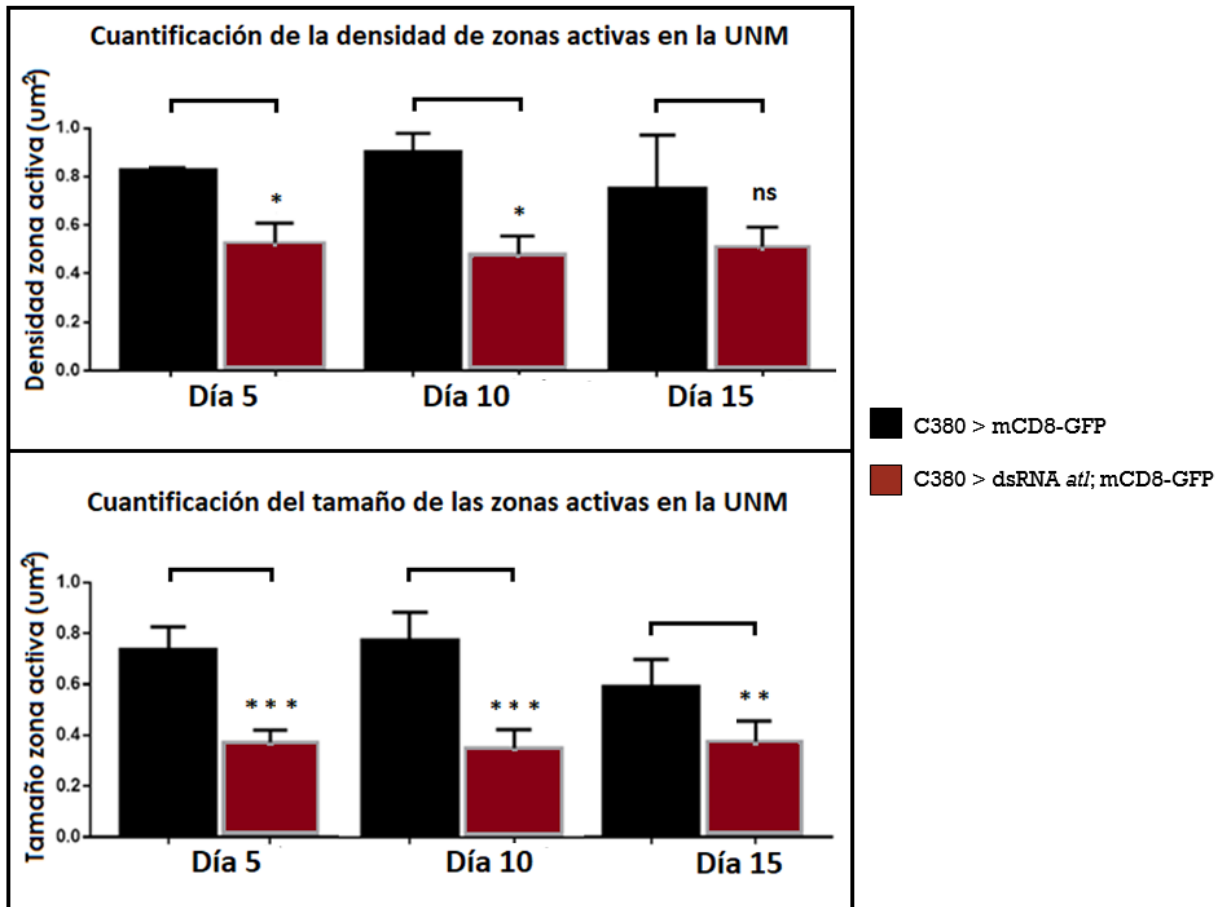


**Figura 12.** La disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas altera el fenotipo morfológico de las UNMs de la región proximal del fémur de extremidades de moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad. En el caso de las moscas con esta condición, se observaron sinapsis más irregulares (verde), con nervios terminales menos definidos con respecto a las moscas control. Además, las zonas activas (rojo) de la UNM mostraron una distribución y tamaño alterados. Las motoneuronas y zonas activas fueron marcadas con mCD8-GFP y el anticuerpo para Bruchpilot (anti-BRP), respectivamente. n= 6.

Para corroborar las anomalías morfológicas vistas en las sinapsis neuromusculares, decidimos cuantificar la densidad y el tamaño de las zonas activas presentes en estas estructuras, dado que se ha descrito que alteraciones en estos parámetros ocurren como una característica común de enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento<sup>8</sup>.

En este caso, la figura 13 muestra una disminución significativa en la densidad de zonas activas en moscas con disminución de la expresión de *atl*, con excepción de moscas de 15 días de edad, donde no se apreciaron diferencias con respecto a las moscas control. Lo anterior también ocurrió con el tamaño de estas estructuras, donde las moscas expresando el dsRNA para atlastina mostraron zonas activas con un tamaño mucho menor en comparación a la situación control, por lo que se podría inferir que la alteración en la expresión de atlastina también tendría consecuencias sobre las

características mencionadas de las zonas activas presentes en las UNMs de las extremidades de moscas adultas.

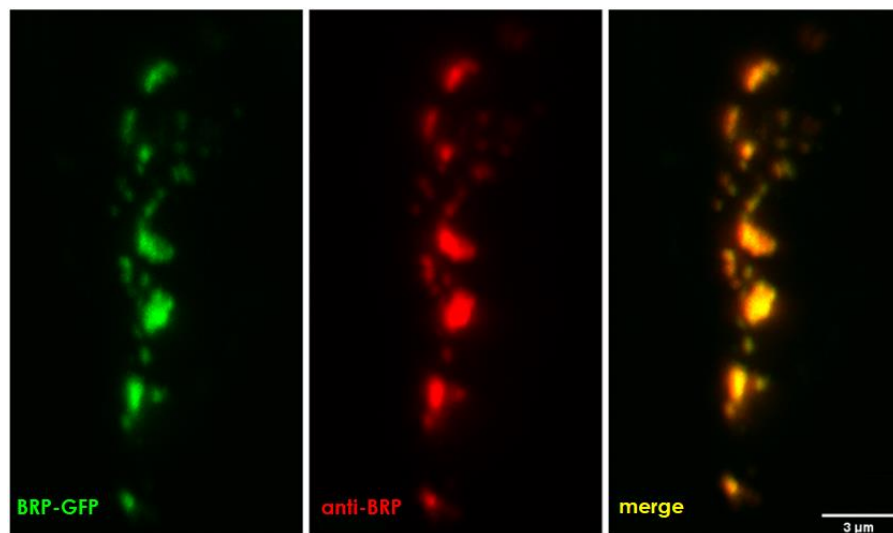


**Figura 13.** La disminución de la expresión de *atl* altera la densidad y tamaño de las zonas activas de la UNM de las extremidades de moscas de 5, 10 y 15 días de edad. Las moscas con expresión disminuida de *atl* mostraron un menor tamaño y densidad de sus zonas activas con respecto a las moscas control. Se empleó una prueba t para calcular la media y desviación estándar de cada grupo. n=6; ns= no significativo; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001

Por tanto, los resultados anteriores nos permitirían afirmar que la irregularidad vista en los axones motores producto de la disminución de la expresión de atlastina en motoneuronas conduzca a la alteración de las zonas activas presentes en las sinapsis neuromusculares de las extremidades. Esto podría estar fundamentado por el hecho de que cualquier daño sufrido por estos conductos esenciales para la comunicación entre neuronas, afectaría procesos como el transporte axonal, que mantiene a los

axones y terminales nerviosos suplementados de proteínas, lípidos y mitocondrias, además de eliminar proteínas mal plegadas para evitar la formación de agregados tóxicos<sup>32</sup>.

Finalmente, debido a que el único estudio, realizado por Sreedharan y colaboradores<sup>48</sup>, enfocado en la neurodegeneración usando como modelo las extremidades de moscas adultas, afirma que las regiones donde se acumula GFP en las UNMs corresponderían a zonas activas, se decidió confirmar la efectividad del anticuerpo contra Bruchpilot (BRP) utilizado en este trabajo de tesis, debido a que el estudio mencionado solo se basó en la sobreexpresión de BRP mediante el uso del sistema GAL4-UAS y no hizo uso de ensayos de inmunofluorescencia para detectar los niveles endógenos. De esta forma, cuando utilizamos extremidades de moscas adultas que expresan BRP fusionada con GFP en su contexto genómico endógeno y les realizamos un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-BRP (figura 14). Se observó que la señal del anticuerpo colocalizó casi totalmente con la proteína expresada endógenamente en las moscas, por lo que podemos descartar algún grado de inespecificidad del anticuerpo usado y quedaría por determinar a que corresponderían realmente estos puntos dados por la marca mCD8-GFP.



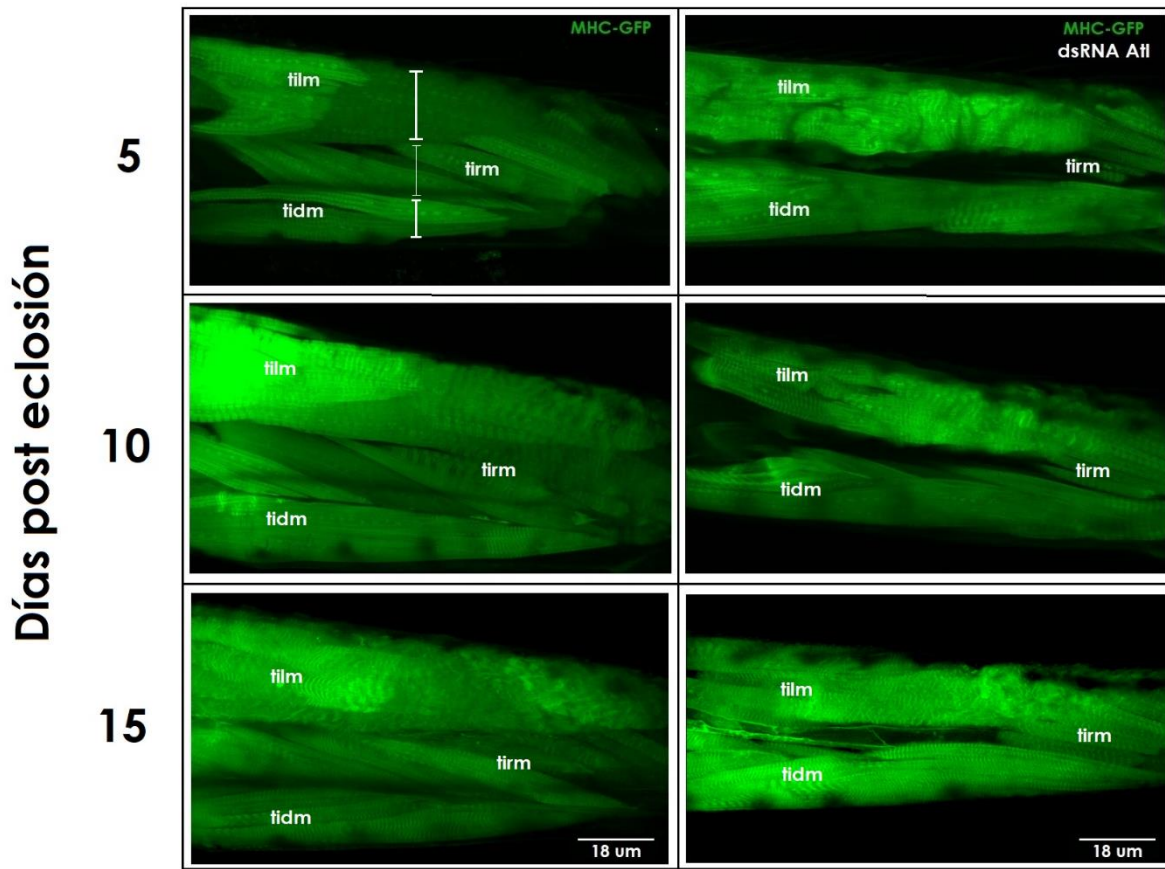
**Figura 14.** El anticuerpo anti-BRP colocaliza con la proteína de zonas activas BRP en *Drosophila*, indicando la efectividad del anticuerpo usado para la detección de estas estructuras en la UNM de las extremidades de moscas adultas. n=6.

## **5.2 La disminución de la expresión de *atf* en motoneuronas altera la disposición regular de las fibras musculares en extremidades de adultos de *D. melanogaster***

Debido a que la disminución de la expresión de atlastina en motoneuronas produjo alteraciones en la morfología de los axones y en el número y densidad de zonas activas en la UNM de las extremidades de moscas adultas, nos pareció fundamental determinar los efectos de estas alteraciones en la musculatura de las extremidades, ya que defectos en la transmisión de las señales nerviosas que viajan por las motoneuronas desde el cerebro podrían finalmente conducir a una parálisis o distrofia de los músculos.

En este sentido, cuando se analizó la distribución de las fibras musculares que componen la región del fémur de las extremidades de las moscas mediante la expresión de GFP en los músculos bajo el control del promotor de miosina de cadena pesada, se pudo observar una clara alteración de la musculatura frente a la disminución de la expresión de *atf* en motoneuronas, mostrando diferentes grados de alteración de este tejido y una aparente pérdida de volumen en esta región en comparación a los controles (figura 15). En base a la morfología muscular de las extremidades de moscas adultas descrita por Soler y colaboradores<sup>56</sup>, gran parte de las moscas mostraron un fenotipo muscular leve o moderadamente afectado frente a la disminución de la expresión de *atf*, con los músculos elevadores de la tibia (tilm) y reductores de la tibia (tirm) viéndose afectados en menor o mayor medida, pero con los músculos depresores de la tibia (tidm) desapareciendo casi por completo en algunos casos. Sin embargo, un porcentaje muy pequeño de moscas (~15%) mostraron un fenotipo de distribución muscular más severamente afectado, donde las diferentes fibras musculares se vieron destrozadas hacia el extremo distal del fémur (Anexo 5).

