



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Proyecto de tesis de Maestría

Titulado:

**“Evaluación de mutantes de *Drosophila melanogaster* en *latrofilina*,
teneurina y *Malvolio* como modelos para el trastorno por déficit de
atención con hiperactividad”.**

Que presenta:

Lic. Psic. Hernández Guzmán David Antonio

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Neurobiología Celular y Molecular

Directores:

Dr. Boucard Antony A. (Depto. Biología Celular)

Dr. Missirlis Fanis (Depto. Fisiología Biofísica y Neurociencias)

Índice

Agradecimientos	4
Dedicatorias	5
Resumen:.....	6
Abstract:.....	7
1. Introducción:	8
1.1 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad.....	8
1.2 El hierro y su transportador DMT-1 (Malvolio)	10
1.3 El papel de la interacción entre Latrofilinas y Teneurinas en el desarrollo sináptico.....	12
1.4 Las latrofilinas y su relación con el TDAH.....	16
1.5 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio para el TDAH.....	17
2.0 Justificación:	22
3.0 Hipótesis:.....	23
4.0 Objetivos:	23
4.1 Generales.....	23
4.2 Específicos	23
5.0 Métodos:	24
5.1 Cepas de <i>Drosophila</i>	24
5.2 Isogenización de cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
5.3 Evaluación conductual.....	27
5.3.2 Perfil de actividad de las moscas “ <i>Drosophila Activity Monitor System</i> ”	27
5.4 PCRs de tiempo real	27
5.5 Aislamiento, Amplificación y Purificación de vectores de expresión (Métodos con ADN)..	29
5.5.1 Transformación de bacterias por el método de choque térmico	29
5.5.2 Crecimiento de bacterias.....	29
5.5.3 Extracción y purificación de vectores.....	30
5.6 Construcción de vectores de expresión por el método de extensión por iniciadores para ensayo de reconstitución de GFP (Clyn View).....	30
5.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	35
5.8 Extracción de fragmentos del gel y purificación de ADN.	36
5.9 Digestión con enzimas de restricción	36

8.4 Preparación de muestras para microscopía confocal.....	38
8.5 Microscopía confocal	38
10. Resultados:	39
10.1 Generación de cepas mutantes isogénicas.	39
10.2 Los elementos P insertados en el genoma de las cepas mutantes alteran la expresión de los genes de interés.....	39
10.3 Las mutaciones en <i>Lphn</i> , <i>Ten-m</i> y <i>Mvl</i> no alteran los ritmos circadianos pero sí incrementan la actividad de las moscas.....	42
.....	44
10.4 Herramientas moleculares para el estudio de la interacción Lphn y Ten in vitro.....	45
10.5 Amplificación, extracción y purificación de vectores de expresión	45
10.6 PCR para mutagénesis por el método de extensión con iniciadores	49
10.7 <i>Ten-m</i> se expresa en el SNC, los lóbulos ópticos y los órganos cordotonales de <i>Drosophila melanogaster</i>	52
11. Discusión:.....	55
11.1 Caracterización genética y conductual.....	55
11.2 Construcción de vectores de expresión.	59
11.3 Patrón de expresión de <i>Ten-m</i> en larvas y en el cerebro de la mosca adulta.....	62
12. Conclusiones.....	65
13. Perspectivas.....	66
14. Referencias	67
Apéndice. Evaluación inicial de la salud general de las mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	74

Agradecimientos

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca No. 298900 durante el período de septiembre del 2013 a agosto del 2015 para la realización de mis estudios de que concluyen con esta tesis, como producto final de la Maestría en ciencias con especialidad en Neurobiología Celular y Molecular en el CINVESTAV.

Por todo el apoyo brindado y sus conocimientos para guiarme en el desarrollo de mi proyecto de investigación, así como por las discusiones que me permitieron ver más allá de lo planteado en el ámbito académico y personal, agradezco a mis tutores Dr. Antony Boucard y Dr. Fanis Missirlis

Agradezco también a Beatriz Osorio Carranza y Benjamín Muñoz Ramírez por el apoyo constante brindado sin el cual mi proyecto aún estaría en etapas intermedias de su desarrollo y a mi comité tutorial los Doctores José Antonio Arias M. y Gerardo Contreras P. por las revisiones precisas del proyecto y por sus comentarios oportunos, pertinentes a mi proyecto y mi desarrollo profesional.