Así, las alteraciones del fenotipo muscular vistas en las extremidades de moscas con disminución de la expresión de atlastina en motoneuronas, parecieron ser dependientes de alteraciones en la expresión de este gen, lo cual sería originado por un déficit en la transmisión de la información conducida hasta los músculos por las motoneuronas afectadas por la pérdida de atlastina.



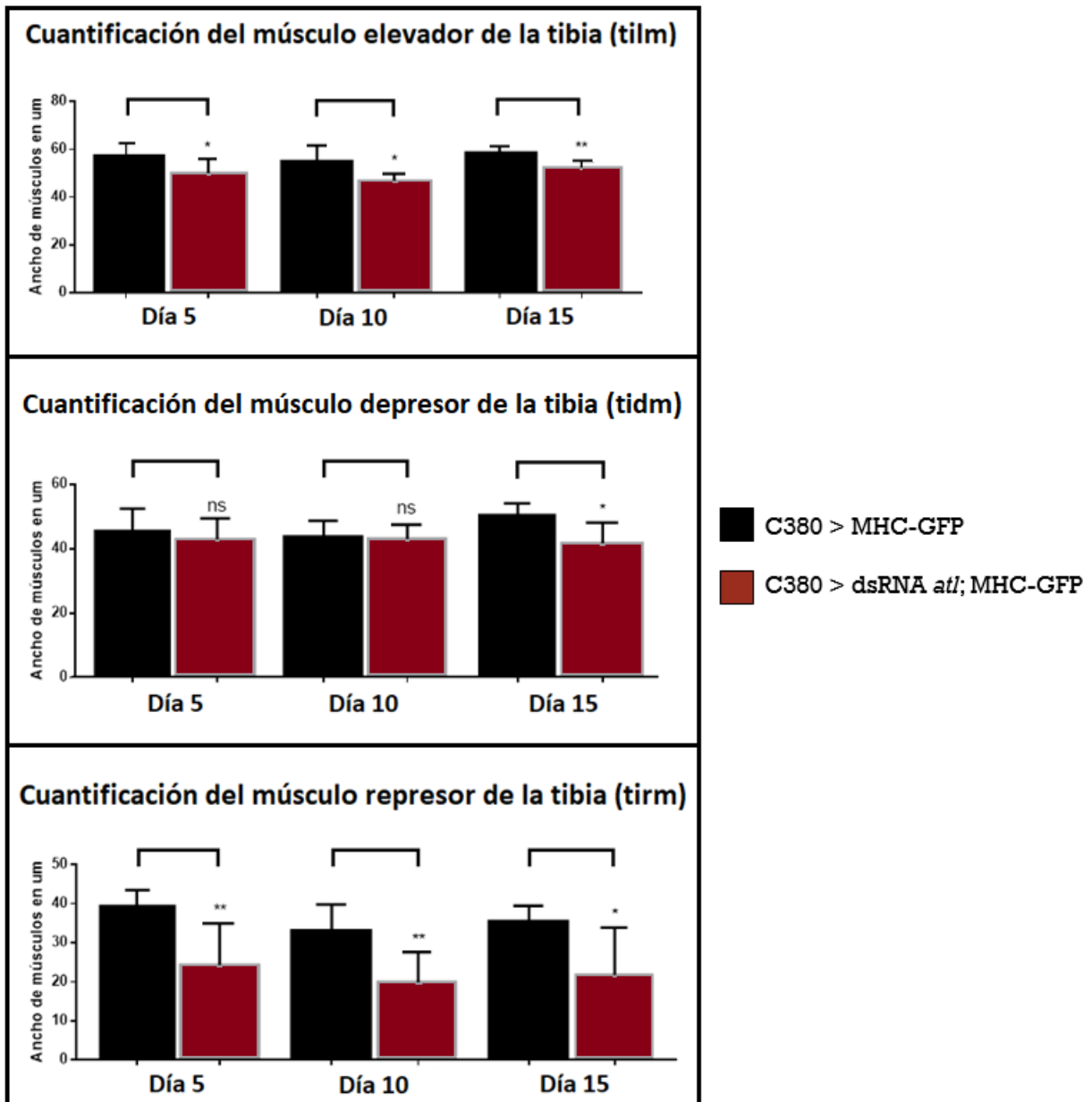
**Figura 15.** La disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas altera la morfología de los grupos de músculos presentes en el fémur de las extremidades de moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad. Los músculos fueron marcados con la miosina de cadena pesada asociada a GFP (MHC-GFP). Las moscas con expresión disminuida de *atl* en motoneuronas se muestran en los paneles situados a la derecha y sus respectivos controles a la izquierda. **tilm**: músculos elevadores de la tibia, **tidm**: músculos depresores de la tibia, **tirm**: músculos reductores de la tibia. n= 6.

\*\*\* Las líneas blancas del primer cuadrante en las moscas control indican el punto en el cual se midió el ancho de los 3 grupos de músculos para la posterior cuantificación de este parámetro.

Para verificar los cambios en la distribución y morfología observados entre las diferentes fibras musculares de las extremidades de las moscas, decidimos cuantificar el ancho de los 3 principales grupos de músculos indicados en la figura 16. De esta forma, los resultados de esta cuantificación (figura 16) mostraron diferencias significativas entre las fibras musculares de las moscas expresando el dsRNA de atlastina y las moscas control, con los músculos elevadores y reductores de la tibia (*tilm* y *tirm*, respectivamente) mostrando variaciones en todos los períodos de tiempo

estudiados y con los músculos depresores de la tibia (tidm) mostrando diferencias solo en moscas de 15 días de edad.

Esto no haría más que corroborar que la alteración en la distribución y tamaño de los músculos de las extremidades observado anteriormente en moscas con disminución de la expresión de atlastina, ocurriría producto del déficit en la producción de esta proteína.



**Figura 16.** La disminución de la expresión de *att* en motoneuronas disminuye el ancho de los músculos presentes en las extremidades de moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad. Los músculos depresores



de la tibia (tidm) solo vieron disminuido este parámetro en moscas más envejecidas, a diferencia de los músculos elevadores y reductores de la tibia (tilm y tirm, respectivamente), que se vieron afectados en todos los tiempos de medición. n= 6; ns= no significativo; \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos en los puntos 5.1 y 5.2, se podría inferir que la disminución de la expresión de atlastina en motoneuronas de moscas adultas, que conduciría a la alteración de los axones motores y zonas activas de las sinapsis neuromusculares, también estaría alterando las diferentes fibras musculares presentes en las extremidades de las moscas, probablemente como consecuencia de una transmisión sináptica alterada.

### **5.3 Existen regiones del genoma de *D. melanogaster* que alteran el fenotipo locomotor y morfológico de axones y UNM asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas**

Una vez caracterizado el fenotipo morfológico de axones, UNM y músculos de extremidades de moscas con disminución de la expresión de atlastina en motoneuronas, se investigó si las regiones modificadoras del fenotipo locomotor asociado a esta disminución de la expresión **y estudiadas en investigaciones previas en nuestro laboratorio**<sup>53</sup>, también podrían alterar el fenotipo morfológico de estas estructuras, para de esta forma definir las como regiones conteniendo posibles modificadores genéticos de este déficit en la expresión de atlastina.

Así, de un total de 102 deficiencias presentes en el brazo L del cromosoma 2 de *Drosophila*, solo cuatro regiones resultaron afectar el fenotipo locomotor asociado a este déficit de *atl* en motoneuronas (tabla 3). Las deficiencias 7840 y 23156 mejoraron el fenotipo de escalada al estar en heterocigosis con el dsRNA de *atl*, mientras que la deficiencia 9704 afectó más severamente este fenotipo. Esto fue letal cuando la deficiencia 7783 estuvo en heterocigosis con el dsRNA de atlastina. En este caso, el control empleado correspondió a la deficiencia 7994 (no mostrado en la figura), la cual es una deficiencia para la cadherina 96Ca (Cad96Ca) que se encuentra en el cromosoma 3 y no modifica el fenotipo locomotor asociado a la disminución de la

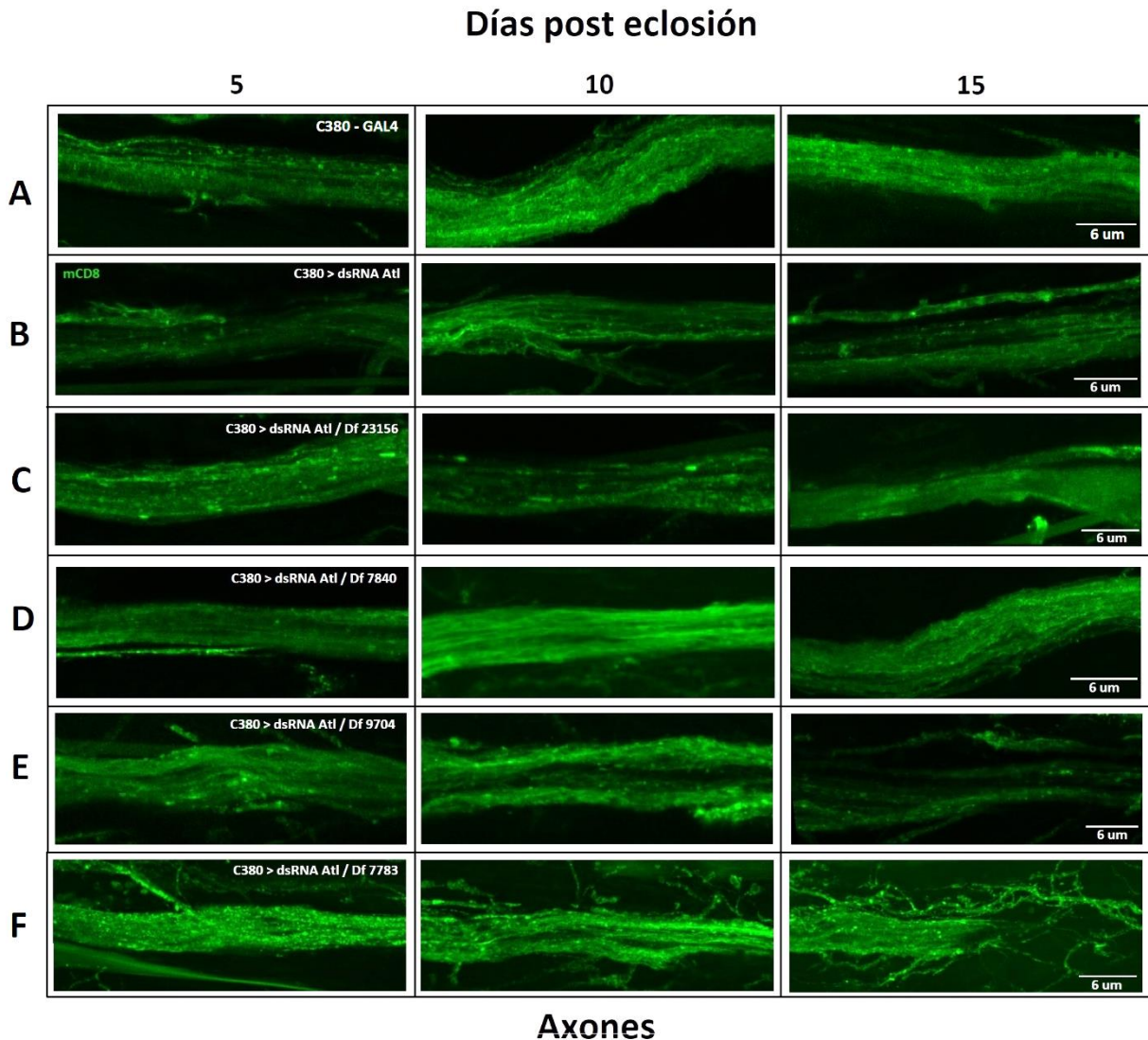
expresión de *atf* ni tiene relación molecular con ella. El gráfico correspondiente a los ensayos de escalada es mostrado en la sección anexos (anexo 6).

Deficiencia	Nomenclatura Bloomington Stock Center
7783	Df(2L) Exel7011/CyO
7840	Df(2L) Exel8038/CyO
9704	Df(2L) BSC227/CyO
23156	Df(2L) BSC256/CyO

**Tabla 3.** Tabla con cada una de las deficiencias y su respectivo código de Bloomington Stock Center, identificadas como regiones incluyendo potenciales modificadores genéticos del fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de atlastina. Cada deficiencia fue identificada mediante ensayos de escalada realizados en investigaciones previas en nuestro laboratorio.

De esta forma, y en base a estos resultados, investigamos si los efectos de estas cuatro deficiencias asociadas a la disminución de la expresión de atlastina afectando el fenotipo locomotor de moscas adultas se correlacionaban con el fenotipo morfológico de axones y UNM de las extremidades de las mismas.

En la figura 17 se muestran los diferentes fenotipos morfológicos de axones motores de moscas de 5, 10 y 15 días de edad portando cada una de las deficiencias mencionadas en heterocigosis con el dsRNA de *atlastina* (Df23156, Df7840, Df9704 y Df7783).



**Figura 17.** Las deficiencias que modifican el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas, también modifican el fenotipo morfológico de los axones de las extremidades de estas moscas. Las deficiencias 23156 y 7840 lograron mejorar el fenotipo morfológico de los axones, asociado a esta disminución de *atl* en motoneuronas, los cuales se vieron muy similares a las moscas control (silvestre). Esto no ocurrió con los axones de moscas con la deficiencia 9704, que mostraron un fenotipo similar al de las moscas con disminución de la expresión de *atl*. La deficiencia 7783 fue letal en heterocigosis con el dsRNA de *atl*, pero de igual forma se muestran los axones de las moscas que lograron sobrevivir a esta letalidad (n= 1 por cada tiempo de análisis). n=6.

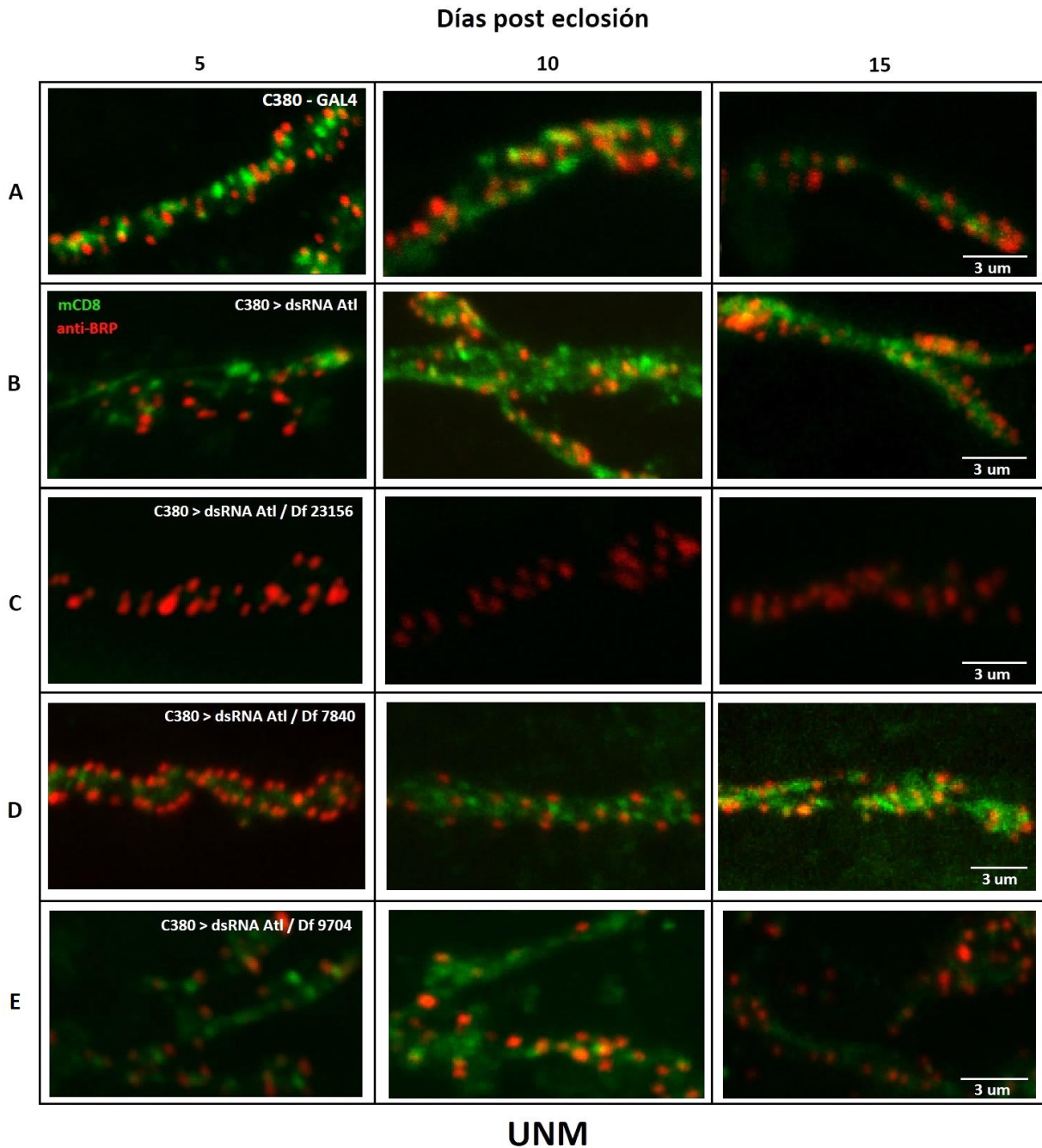
\*\* Según la nomenclatura de Bloomington Stock Center, las deficiencias 23156 (C), 7840 (D), 9704 (E) y 7783 (F) corresponden a las deficiencias Df(2L) BSC256, Df(2L) Exel8038, Df(2L) BSC227 y Df(2L) Exel7011/CyO, respectivamente. La fila A corresponde a moscas control (silvestres) y la fila B corresponde a moscas expresando el dsRNA de *atlastina* usadas como control experimental.

En el caso de las moscas portando la deficiencia 23156 y el dsRNA de atlastina (figura 17-C), los axones motores mostraron una morfología menos aberrante en comparación a moscas con disminución de la expresión para *atf* (figura 17-B), con una recuperación del empaquetamiento o compactación de los mismos, lo que fue similar para moscas portando la deficiencia 7840 bajo la misma condición (figura 17-D). Por tanto, el rescate del fenotipo morfológico de los axones motores, semejante al observado en moscas control (figura 17-A), se correlacionaría con el fenotipo motor más óptimo mostrado por estas moscas en los ensayos de escalada.

En cambio, aquellas moscas portando la deficiencia 9704 en heterocigosis con el dsRNA de *atf* (figura 17-E), mostraron un fenotipo morfológico de sus axones motores similar al visto en moscas con disminución de la expresión para este gen, por lo que aparentemente el menor índice de escalada mostrado por estas moscas en los ensayos locomotores no se debería exclusivamente a un empeoramiento de la integridad de los axones motores de las extremidades.

Cabe mencionar que para las moscas portando la deficiencia 7783 y el dsRNA de *atf* (figura 17-F), letal en los ensayos de escalada realizados previamente en otros estudios del laboratorio, solo se logró obtener un n=3 de moscas bajo esta condición, utilizando solo un individuo para cada tiempo de estudio, lo cual obviamente no nos permitió obtener resultados concluyentes. En este caso, se observaron axones motores gravemente dañados y ramificados, lo que podría explicar la extremadamente baja sobrevivencia o letalidad mostrada por estas moscas. Además, sumado a la deficiencia en la expresión de *atf*, la ausencia de una gran cantidad de genes relacionados con el tráfico y transporte de vesículas presentes en esta región delecionada, impediría la correcta comunicación del circuito neuronal en las extremidades, lo que también es explicado por la ausencia de sinapsis neuromusculares en las extremidades de estas moscas, lo que nos impidió caracterizar y cuantificar estas estructuras. Aunque teniendo un “n” tan bajo no sería apropiado afirmar esto con tanta precisión.

En cuanto a las UNMs, la delección de estas regiones o deficiencias en el genoma de las moscas también afectó de distinta forma estas estructuras (figura 18).



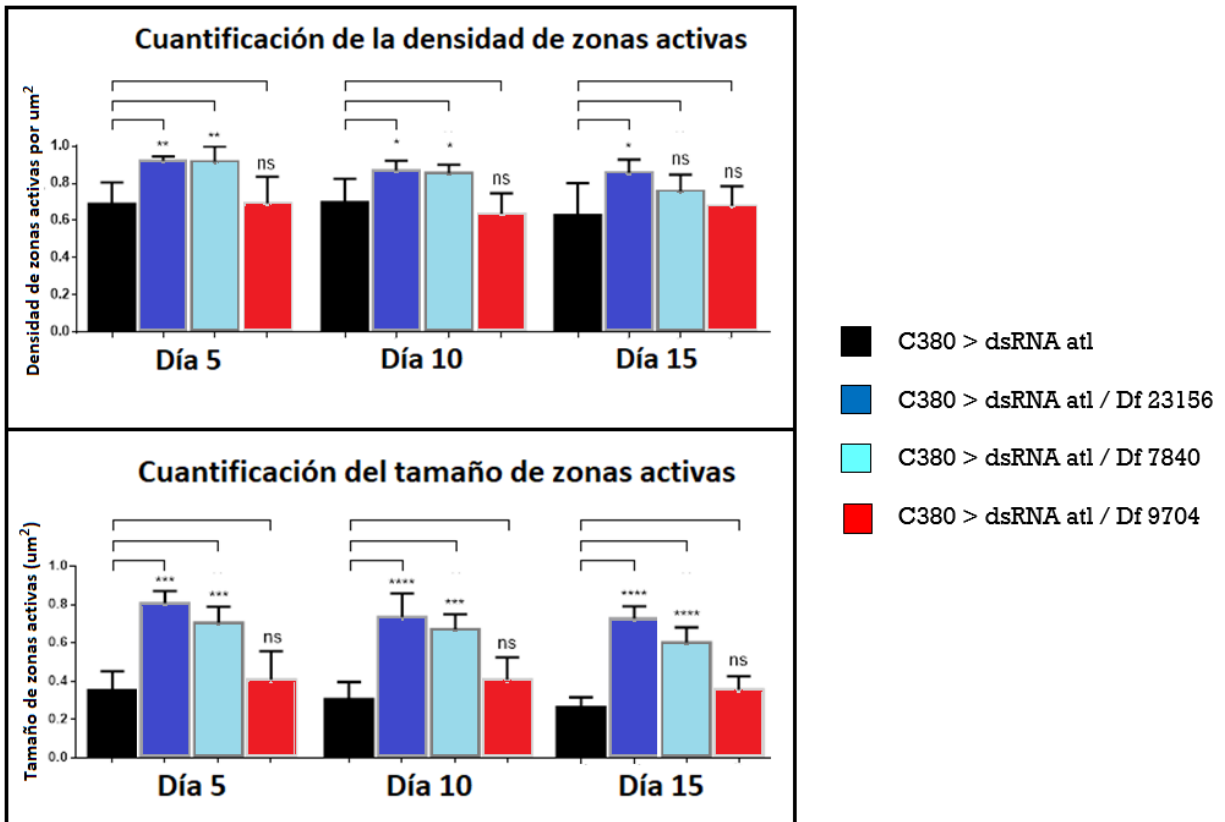
**Figura 18.** Las deficiencias que modifican el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas, también modifican el fenotipo morfológico de las UNMs de las extremidades de estas moscas. Las moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad cuyas motoneuronas expresan un dsRNA que tiene como blanco a *atlastina* (usando el driver C380-GAL4) y portan además las deficiencias 23156 y 7840, que mejoraron el fenotipo motor de estas moscas, rescataron el fenotipo morfológico de sus UNMs de forma similar a lo de las moscas control, lo que no ocurrió con las moscas portando la deficiencia 9704 que mostraron un fenotipo de sus UNMs similares al de las moscas con expresión disminuida de *atl*. Las motoneuronas y zonas activas fueron marcadas con mCD8 y Bruchpilot

(BRP), respectivamente. Según la nomenclatura de Bloomington Stock Center, las deficiencias 23156 (C), 7840 (D) y 9704 (E) corresponden a las deficiencias Df(2L) BSC256, Df(2L) Exel8038 y Df(2L) BSC227, respectivamente. La fila A corresponde a moscas control, mientras que la fila B corresponde a moscas expresando el dsRNA de *atf* usadas como control experimental. n=6.

La heterocigocidad de la Df 23156 y el dsRNA de *atf* indujo la recuperación del fenotipo morfológico de las sinapsis neuromusculares (figura 18-C), en comparación a las moscas con disminución de la expresión de *atf* (figura 18-B), aunque también pudimos observar una marcada disminución de la marca de mCD8 en los nervios terminales de las primeras. Lo anterior también fue observado en moscas portando la Df 7840, la que al estar en heterocigosis con el dsRNA de *atf* logró mejorar considerablemente el fenotipo morfológico de las UNMs de las extremidades de estas moscas (figura 18-D), por lo que el rescate de las sinapsis neuromusculares, sumado al rescate de los axones motores por parte de estas deficiencias, se correlacionaría con el rescate del fenotipo motor de estas moscas.

En cambio, las moscas heterocigóticas para la Df 9704 y el dsRNA de *atf* mostraron un fenotipo de UNM muy similar al de las moscas con disminución de la expresión para este gen (figura 18-E), observándose nervios terminales altamente ramificados con botones alterados y muy poco definidos, por lo que aparentemente, al igual que lo ocurrido con los axones motores, a pesar de afectar el fenotipo motor de las moscas, esta deficiencia no contribuiría a aumentar los efectos de la disminución de la expresión de *atf* en estas estructuras.

Para corroborar estos fenotipos morfológicos de las UNMs, se cuantificaron la densidad y tamaño de sus zonas activas (figura 19).