Finalmente agradezco a mis compañeros de laboratorio y amigos Carlos A. Tejeda Guzmán, Tharse Pathmanathan y Johana Vázquez Procopio por los momentos vividos y por las experiencias compartidas que nos ha traído este camino, además, por los consejos y conocimientos proporcionados durante todo el recorrido.

Dedicatorias

*A mis papás,
Porque siempre han alentado mis sueños
y son a su vez mis maestros de vida.
¡Los quiero!*

*A mis hermanos,
que son mi ejemplo en los buenos y los malos momentos.*

*A mis amigos de maestría,
con quienes comparto mis sueños y metas*

Resumen:

El déficit de atención con hiperactividad (TDAH) es un desorden neuropsiquiátrico heredable y de alta prevalencia, caracterizado por la coexistencia de dificultades de atención, impulsividad e hiperactividad. Hasta la fecha, las causas y los mecanismos celulares que subyacen al desorden no se entienden completamente, sin embargo se cree que factores genéticos y ambientales juegan un papel en el inicio del trastorno. Recientemente se describió que mutaciones en el gen de la latrofilina (*Lphn*), un miembro de la familia de receptores de adhesión acoplados a proteína G (aGPCRs), causan alteraciones de la función dopaminérgica. En mamíferos *Lphn* interactúa con la proteína de adhesión Teneurina (*Ten*) para formar contactos célula-célula. Ambas moléculas se han relacionado con la función y estabilidad sináptica. Por lo anterior es interesante investigar si la interacción mediada por éste par molecular se relaciona con los mecanismos homeostáticos del hierro. Utilizamos como modelo a *Drosophila melanogaster* debido a la gran cantidad de herramientas que se tienen para su manipulación genética y conductual y debido a que éste organismo tiene solo un gen de *Lphn* y de *Ten* (en contraste con 3 y 4 genes, respectivamente, en mamíferos). En el laboratorio contamos con una cepa mutante en el gen *Malvolio* (*Mvl*) que depleta los almacenes de hierro. En este trabajo, se hizo una caracterización de la expresión génica y conductual de cepas mutantes en *Lphn*, *Ten* y *Mvl*. Para evaluar la interacción de *Lphn*-*Ten* en *Drosophila* se diseñaron construcciones plasmídicas para ensayos de adhesión *in vitro*. Por último, describimos un patrón de expresión de *Ten* de *Drosophila* prominente en las células fotorreceptoras de la larva y de la mosca adulta, así como en las células escolopoidales de los órganos cordotonaes. El patrón de expresión descrito consistente con la reciente descripción del patrón de expresión de *Lphn* en las neuronas sensoriales de los órganos cordotonaes, que representan un órgano del sistema nervioso periférico donde estas dos moléculas de adhesión podrían interactuar físicamente.

Abstract:

Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) is a heritable neuropsychiatric disorder of high prevalence characterized by the coexistence of difficulties in attention, impulsivity and hyperactivity. To date, the causes and cellular mechanisms underlying the disease are not fully understood, however it is thought that genetic and environmental factors play a role in the onset of the disorder. For example, alterations in iron homeostasis, dopamine transport and also mutations in *Latrophilin* (*Lphn*), a member of the G protein-coupled adhesion receptor (GPCR) family, are all associated with the disease. In mammals, *Lphn* interacts with Teneurin (*Ten*), a type II adhesion molecule, to establish cell-cell contacts. Both adhesion proteins are related to synaptic function and stability. Here, we ask whether the *Lphn*-*Ten* interaction is conserved in *Drosophila* and whether cellular and systemic iron homeostasis affects the neuronal functions of this protein pair. *Drosophila melanogaster* was used as the model system due to the genetic and behavioral tools available and because this organism only has one *Lphn* and *Ten* gene in contrast to three and four, respectively, in mammals. We characterized gene expression and behavioral activity in mutant strains of *Lphn*, *Ten* and *Mvl*. To evaluate the physical interaction between the *Drosophila* *Lphn*-*Ten* pair *in vitro*, we designed respective plasmid constructs based on the split-GFP technology. Finally, we described the expression pattern of *Ten* in photoreceptor cells and in scolopodial cells in the chordotonal organs, in both adults and larvae of *Drosophila*. Scolopodial cells are adjacent to the sensory neurons of the chordotonal organ, where *Lphn* expression was recently described, suggesting a potential site for the *Lphn*-*Ten* interaction in the insect peripheral nervous system.