**Figura 19.** Las deficiencias que modifican los fenotipos motor y morfológico de axones asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas, también alteran la densidad y tamaño de las zonas activas en las UNMs de las extremidades de estas moscas. El panel superior muestra la cuantificación de la densidad de zonas activas, mientras que el panel inferior muestra la cuantificación del tamaño de las zonas activas. Mediciones realizadas en moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad expresando un dsRNA *atl* sumado a cada una de las deficiencias estudiadas (23156, 7840 y 9704). Los datos fueron comparados con moscas con disminución de la expresión de *atlastina*. n=6; ns = no significativo, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

En todos los casos, tanto la densidad como el tamaño de las zonas activas se correlacionó con lo observado anteriormente, donde la deficiencia 9704 no mostró diferencias significativas con las sinapsis de moscas con disminución de la expresión de *atl*. Lo mismo ocurrió con la deficiencia 23156, donde el aumento significativo de la densidad y el tamaño de las zonas activas en comparación a las moscas con una expresión alterada de *atlastina* a lo largo del tiempo se correlacionó con el rescate del fenotipo morfológico observado en estas moscas. Sin embargo, la deficiencia 7840 mostró una correlación muy similar de estos parámetros a lo observado en moscas

silvestres, con el tamaño de sus zonas activas significativamente superior a lo largo de todos los períodos de tiempo estudiados (en comparación a moscas con disminución de la expresión para *atf*) y con la densidad de estas estructuras significativamente mayor durante los 5 y 10 días de edad de las moscas, pero sin diferencias significativas a los 15 días de edad, lo que podría ser explicado por la alteración de estos parámetros de las zonas activas dados por el envejecimiento.

Por tanto, podríamos inferir que todas aquellas moscas expresando el dsRNA de *atf* junto a cada deficiencia estudiada, mostrando un fenotipo morfológico de sus axones motores y sinapsis neuromusculares de sus extremidades distinto al visto en moscas expresando únicamente el dsRNA de *atf*, en este caso las deficiencias 23156 y 7840, tendría una directa relación con el rescate del fenotipo motor de las mismas, por lo que estas regiones podrían contener genes que contribuirían a aumentar los efectos de las mutaciones que afectan a *atlastina*.

#### **5.4 Las regiones que alteran el fenotipo morfológico de axones y UNM asociados a la disminución de la expresión de *atf* también alteran la disposición regular de las fibras musculares en extremidades de adultos de *D. melanogaster***

Al igual que lo realizado para comparar los fenotipos morfológicos de moscas con disminución de la expresión de *atf* y moscas silvestres, en este punto decidimos verificar si las alteraciones de los fenotipos morfológicos de los axones motores y sinapsis neuromusculares producto de la suma de las deleciones dadas por cada una de las deficiencias estudiadas y el dsRNA de *atf* también tuvieron un efecto sobre la distribución y tamaño de las fibras musculares de las extremidades de moscas adultas (figura 20).



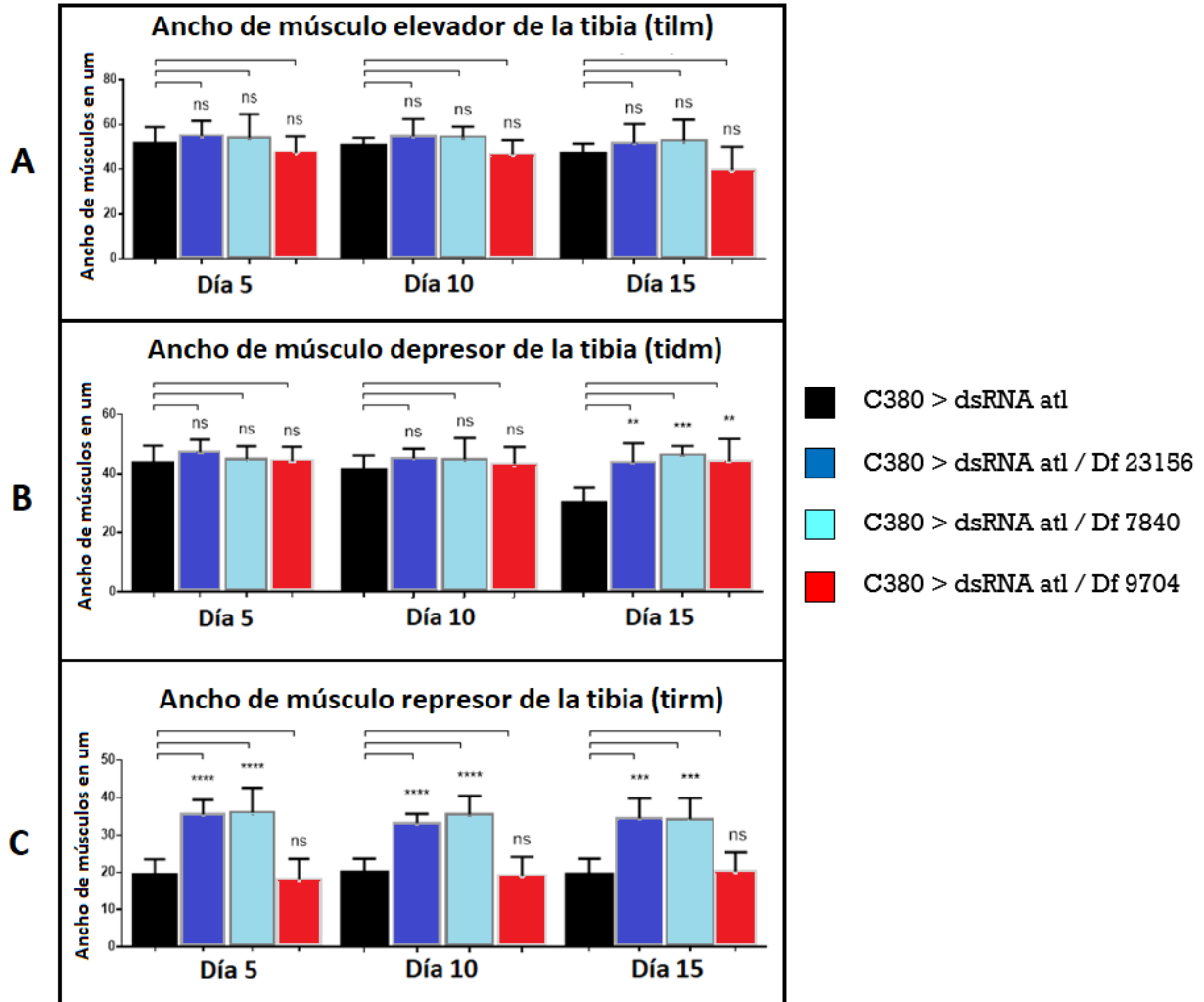


respectivamente. La fila **A** corresponde a las moscas control C380-GAL4, mientras que la fila **B** corresponde a moscas expresando el dsRNA de *atlastina* usadas como control experimental. n=6.

Así, las moscas expresando el dsRNA de *atl* en conjunto con la deficiencia 23156 (figura 20-C) mostraron una distribución y tamaño de fibras musculares más regulares y similares a los observados en las moscas control (figura 20-A), lo cual también ocurrió en moscas expresando este dsRNA en heterocigosis con la deficiencia 7840 (figura 20-D). Esto indicaría una correlación entre este fenotipo morfológico de los músculos de las extremidades de ambos genotipos de moscas y el fenotipo morfológico de los axones motores y UNMs de las mismas observado anteriormente. Además, este aparente rescate de la estructura muscular de las extremidades tendría una directa relación con el también rescate del fenotipo motor mostrado por estas moscas en los ensayos de escalada, en comparación a las moscas con disminución de la expresión de *atlastina*.

Por otro lado, esta situación no fue observada en moscas expresando el dsRNA de *atl* junto a la deficiencia 9704 (figura 20-E), ya que estas mostraron un fenotipo muscular muy similar al de las moscas expresando únicamente el dsRNA de *atl* (figura 20-B). Así, el fenotipo observado en estas moscas se correlacionaría directamente con las alteraciones mostradas en la morfología de los axones motores y de las UNMs vistas para estas moscas anteriormente, pero no tendría relación con el empeoramiento de su fenotipo motor, por lo que este déficit motor más afectado en comparación al de las moscas expresando el dsRNA de *atl* no estaría explicado por las alteraciones de estas estructuras.

Sin embargo, para corroborar todo lo anterior, decidimos cuantificar el ancho de los 3 grupos de músculos estudiados anteriormente (*tilm*, *tidm* y *tirm*), lo cual es explicado en la siguiente figura.



**Figura 21.** La disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas, en heterocigosis con cada una de las deficiencias estudiadas, disminuye el ancho de los músculos presentes en las extremidades de moscas adultas de 5, 10 y 15 días de edad. El panel **A** muestra la cuantificación para los músculos elevadores de la tibia (tilm). El panel **B** muestra la cuantificación de los músculos depresores de la tibia (tidm). El panel **C** muestra la cuantificación de los músculos reductores de la tibia (tirm).  $n=6$ ; ns= no significativo; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ .

La figura 21 muestra que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos de moscas estudiados para los músculos elevador y depresor de la tibia (tilm y tidm, respectivamente; figura 21-A y B), salvo para este último en moscas de 15 días de edad, donde todas las moscas expresando el dsRNA de *atl* en conjunto con cada deficiencia mostraron un mayor tamaño de estas fibras musculares, en comparación a las moscas con disminución de la expresión de *atl*.

En cambio, tanto las moscas portando la deficiencia 23156 como la deficiencia 7840, en heterocigosis con el dsRNA de *atl*, mostraron diferencias significativas en el ancho de los músculos reductores de la tibia (tirm) en todos los períodos de tiempo analizados (figura 21-C). Esto nos permitiría inferir que, al igual que lo observado en moscas expresando el dsRNA de *atl*, este grupo de músculos reductores de la tibia presentes en el fémur de las extremidades de las moscas sería el más afectado por el daño de los axones motores y sinapsis neuromusculares, lo que sería aminorado por la delección de los genes presentes en estas regiones.

### 5.5 Las regiones que alteran el fenotipo locomotor y morfológico de axones y UNM asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas contienen genes que podrían actuar como modificadores genéticos

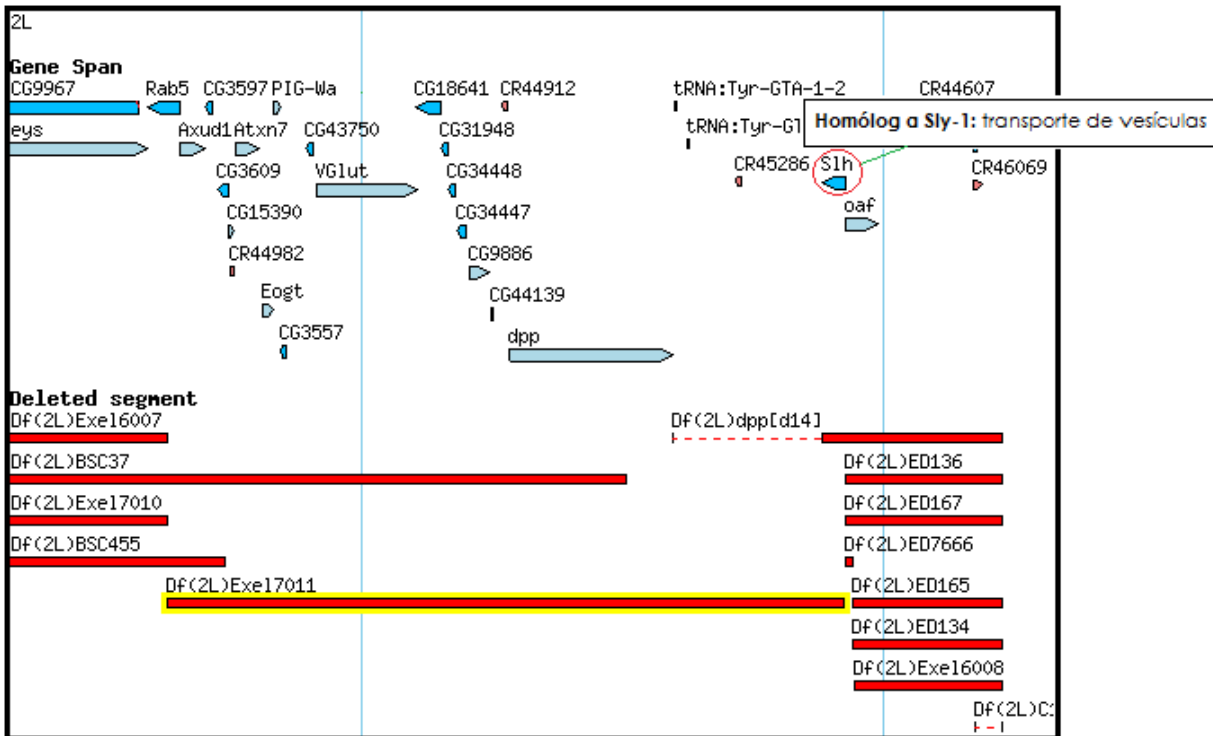
Una vez caracterizados los efectos de cada deficiencia o región presentes en el brazo L del cromosoma 2 de *Drosophila* sobre los axones motores y sinapsis neuromuscular de las extremidades de moscas adultas, decidimos analizar los efectos de algún gen presente en estas regiones, los cuales son mostrados en la tabla 4 junto a sus respectivas funciones.

Deficiencia	Gen	Función
7783 (Df[2L]Exel7011/CyO)	rab5	Participa en el procesamiento endosomal de vesículas sinápticas
	Vglut	Transportador vesicular de glutamato
	Dpp	Ligando de la vía de señalización TGF-B
	homólogo a sly-1 (slh)	Participa en el transporte de vesículas
	CGs (13)	
7840 (Df[2L]Exel8038/CyO)	Fasciclina 3 (fas3)	Participa en guía axonal, reconocimiento de blancos sinápticos, aprendizaje y memoria, etc
	CGs (14)	
9704 (Df[2L]BSC227/CyO)	Piezo	Participa en la regulación positiva de la morfogénesis de las dendritas y en

		respuestas celulares a estímulos mecánicos
	SLC5A11	Involucrado en el transporte transmembrana y las respuestas conductuales a nutrientes
	CGs (17)	
<b>23156</b> <b>(Df[2L]BSC256/CyO)</b>	ninaD	Participa en la fototransducción, en el transporte de carotenoides, etc
	arrestina 1 (arr1)	Involucrado en la endocitosis, en la mantención celular de fotorreceptores, etc
	CGs (17)	

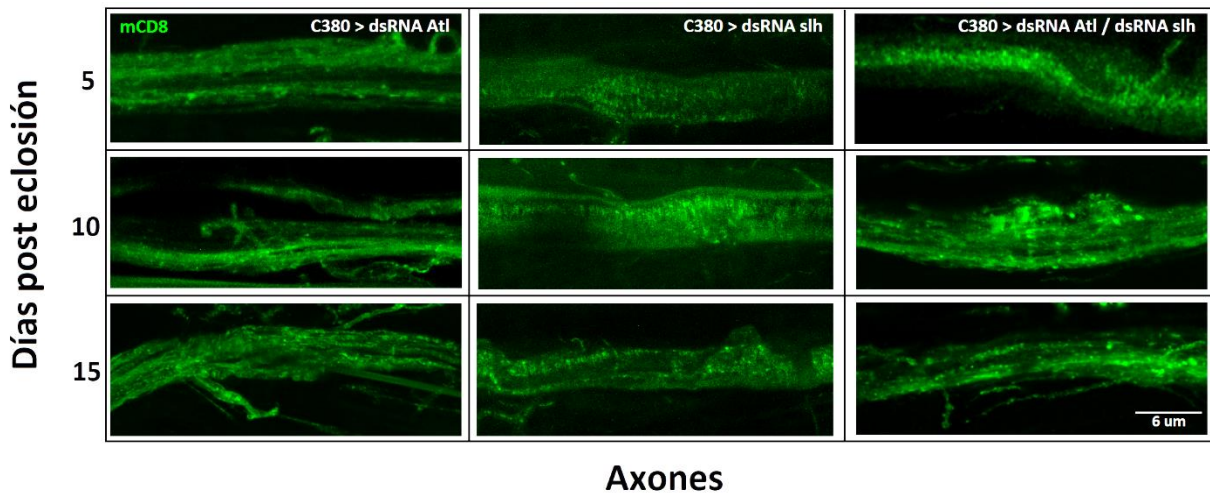
**Tabla 4.** Tabla con cada una de las deficiencias modificadoras del fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atlastina*. Se muestran los genes y CGs presentes en cada región señalada junto a su respectiva función. Cada deficiencia fue identificada mediante ensayos de escalada realizados en investigaciones previas en nuestro laboratorio. Fuente: flybase.org

En este caso, decidimos caracterizar los efectos sobre estos fenotipos del gen homólogo a *sly-1* (*slh*), presente en la deficiencia 7783, que resultó ser letal en combinación con el dsRNA de *atl*. Esto debido a que de entre todos los genes presentes en esta deficiencia solo *slh* no estuvo presente también en otras regiones que solapaban con la deficiencia 7783, como se observa en la figura 22, por lo podríamos atribuir los efectos de esta deficiencia a la delección de este gen.



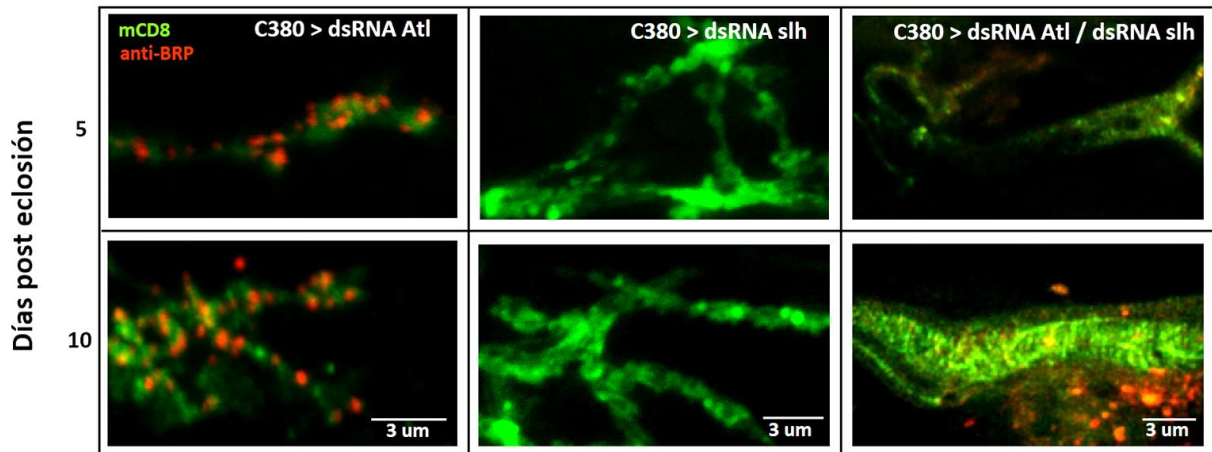
**Figura 22.** Imagen referencial de la disposición de los genes comprendiendo la región 7783. Se destaca al gen *homólogo a sly-1 (slh)* debido a que, a diferencia de otros genes de la región mencionada, este no se encuentra presente en otras regiones estudiadas. Fuente: flybase.org

De esta forma, al analizar el fenotipo morfológico de los axones motores de las extremidades de moscas expresando el dsRNA de *atl* en heterocigosis con el dsRNA de *slh* en motoneuronas (figura 23), pudimos observar un fenotipo diferente al de moscas control (expresando solamente el dsRNA de *atl*), con axones motores no tan marcadamente desfasciculados y más bien con regiones de acumulación de mCD8 a lo largo del tiempo. Esta situación fue un poco más similar cuando los axones fueron comparados con moscas expresando únicamente el dsRNA de *slh* en motoneuronas, que también mostraron regiones de acumulación de mCD8, pero con axones más íntegros y compactos. Por tanto, podríamos asumir que por sí solo, la disminución de la expresión de *slh* sería capaz de inducir un fenotipo morfológico de axones diferente al de *atlastina* bajo la misma condición, pero empeorando el fenotipo de estas estructuras cuando disminuye su expresión junto con la de *atlastina*.



**Figura 23.** La disminución de la expresión de *slh* en motoneuronas, genera un nuevo fenotipo morfológico de axones motores en las extremidades de moscas adultas, distinto al fenotipo mostrado por la disminución de la expresión de *atl*. Además, la expresión del dsRNA de *slh* en heterocigosis con el dsRNA de *atl* no contribuyó a aumentar el fenotipo desfasciculado de los axones observado en moscas con este último dsRNA. Experimentos realizados en moscas de 5, 10 y 15 días de edad. Extremidades de moscas con genotipos C380>dsRNA *atl* y C380> dsRNA *slh* fueron empleadas como control experimental. Los axones se encuentran marcados con mCD8-RFP, pero se muestran en color verde para evitar confusión y mantener el mismo patrón durante todo el estudio. n=6.

Por otro lado, para las sinapsis neuromusculares observamos un fenotipo claramente distinto entre moscas expresando el dsRNA de *slh* junto al dsRNA de *atl* y moscas expresando solamente del dsRNA de este último gen (figura 24), con las primeras produciendo un fenotipo extremadamente aberrante de la UNM, con zonas activas presentándose como prácticamente puntos y nervios terminales muy irregulares a los 5 días de edad de las moscas. Sin embargo, en moscas de 10 días de edad las marcas de las sinapsis desaparecieron casi por completo y, en casos muy particulares, las zonas activas se distribuyeron en áreas no vistas anteriormente, como en la región correspondiente a los axones motores. En moscas de 15 días de edad no se pudieron distinguir sinapsis neuromusculares y sus respectivas zonas activas, por lo que no son mostradas en la figura 24. Cabe señalar que no se realizaron experimentos con moscas expresando únicamente el dsRNA de *slh* en motoneuronas, por lo que este pendiente se encuentra en curso para observar lo que ocurre con las sinapsis bajo esta condición.



**Figura 24.** La disminución de la expresión de *slh* en motoneuronas genera un fenotipo morfológico de UNM carente de zonas activas, mientras que la heterocigosis de este dsRNA de *slh* con el dsRNA de *atl* generan UNMs con un fenotipo aberrante en el que las zonas activas se encuentran deslocalizadas y con tamaños muy irregulares. Se muestran las UNMs de extremidades de moscas de 5 y 10 días de edad, con sus motoneuronas y zonas activas marcadas con mCD8 y el anticuerpo anti-Bruchpilot (BRP), respectivamente. Moscas expresando únicamente el dsRNA de *atlastina* fueron usadas como control experimental. n=6.

De esta forma, estos resultados nos permitirían inferir que *slh* podría actuar como un modificador genético del efecto de mutaciones en *atlastina* sobre los axones motores y las sinapsis neuromusculares de las extremidades de moscas adultas, dado que la disminución de la expresión de este gen contribuyó a aumentar los fenotipos morfológicos vistos en estas estructuras cuando se tuvo una disminución en la expresión de *atlastina*, viéndose mayormente afectadas por esta situación las UNMs y zonas activas de estas moscas.

En este punto, se encuentran en marcha los experimentos para ver qué consecuencias tendrían estos fenotipos sobre la morfología de los diferentes grupos de músculos de moscas con disminución de la expresión de *slh* y *atl*.



## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 La disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas altera el fenotipo morfológico de axones motores, UNMs y músculos de las extremidades de moscas adultas

Mutaciones en *atlastina* son responsables de la aparición de una forma pura y autosómica dominante de paraparesia espástica hereditaria (PEH), siendo la principal causa de su origen temprano<sup>27</sup>. Uno de los objetivos de este trabajo fue caracterizar el fenotipo neurodegenerativo producido por la disminución de la expresión de *atlastina* en motoneuronas tanto en los axones motores como en las sinapsis neuromusculares de las extremidades de moscas adultas. Para ello, nos basamos en resultados previos de nuestro laboratorio que identificaron un fenotipo de comportamiento motor característico en moscas adultas deficientes en *atlastina* en motoneuronas<sup>16,53</sup>.

Nuestros resultados mostraron que la disminución de la expresión de *atlastina* en este tipo neuronal alteró el empaquetamiento de los ases axonales que pasan por el fémur, reflejándose en una mayor desfasciculación de esta rama axonal con respecto al control. Este efecto de la disminución de la expresión de *atlastina* podría ser explicado por defectos en el tráfico de membranas. Por ejemplo, se sabe que la GTPasa *rab5* es fundamental para mantener la integridad de los endosomas en el terminal presináptico, promoviendo la fusión homotípica de endosomas tempranos. Variantes mutadas de esta GTPasa han sido vinculadas a defectos en las tasas de endo y exocitosis, así como a la disminución en la liberación de neurotransmisores<sup>58</sup>. Además, *rab5* también ha sido identificado como un factor clave en eventos de desfasciculación de axones *in vitro* en modelos murinos<sup>59</sup>, lo que podría darnos un indicio de la importancia de este tipo de genes relacionados con procesos de transporte axonal en la mantención de la integridad y fasciculación de las neuronas. En este caso, también se ha vinculado a *rab5* a múltiples fases de migración neuronal mediadas por transporte endocítico<sup>60</sup>, aunque defectos en la fasciculación axonal no han sido asociados a este fenómeno. Sin embargo, si consideramos el fenotipo de desfasciculación axonal frente a la disminución de la expresión de *atlastina* en

motoneuronas, con fibras axonales más cortas y pequeñas emergiendo del grupo de axones más empaquetados en la línea media del fémur, podría existir la posibilidad de que esta mutación en *atlastina* esté afectando los eventos de migración neuronal, impidiendo que algunas fibras axonales lleguen a destino y, de esta forma, afectando la transmisión neuronal reflejada en la disminución de la densidad y tamaño de las zonas activas de las sinapsis neuromusculares observadas en este trabajo.

Bajo este último supuesto, una prueba de que la disminución de la expresión de *atlastina* en motoneuronas podría estar afectando la transmisión sináptica, se vio reflejada en el fenotipo observado en los diferentes grupos de músculos de las extremidades bajo esta condición, tal y como ocurre en pacientes con atrofia muscular bulbar y espinal (SBMA), que muestran sinapsis neuromusculares más débiles debido a alteraciones en mecanismos pre y post-sinápticos, que finalmente producen la atrofia de los músculos de las extremidades inferiores<sup>61</sup>. Aunque para corroborar esta hipótesis sería ideal emplear algunos métodos electrofisiológicos que nos permitan cuantificar parámetros pre y post-sinápticos que se encuentren alterados por este tipo de defecto.

Estos resultados, apuntando a un rol clave de *atlastina* en la fasciculación axonal, junto a los antecedentes que indican que este gen participaría en el tráfico de vesículas<sup>62</sup>, formación y elongación axonal<sup>33</sup> e implicancia en la vía de señalización de la proteína morfogenética del hueso (BMP) en el transporte retrogrado que ocurre desde el músculo hasta la motoneurona presináptica<sup>63</sup>, proceso fundamental para el desarrollo y crecimiento de la UNM, nos harían suponer que la disminución de la expresión de *atlastina* podría tener efectos pleiotrópicos en *Drosophila*.

Así mismo, otro importante factor a considerar y que podría ayudarnos a comprender de mejor forma la función de *atlastina* en la generación de los fenotipos observados, quizás es explicado por la relación de los exosomas con la vía de señalización *wingless* (*wg*) en la comunicación trans-sináptica de *Drosophila*. En el caso de esta importante vía de señalización anterógrada, se ha demostrado que *wg* interactúa con su receptor *frizzled2* tanto a nivel pre como postsináptico, para de esta forma mantener el masivo crecimiento de los músculos en larvas de *Drosophila*<sup>64</sup>. Los exosomas, por su parte, ayudarían a que *wg* sea capaz de viajar por el espacio

intracelular, mediante su unión a una proteína exosómica llamada Evi, la cual se encuentra en la membrana de los exosomas y es liberada desde los terminales presinápticos a través de cuerpos multivesiculares que requieren de la interacción de rab11, miosina5 y syntaxina1a para la liberación de los exosomas en el retículo subsináptico y región postsináptica<sup>65</sup>. De esta forma, podría existir la posibilidad de que la generación de este fenotipo en los axones motores dado por la disminución de la expresión de *atlastina* afecte la vía de señalización *wg* y su interacción con los exosomas que viajan por los axones neuronales, impidiendo la comunicación transináptica y, por tanto, generando el fenotipo muscular observado en moscas adultas. Aunque se hace necesario plantear nuevos blancos de estudio relacionados con esta vía de señalización para determinar con mayor certeza si esto ocurre o no.

## **6.2 Las deficiencias genómicas que modifican el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *at/* en motoneuronas, también alteran el fenotipo morfológico de axones motores, UNMs y músculos de las extremidades de moscas adultas**

Como fue mencionado anteriormente, en una investigación llevada a cabo en nuestro laboratorio<sup>53</sup>, se identificaron mediante un rastreo genético, cuatro regiones genómicas del brazo L del cromosoma 2 de *Drosophila* que modificaron el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atlastina*. Además, es necesario recalcar que estas cuatro regiones genómicas corresponden a regiones que contienen genes relacionados con la guía axonal, el tráfico de vesículas, endocitosis y/o algún tipo de transporte de proteínas a lo largo del axón neuronal.

En este caso, de las cuatro regiones mencionadas, 2 de ellas lograron mejorar el fenotipo morfológico de los axones motores, sinapsis neuromusculares y músculos de las extremidades de moscas adultas (Df 23156 y 7840), lo cual mostró concordancia con el rescate del fenotipo motor de estas moscas. Esto nos permitiría indicar que estas regiones o deficiencias probablemente contengan genes que podrían actuar como modificadores genéticos de la disminución de la expresión de *atlastina* en motoneuronas, suprimiendo así la actividad de la *atlastina* mutada, dado que la

delección generada por estas deficiencias o regiones y, por tanto, la pérdida de las dosis génicas de los genes presentes en ellas, generaría el rescate del fenotipo motor y morfológico de las estructuras mencionadas.

En este sentido, lo anterior podría ser explicado de mejor forma si tomamos como ejemplo a una de las deficiencias que logró rescatar tanto el fenotipo motor como el fenotipo morfológico de axones, sinapsis neuromuscular y músculos de las extremidades, la Df 7840, la cual, además de algunos CGs, contiene genes como *fasciclina 3*, involucrado en la guía axonal. Si consideramos que *fasciclina 3* es una glicoproteína integral de membrana implicada en la fasciculación de axones del SNC de *Drosophila*<sup>66</sup>, la pérdida de la dosis de este gen dada por esta deficiencia nos indicaría que posiblemente *fasciclina 3* mutada pueda actuar como un supresor de la actividad anormal de *atlastina*, contribuyendo a generar el rescate del fenotipo neurodegenerativo visto en axones motores, UNM y músculos de las extremidades.

Por otro lado, cabe mencionar que esta situación no ocurrió con la región o deficiencia 9704, ya que a pesar de que las moscas con esta deficiencia mostraron un fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atlastina* más afectado, los axones motores, UNMs y músculos de sus extremidades no mostraron un fenotipo más afectado que la moscas con expresión disminuida de *atlastina*, por lo que podríamos asumir que el empeoramiento del fenotipo motor observado en estas moscas no tendría una directa relación con el fenotipo morfológico de estas estructuras en las extremidades.

Por último, no nos fue posible estudiar los defectos morfológicos de moscas con la deficiencia 7783, ya que al igual que lo ocurrido durante el estudio del fenotipo motor, esta deficiencia resultó ser letal en heterocigosis con el dsRNA de *atl*. Sin embargo, del pequeño y no significativo “n” de moscas sobrevivientes que obtuvimos, podríamos atribuir este defecto motor al fenotipo extremadamente aberrante visto en los axones motores de estas moscas, debido a que la delección de genes fundamentales para procesos de tráfico de membrana, tales como *rab5*, *vglut*, *dpp* y *slh*, generada por esta deficiencia, actuarían como potenciadores de la acción de *atlastina* mutada, conduciendo a la letalidad observada.

### **6.3 Las deficiencias genómicas que modifican el fenotipo motor y morfológico de axones motores, UNMs y músculos de las extremidades de moscas adultas contienen genes que podrían actuar como potenciales modificadores genéticos de las PEH asociadas a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas**

Con el objetivo de validar algunos de los genes contenidos en las regiones genómicas que presentaron fenotipo neurodegenerativo, decidimos caracterizar algunos potenciales modificadores genéticos.

Uno de los genes presentes en las regiones estudiadas corresponde al homólogo a *sly-1 (slh)* en *Drosophila*, que se encuentra en la deficiencia 7783 que resultó ser letal estando en heterocigosis con el dsRNA de *atl*. *Slh* regula la actividad de las SNAREs en eventos de fusión de membranas<sup>67</sup>, contribuyendo a la facilitación de este mecanismo en las membranas de las estructuras involucradas en el tráfico de proteínas, como son el RE, Golgi y vesículas<sup>52</sup>, lo que permite que los cargos transportados por las últimas pasen de un compartimento a otro. Además, el ortólogo de este gen en levaduras (*Sly1p*) ha sido implicado en el tráfico anterógrado de proteínas desde el RE al Golgi e intra Golgi, sumado al transporte retrógrado de las mismas hacia el RE<sup>67</sup>. En este sentido, si tomamos en cuenta que el fenotipo morfológico de axones motores de las extremidades de estas moscas se mostró diferente al de moscas expresando solo el dsRNA de *atl*, pero con las zonas activas de sus sinapsis neuromusculares con un fenotipo claramente más aberrante que estas últimas, podríamos considerar dos posibles situaciones para *atl* y *slh*.

Primero, existe la posibilidad de que ocurra un efecto sinérgico entre ambos, donde los defectos en la expresión de *atlastina* posiblemente tengan un mayor efecto sobre diferentes mecanismos de transporte que ocurren en los axones motores de las extremidades de las moscas, generando así el característico fenotipo de desfasciculación observado en estas estructuras. Mientras que los defectos en la expresión de *slh* tendrían un efecto más significativo sobre las sinapsis neuromusculares de las extremidades, potenciando aún más los efectos neurodegenerativos de las mutaciones en *atlastina*.

Por otro lado, también existe la posibilidad de que *atlastina* y *slh* no actúen de forma cooperativa y que los defectos en la expresión de ambos ejerzan efectos

independientes sobre los fenotipos neuronales observados, lo que podría ser explicado por los fenotipos axonales observados en este estudio, que no se vieron potenciados cuando se disminuyó la expresión de ambos genes. Sin embargo, para responder de forma más adecuada a estas interrogantes sería apropiado realizar pruebas adicionales que nos permitan afirmar cualquiera de estas situaciones.

#### **6.4 *Atlastina* y el *homólogo a sly-1* serían fundamentales para mantener una comunicación neuronal adecuada**

En base a los resultados y antecedentes planteados en este trabajo, podríamos postular un posible mecanismo de acción de *atlastina* y el *homólogo a sly-1 (slh)* en las neuronas motoras que pudiera explicar el fenotipo neurodegenerativo inducido por sus mutaciones y las posibles interacciones entre ellos.

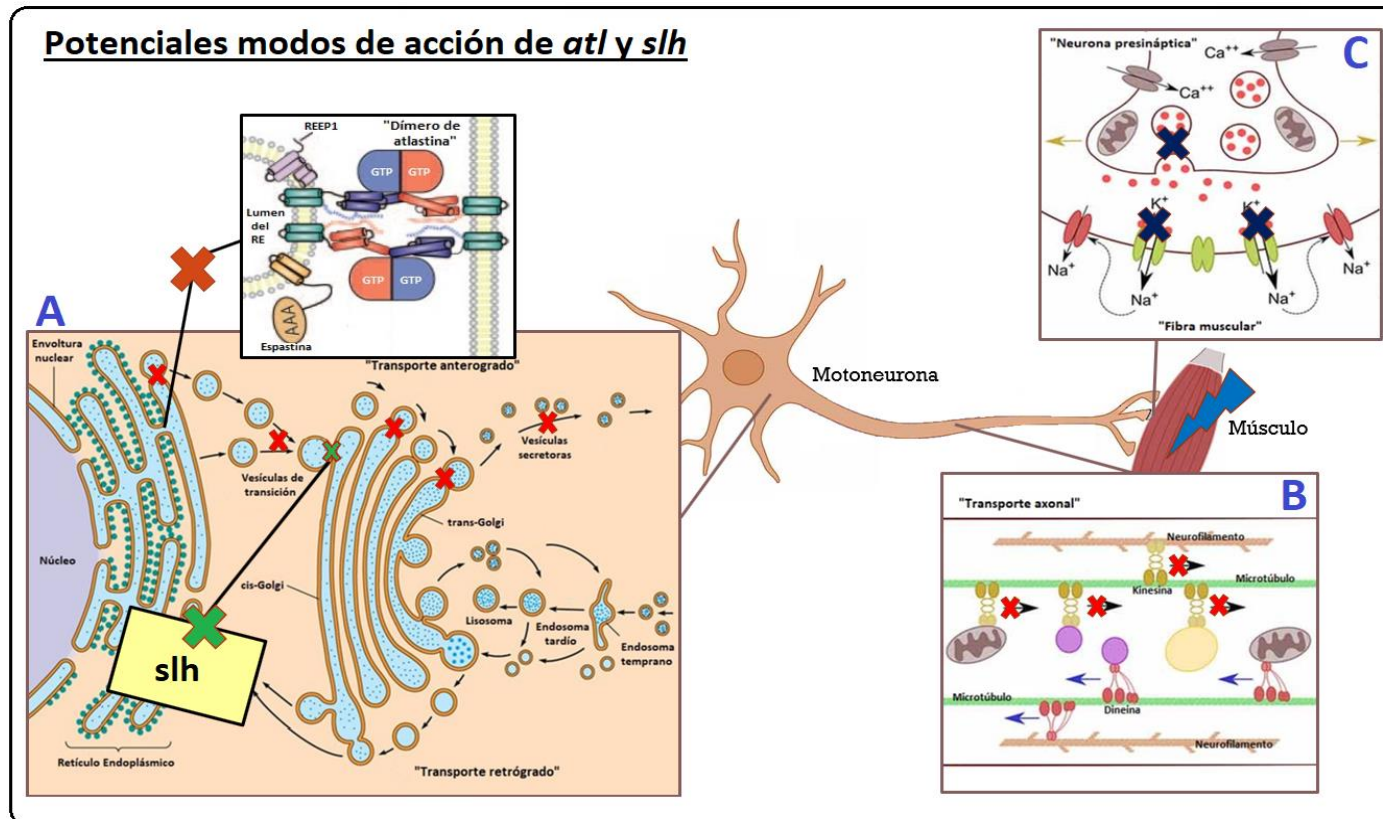
Como se muestra en la figura 25, es sabido que en una gran parte de las enfermedades neurodegenerativas afectando a las motoneuronas, como ocurre en el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS)<sup>68</sup>, cuando se altera el tráfico intracelular de los diferentes cargos celulares, inevitablemente se ve afectado el transporte de estos componentes a través del axón, lo que hace que la comunicación a larga distancia que ocurre desde el soma hasta los terminales presinápticos se vea afectada.

Considerando lo anterior, la disminución de la expresión de *atlastina* en las motoneuronas genera la pérdida de la fusión de las uniones de tres vías entre los túbulos de la membrana del RE, debido a defectos en la multimerización de esta proteína. Esto finalmente disminuiría el área superficial de la membrana de este organelo. Como consecuencia de este defecto, se produciría una alteración en el tráfico de vesículas de transición en la interfase RE-Golgi, lo que finalmente conllevaría a la producción de una menor cantidad de vesículas secretoras desde el trans-Golgi (figura 25, paso A). Además, esto afectaría el transporte anterógrado de los diferentes cargos celulares que ocurren a través del axón mediado por las kinesinas que se mueven a través de los microtúbulos y neurofilamentos (figura 25, paso B). Finalmente, todo esto haría que un menor número de vesículas sinápticas lleguen hasta las zonas activas de los terminales presinápticos, liberando así un menor número de

neurotransmisores al espacio sináptico (figura 25, paso C), alterando la comunicación neuronal con el músculo esquelético y produciendo la atrofia de este último.

Una situación similar ocurriría con *slh*, cuyas mutaciones inducirían defectos en el proceso de docking de las vesículas de transición que ocurre en el cis-Golgi y que es mediada por proteínas SNARE, lo cual produciría los consecuentes defectos en la comunicación neuronal y debilitamiento de las fibras musculares explicados anteriormente en el caso de *atlastina*.

Sin embargo, como se mencionó en el punto 6.3, se hace necesario plantear otras metodologías experimentales para determinar un posible efecto sinérgico entre *atlastina* y *slh* sobre la comunicación neuronal y transmisión sináptica.



**Figura 25.** Modelo propuesto para el modo de acción de *atlastina* y *slh* en la neurodegeneración axonal. La disminución de la expresión de *atl* en las motoneuronas induciría una disminución del área superficial de las membranas del RE debido a defectos en la fusión de las uniones de tres vías de los túbulos de este organelo, lo que a su vez afectaría la generación de las vesículas que emergen desde el RE (A), alterando el tráfico de cargos celulares a lo largo del axón neuronal (B). Finalmente, esto se vería traducido en una disminución del número de vesículas destinadas a su liberación en las zonas activas de los terminales presinápticos (C). Todos estos defectos en la comunicación neuronal producirían el característico debilitamiento de las fibras musculares observado en las PEH. Una situación similar ocurriría con la disminución de la expresión de *slh*, lo cual afectaría específicamente el docking de las vesículas en el cis-Golgi y, consecuentemente generar defectos en el transporte axonal, sinapsis neuromusculares y su comunicación con las fibras muscular.



Por tanto, este trabajo podría servir como base para profundizar en la investigación acerca de los efectos de las mutaciones de *atlastina* y como esta podría interactuar con distintos genes, dado que bajando la dosis de algunos de ellos se logra mejorar el fenotipo de *atlastina* y, posiblemente, dichas interacciones podrían explicar la expresividad variable observada en las PEH, así como el desarrollo temprano o tardío de esta enfermedad dado por la pérdida de función de estos potenciales candidatos.

## **7. CONCLUSIONES**

Atlastina sería necesaria para mantener la integridad de los axones motores y zonas activas de las sinapsis neuromusculares en las extremidades de moscas adultas, por lo que mutaciones que afecten su expresión serían suficientes para causar un fenotipo en las neuronas.

Se sugiere que la causa de la paraparesia espástica hereditaria (PEH) autosómica dominante pura dada por mutaciones en atlastina podría ser exclusivamente de origen neuronal, dado que al disminuir la expresión de este gen en neuronas motoras se producen defectos en el fenotipo motor de moscas adultas como consecuencia de la alteración de la transmisión sináptica que finalmente afecta los músculos de las extremidades.

Existen ciertas regiones del genoma de *Drosophila* que logran disminuir la expresividad de las PEH asociadas a la disminución de la expresión de atlastina y que podrían ser fundamentales para identificar genes que actúen como modificadores genéticos de la enfermedad.

Se sugiere que el gen homólogo a *sly-1 (slh)* podría actuar como un potencial modificador genético asociado a la disminución de la expresión de atlastina en motoneuronas, por lo que podría ser considerado como un potencial blanco terapéutico que permita reducir el grado de expresividad de este tipo de PEH.

## **8. PROYECCIONES**

Dentro de las proyecciones de este estudio nos planteamos:

Determinar los efectos de las mutaciones que afectan a atlastina sobre los componentes neuronales que den origen a los fenotipos morfológicos observados.

Mapear los genes presentes en aquellas deficiencias que logran rescatar los fenotipos motor y morfológico estudiados para identificarlos como potenciales blancos terapéuticos de las PEH originadas por alteraciones en la expresión de atlastina.

Realizar rescates fenotípicos de cada gen estudiado para determinar el grado de implicancia de cada uno sobre la expresividad de la enfermedad y las posibles vías de señalización involucradas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. González, C. & Couve, A. The axonal endoplasmic reticulum and protein trafficking: Cellular bootlegging south of the soma. *Semin. Cell Dev. Biol.* **27**, 23–31 (2014).
2. Collins, C. A. & DiAntonio, A. Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 35–42 (2007).
3. Bae, J. R. & Kim, S. H. Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* **50**, 237–246 (2017).
4. Bear, M., Connors, B. & Paradiso, M. *Neuroscience: exploring the brain*. Fourth edition (2016).
5. Tom Dieck, S., Sanmartí-Vila, L., Langnaesse, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K-H., Kämpf, U., Fränzer, J-T., Stumm, M., Garner, CG. & Gundelfinger, ED. Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.* **142**, 499–509 (1998).
6. Betz, A. *et al.* Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* **21**, 123–136 (1998).
7. Wang, Y., Liu, X., Biederer, T. & Sudhof, T. C. A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14464–14469 (2002).
8. Clarke, G. L. Presynaptic active zone density during development and synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 1–12 (2012).
9. Ferreira, A. & Paganoni, S. The formation of synapses in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* **26**, 69–79 (2002).
10. Schikorski, T. & Stevens, C. F. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* **17**, 5858–5867 (1997).
11. Ackermann, F., Waites, C. L. & Garner, C. C. Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. *EMBO Rep.* **16**, 923–938 (2015).
12. Lessing, D. & Bonini, N. Maintaining the Brain: Insight into Human Neurodegeneration From *Drosophila* Mutants. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 1–26 (2009).
13. Hirth, F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. *CNS Neurol. Disord. -Drug Targets* **9**, 504–523 (2010).
14. Simon, N. G., Huynh, W., Vucic, S., Talbot, K. & Kiernan, M. C. Motor neuron disease: Current

- management and future prospects. *Intern. Med. J.* **45**, 1005–1013 (2015).
15. Patten, SA., Armstrong, GAB., Lissouba, A., Kabashi, E., Parker, JA. & Drapeau, P. Fishing for causes and cures of motor neuron disorders. *Dis. Model. Mech.* **7**, 799–809 (2014).
  16. De Gregorio, C., Delgado, R., Ibacache, A., Sierralta, J. & Couve, A. Drosophila atlastin in motor neurons is required for locomotion and presynaptic function. *Journal of Cell Science.* **130**, 3507–3516 (2017).
  17. Noreau, A., Dion, P. A. & Rouleau, G. A. Molecular aspects of hereditary spastic paraplegia. *Exp. Cell Res.* **325**, 18–26 (2014).
  18. Soderblom, C. & Blackstone, C. Traffic accidents: Molecular genetic insights into the pathogenesis of the hereditary spastic paraplegias. *Pharmacol. Ther.* **109**, 42–56 (2006).
  19. Sanderson, CM., Connell, JW., Edwards, TL., Bright, NA., Duley, S., Thompson, A., Luzio, JP. & Reid, E. Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 307–318 (2008).
  20. Lee, Y., Paik, D., Bang, S., Kang, J., Chung, B., Lee, S., Bae, E., Chung, J. & Kim, J. Loss of spastic paraplegia gene atlastin induces age-dependent death of dopaminergic neurons in Drosophila. *Neurobiol. Aging* **29**, 84–94 (2008).
  21. Fink, J. K. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathological features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* **126**, 307–328 (2013).
  22. Zhang, Y., Roxburgh, R., Huang, L., Parsons, J. & Davies, T. C. The effect of hydrotherapy treatment on gait characteristics of hereditary spastic paraparesis patients. *Gait Posture* **39**, 1074–1079 (2014).
  23. Blackstone, C. Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 25–47 (2012).
  24. McNew, J. A., Sondermann, H., Lee, T., Stern, M. & Brandizzi, F. GTP-Dependent Membrane Fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 529–550 (2013).
  25. Liu, T.Y., Bian, X., Romano, FB., Shemesh, T., Rapoport, TA. & Hu, J. Cis and trans interactions between atlastin molecules during membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E1851–60 (2015).
  26. Bian, X., Klemm, RW., Liu, TY., Zhang, M., Sun, S., Sui, X., Liu, X., Rapoport, TA. & Hu, J. Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3976–81 (2011).

27. Rismanchi, N., Soderblom, C., Stadler, J., Zhu, P. P. & Blackstone, C. Atlastin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1591–1604 (2008).
28. Namekawa, M., Muriel, MP., Janer, A., Latouche, M., Dauphin, A., Debeir, T., Martin, E., Duyckaerts, C., Prigent, A., Depienne, C., Sittler, A., Brice, A. & Ruberg, M. Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 1–13 (2007).
29. Zhu, P. P., Patterson, A., Lavoie, B., Stadler, J., Shoeb, M., Patel, R. & Blackstone, C. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J. Biol. Chem.* **278**, 49063–49071 (2003).
30. Leonardis, L., Auer-Grumbach, M., Papić, L. & Zidar, J. The N355K atlastin 1 mutation is associated with hereditary sensory neuropathy and pyramidal tract features. *Eur. J. Neurol.* **19**, 992–998 (2012).
31. Guelly, C., Zhu, P-P., Leonardis, L., Papić, L., Zidar, J., Schabhuatl, M., Strohmaier, H., Weis, J., Strom, TM., Baetz, J., Willems, J., De Jonghe, P., Reilly, MM., Fröhlich, E., Hatz, M., Trajanoski, S., Pieber, TR., Janecke, AR., Blackstone, C. & Auer-Grumbach, M. Targeted high-throughput sequencing identifies mutations in atlastin-1 as a cause of hereditary sensory neuropathy type i. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 99–105 (2011).
32. Li, J., Yang, B., Si, H., Peng, X., Zhang, SL. & Hu, J. Atlastin regulates store-operated calcium entry for nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Sci. Rep.* **7**, 43490 (2017).
33. Zhu, P. P., Soderblom, C., Tao-Cheng, J. H., Stadler, J. & Blackstone, C. SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1343–1353 (2006).
34. Kasher, P. R., De Vos, KJ., Wharton, SB., Manser, C., Bennett, E., Bingley, M., Wood, JD., Milner, R., McDermott, CJ., Miller, CCJ., Shaw, PJ. & Grierson, AJ. Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients. *J. Neurochem.* **110**, 34–44 (2009).
35. Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, MH., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N. & Nave, K-A. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science (80- )*. **280**, 1610–1613 (1998).
36. Tarrade, A., Fassier, C., Courageot, S., Charvin, D., Vitte, J., Peris, L., Thorel, A., Mouisel, E., Fonknechten, N., Robolt, N., Seilhean, D., Dierich, A., Hauw, JJ. & Melki, J. A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3544–3558 (2006).

37. Jeibmann, A. & Paulus, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 407–440 (2009).
38. Lloyd, T. E. & Taylor, J. P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1184**, 1–25 (2010).
39. Ehmann, N., Oswald, D. & Kittel, R. J. *Drosophila* active zones: from molecules to behaviour. *Neurosci. Res.* (2017).
40. Van Vactor, D. & Sigrist, S. J. Presynaptic morphogenesis, active zone organization and structural plasticity in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **43**, 119–129 (2017).
41. Harris, K. P. & Littleton, J. T. Transmission, development, and plasticity of synapses. *Genetics* **201**, 345–375 (2015).
42. Génin, E., Feingold, J. & Clerget-Darpoux, F. Identifying modifier genes of monogenic disease: Strategies and difficulties. *Hum. Genet.* **124**, 357–368 (2008).
43. Orso, G., Pendin, D., Liu, S., Toso, J., Moss, T.J., Faust, J.E., Micaroni, M., Egorova, E., Martinuzzi, A., McNew, J.A. & Daga, A. Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase Atlastin. *Nature* **460**, 978–983 (2009).
44. Fassier, C., Hutt, J.A., Scholpp, S., Lumsden, A., Giros, B., Nothias, F., Schneider-Maunoury, S., Houart, C. & Hazan, J. Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat. Neurosci.* **13**, 1380–1387 (2010).
45. Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A. & Warner, T. T. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol.* **7**, 1127–1138 (2008).
46. O'Sullivan, N. C., Dräger, N. & O'Kane, C. J. Characterization of the *Drosophila* Atlastin Interactome Reveals VCP as a Functionally Related Interactor. *J. Genet. Genomics* **40**, 297–306 (2013).
47. Lee, M., Paik, S.K., Lee, M.-J., Kim, Y.-J., Kim, S., Nahm, M., Oh, S.-J., Kim, H.-M., Yim, J., Lee, C.J., Bae, Y.C. & Lee, S. *Drosophila* Atlastin regulates the stability of muscle microtubules and is required for synapse development. *Dev. Biol.* **330**, 250–262 (2009).
48. Sreedharan, J., Neukomm, L. J., Brown, R. H. & Freeman, M. R. Age-dependent TDP-43-mediated motor neuron degeneration requires GSK3, hat-trick, and xmas-2. *Curr. Biol.* **25**, 2130–2136 (2015).
49. White, K. E., Humphrey, D. M. & Hirth, F. The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Front. Neurosci.* **4**, 1–12 (2010).

50. Danjo, R., Kawasaki, F. & Ordway, R. W. A tripartite synapse model in *Drosophila*. *PLoS One* **6**, 2–7 (2011).
51. Maqbool, T., Soler, C., Jagla, T., Daczewska, M., Lodha, N., Payillil, S., VijayRaghavan, K. & Jagla, K. Shaping leg muscles in *Drosophila*: Role of landybird, a conserved regulator of appendicular myogenesis. *PLoS One* **1**, (2006).
52. Nogueira, C., Erlman, P., Villeneuve, J., Santos, A., Martínez-Alonso, E., Martínez-Menárguez, JA. & Malhotra, V. SLY1 and syntaxin 18 specify a distinct pathway for procollagen VII export from the endoplasmic reticulum. *Elife* **2014**, 1–22 (2014).
53. Lira, G. O. Rastreo de genes implicados en las paraplejas espásticas hereditarias asociadas a atlastina en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Grado (2015).
54. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15 (1993).
55. Duffy, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1–15 (2002).
56. Soler, C. Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development* **131**, 6041–6051 (2004).
57. Chyb, S. & Gompel, N. Atlas of *Drosophila* Morphology. First Edition *Academic Press Books of Elsevier* (2013).
58. Wucherpfennig, T., Wilsch-Bräuninger, M. & González-Gaitán, M. Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* **161**, 609–624 (2003).
59. Wu, K.-Y. He, M., Hou, Q.-Q., Sheng, A.-L., Yuan, L., Liu, F., Liu, W.-W., Li, G., Jiang, X.-Y. & Luo, Z.-G. Semaphorin 3A activates the guanosine triphosphatase Rab5 to promote growth cone collapse and organize callosal axon projections. *Science Signaling*. **7**, 1–27 (2015).
60. Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K.-I., Nakajima, K., Nabeshima, Y.-I. & Hoshino, M. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron* **67**, 588–602 (2010).
61. Xu, Y. Halievski, K., Henley, C., Atchinson, WD., Katsuno, M., Adachi, H., Sobue, G., Breedlove, SM. & Jordan, CL. Defects in Neuromuscular Transmission May Underlie Motor Dysfunction in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J. Neurosci.* **36**, 5094–5106 (2016).
62. Ikenaka, K. Katsuno, M., Kawai, K., Ishigaki, S., Tanaka, F. & Sobue, G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1225–1238 (2012).



63. Bayat, V., Jaiswal, M. & Bellen, H. J. The BMP signaling pathway at the *Drosophila* neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 182–188 (2011).
64. Koles, K. & Budnik, V. Exosomes go with the Wnt. *Cell. Logist.* **2**, 169–173 (2012).
65. Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N. & Budnik, V. Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless. *Cell* **139**, 393–404 (2009).
66. Snow, P. M., Bieber, A. J. & Goodman, C. S. Fasciclin III: A novel homophilic adhesion molecule in *Drosophila*. *Cell* **59**, 313–323 (1989).
67. Li, Y., Gallwitz, D. & Peng, R. Structure-based functional analysis reveals a role for the SM protein Sly1p in retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3951–3962 (2005).
68. De Vos, K. J. & Hafezparast, M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiol. Dis.* **105**, 283–299 (2017).
69. Barone, M. C. & Bohmann, D. Assessing Neurodegenerative Phenotypes in *Drosophila* Dopaminergic Neurons by Climbing Assays and Whole Brain Immunostaining. *J. Vis. Exp.* 1–5 (2013).

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Evaluación de función motora: Ensayos de escalada

Los ensayos de escalada realizados previamente en nuestro laboratorio para identificar aquellas deficiencias candidatas que fueran capaces de modificar el fenotipo motor asociado a la disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas<sup>53</sup>, fueron adaptados del protocolo de Barone y Bohmann (2013)<sup>69</sup>, donde primero se seleccionaron las moscas del genotipo deseado (de 5 y 15 días de edad) o de la descendencia resultante de la cruce de dos cepas de moscas, las cuales se mantuvieron en grupos de 20 a 30 animales en tubos con comida fresca que fueron renovados cada 2 a 3 días.

Posteriormente, treinta minutos antes del ensayo de escalada, se anestesiaron 15 moscas (hembras) con CO<sub>2</sub> y se dispusieron en tubos plásticos rotulados hechos con dos viales vacíos unidos por su apertura con cinta adhesiva transparente, los que además fueron marcados a una altura de 2 centímetros desde su base.

Una vez hecho esto, se adhirieron 10 tubos, lo más cercanos posible, en una base de plumavit que sirvió de contraste para observar cómo las moscas escalaban.

El registro de estos ensayos se realizó con una cámara digital dispuesta frente a los tubos conteniendo los distintos genotipos de moscas a evaluar, a una distancia de 20 a 30 cm de los mismos.

Para el ensayo de escalada, propiamente tal, se golpeó la base con los tubos de forma tal que las moscas se acumularan en el fondo de los mismos, luego de lo cual se cronometró un minuto para dejar que las moscas se movieran libremente. Esto se realizó de manera secuencial 10 a 11 veces para completar el ensayo.

Por último, el registro de la cámara digital nos permitió realizar un conteo de todas aquellas moscas que lograran escalar por sobre los 2 centímetros, indicados por la marca realizada a los tubos anteriormente, después de 3 segundos por cada vez que se golpeó la base con los tubos. De esta forma, a los datos obtenidos en estos 10 conteos por genotipo se les calculó un promedio referido como un porcentaje del

número total de moscas en el tubo que fueron capaces de subir sobre la marca (% actividad de escalada).

Para validar los resultados obtenidos en las pruebas de función motora, se evaluó la significancia estadística entre los diferentes genotipos estudiados, para lo cual cada uno de estos fue comparado con el control respectivo utilizado en los ensayos de escalada. Para ello, se hizo uso del programa estadístico GraphPad Prism 6, realizando un análisis de la varianza (ANOVA) basado en el test de comparaciones múltiples de Dunnet, que nos permitió comparar cada uno de los genotipos resultantes con el genotipo control.

Stock	Origen
C380-Gal4	Universidad de Massachusetts (UMASS)
C380-Gal4; dsRNA <i>atf</i> / CyO	Laboratorio Jimena Sierralta. Facultad de Medicina. Universidad de Chile
yw; mCD8-GFP	Laboratorio Jorge Campusano. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Católica
w;; UAS-mCD8-RFP	Laboratorio Álvaro Glavic. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile
yw;; MHC-GFP	Bloomington Stock Center 38463
UAS-BRP-GFP	Bloomington Stock Center 35848
w1118; Df(2L) BSC256 / CyO	Bloomington Stock Center 23156
w1118; Df(2L) Exel8038 / CyO	Bloomington Stock Center 7840
w1118; Df(2L) BSC227 / CyO	Bloomington Stock Center 9704
w1118; Df(2L) Exel7011 / CyO	Bloomington Stock Center 7783
lf / CyO; Mkrs / tm6b	Laboratorio Jimena Sierralta. Facultad de Medicina. Universidad de Chile
dsRNA <i>slh</i>	VDRC 51840

**Anexo 2.** Stocks de moscas y su respectivo origen (cuando corresponda) empleados para el diseño de las moscas indicadas en el punto 4.2

**OBJETIVO 1:**

1.	♀ C380-Gal4	x	♂ mCD8-GFP	→	C380-Gal4; mCD8-GFP
2.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ mCD8-GFP	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / mCD8-GFP
3.	♀ C380-Gal4	x	♂ MHC-GFP	→	C380-Gal4;; MHC-GFP
4.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ MHC-GFP	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> ; MHC-GFP

**OBJETIVO 2:**

1.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ mCD8-RFP	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> ; mCD8-RFP
2.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO; mCD8-RFP/ tm6b	x	♂ Df(2L) / CyO	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / Df(2L); mCD8-RFP
3.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ MHC-GFP	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> ; MHC-GFP
4.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO; MHC-GFP/ tm6b	x	♂ Df(2L) / CyO	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / Df(2L); MHC-GFP

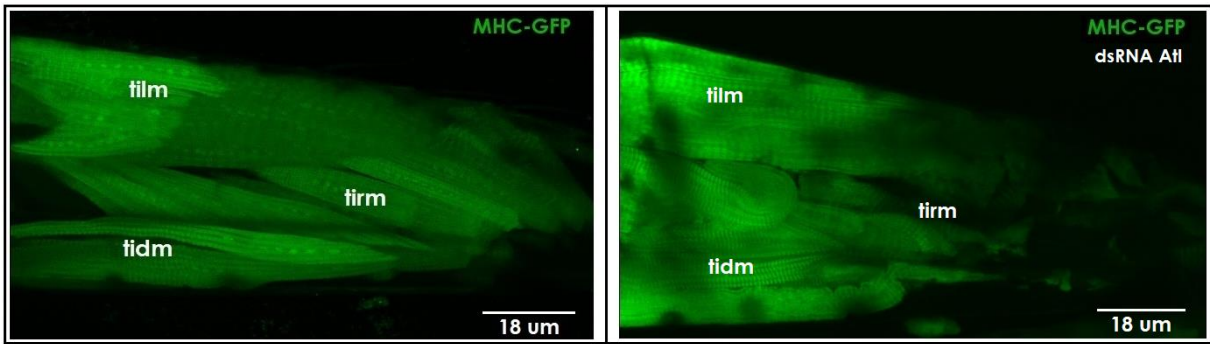
**OBJETIVO 3:**

1.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ mCD8-RFP	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> ; mCD8-RFP
2.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO; mCD8-RFP/ tm6b	x	♂ dsRNA <i>slh</i> / CyO	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / dsRNA <i>slh</i> ; mCD8-RFP
3.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ MHC-GFP	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> ; MHC-GFP
4.	♀ C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / CyO; MHC-GFP/ tm6b	x	♂ dsRNA <i>slh</i> / CyO	→	C380-Gal4; dsRNA <i>atl</i> / dsRNA <i>slh</i> ; MHC-GFP

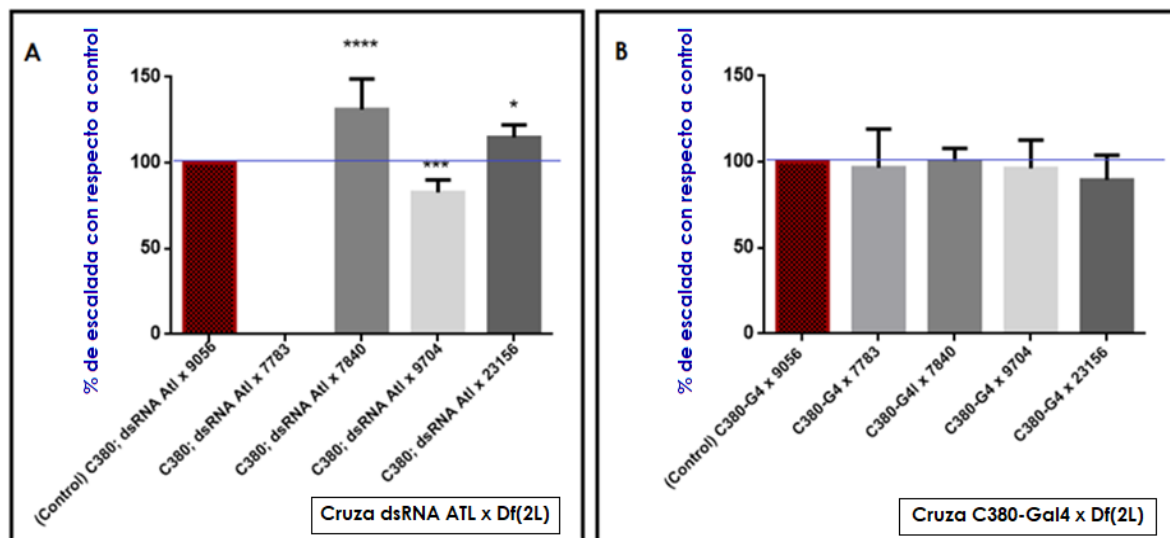
**Anexo 3.** Cruzamientos generales realizados para la obtención de los diferentes genotipos de moscas empleadas para cada objetivo en este trabajo. Df(2L) corresponde a cada una de las deficiencias empleadas (Df23156, Df7840, Df9704 y Df7783).

1.	♀ If / CyO; Mkrs / tm6b	x	♂ mCD8-RFP	→	2 / CyO; mCD8-RFP / tm6b
	♀ If / CyO; Mkrs / tm6b	x	♂ 2 / CyO; mCD8-RFP / tm6b	→	<b>If / CyO; mCD8-RFP / tm6b</b>
2.	♀ If / CyO; Mkrs / tm6b	x	♂ MHC-GFP	→	2 / CyO; MHC-GFP / tm6b
	♀ If / CyO; Mkrs / tm6b	x	♂ 2 / CyO; MHC-GFP / tm6b	→	<b>If / CyO; MHC-GFP / tm6b</b>
3.	♀ dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ If / CyO; mCD8-RFP / tm6b	→	<b>dsRNA <i>atl</i> / CyO; mCD8-RFP / tm6b</b>
4.	♀ dsRNA <i>atl</i> / CyO	x	♂ If / CyO; MHC-GFP / tm6b	→	<b>dsRNA <i>atl</i> / CyO; MHC-GFP / tm6b</b>

**Anexo 4.** Cruzamientos para la obtención de los diferentes stocks de moscas utilizados como base para la generación de las cruzas mostradas en el anexo 2. En negrita se muestra el stock final obtenido de cada cruzada indicada con un número.



**Anexo 5.** Musculatura de extremidades de adultos de *Drosophila* de 15 días de edad con disminución de la expresión de *atl* en motoneuronas. Los diferentes músculos de la región del fémur se encuentran marcados con miosina de cadena pesada asociada a GFP (MHC-GFP). Los paneles de la derecha muestran extremidades de moscas portando un dsRNA que tiene como blanco a *atl* en motoneuronas y los paneles de la izquierda sus respectivos controles C380-Gal4. **film**: músculo elevador de la tibia, **tidm**: músculo depresor de la tibia, **tirm**: músculo reductor de la tibia.



**Anexo 6.** Porcentaje de escalada de adultos de *D. melanogaster* de 5 días de edad, que muestra las deficiencias seleccionadas para el estudio de neurodegeneración asociado a la disminución de la expresión de *atl*. **A)** se indica el fenotipo motor de cada deficiencia asociada a la disminución de la expresión de atlastina; **B)** se indica el fenotipo motor de cada deficiencia por sí sola y sin asociación a la disminución de la expresión de atlastina. Según la nomenclatura de Bloomington Stock Center, las deficiencias 7994 (control), 7783, 7840, 9704 y 23156 corresponden a las deficiencias Df(3R) Exel9056, Df(2L) Exel7011, Df(2L) Exel8038, Df(2L) BSC227 y Df(2L) BSC256, respectivamente. Datos se encuentran normalizados respecto al control.