1. Introducción:

1.1 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad

El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH, por sus siglas en Inglés) es un desorden psiquiátrico con origen en defectos del neurodesarrollo que afecta la capacidad de quienes lo padecen para participar en actividades sociales cotidianas (Sroubek et al., 2013). Es comúnmente diagnosticado en la niñez, con una tasa de prevalencia de 3-5% en diferentes grupos culturales (Lange et al., 2012), aunque cerca del 30-50% de las personas diagnosticadas en la niñez continúan demostrando síntomas en la edad adulta (Geisler y Lesch, 2011; Kooij et al., 2010). Este desorden se caracteriza por la coexistencia de problemas de atención e hiperactividad así como incrementos en los niveles de impulsividad y falta de regulación emocional. De acuerdo con estudios epidemiológicos, muchos pacientes con TDAH también cursan con otras condiciones psiquiátricas como desórdenes de conducta y de ansiedad (Spencer, 2006; Jensen et al., 2001) todo lo cual resulta en afecciones a múltiples dominios del estilo de vida y al bienestar subjetivo de las personas que lo padecen (Danckaerts et al., 2010; Brod et al., 2011).

A pesar de ser el desorden psiquiátrico más comúnmente diagnosticado y estudiado, sus causas y tratamiento son controvertidas debido a la convergencia de factores genéticos y ambientales en su desarrollo (Schonwald y Lechner, 2006); sin embargo, estudios farmacológicos, estudios de asociación genética y estudios en modelos animales han implicado consistentemente defectos en sistemas de neurotransmisión y defectos en la conectividad del sistema nervioso central (SNC) en la neurobiología del trastorno (Faraone et al., 2005; Schonwald et al., 2006; Sroubek et al., 2013; Russel, 2011). Su heredabilidad es mayor al 80% en numerosas estudios familiares y de gemelos, (Faraone et al., 2005; Romanos et al., 2008), lo que indica que los defectos genéticos están fuertemente implicados en su etiología. Las bases genéticas de la mayoría de casos de TDAH es compleja e involucran algunos genes candidatos relacionados con las vías dopaminérgicas y serotoninérgicas (*i.e. DAT1, DBH, DRD4, DRD5, MAO, 5HTT*) (Faraone et al., 2005; Schonwald et al., 2006; Elia y Devoto, 2007; Oades, 2007; Gizer et al, 2009), por lo que se usan estimulantes de la función monoaminérgica como el metilfenidato (MPH) e inhibidores de la recaptura de

noradrenalina (NA) como la atomoxetina, en el tratamiento del TDAH, lo que evidencia que estas vías son importantes en la etiología del trastorno (Montañes-Rada et al., 2009).

Entre las causas ambientales del TDAH, se ha considerado la deficiencia de hierro (Konofal et al, 2004; Cortese et al., 2012; Adisetiyo et al., 2014). Así, niños con TDAH tienen baja ferritina sérica, que es la encargada de almacenar hierro (Konofal et al., 2007; Cortese et al., 2009; Cortese et al., 2012) y pacientes con TDAH tienen bajo contenido de hierro en el sistema nervioso central (SNC) según se detecta por resonancia magnética nuclear (Adisetiyo et al., 2014). Estas evidencias sugieren que el hierro puede ser un biomarcador del TDAH.

El hierro es esencial para la función neurológica debido a su rol en el metabolismo oxidativo y en la síntesis de monoaminas, sustancias involucradas en procesos de atención emoción y movimiento entre otros, ya que éstas son sintetizadas por enzimas dependientes de hierro para su función (i.e. tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, fenilalanina-hidroxilasa) (Hare et al., 2013). La deficiencia de hierro aumenta la cantidad de monoaminas en el espacio extracelular (Beard et al., 1994; Burhans et al., 2005; Bianco et al., 2008) y disminuye la densidad de receptores a dopamina (Erikson et al., 2001) y del transportador de dopamina DAT-1 (Erikson et al., 2000); dichos cambios se asocian con defectos conductuales en las áreas motora, cognitiva y emocional tanto en modelos animales (Erikson et al., 2000; Beard et al., 2002; Yodium; 2008) como en humanos (Lozzoft et al., 2006 y Lozzoft 201; Yodium, 2008) y con la expresión de genes importantes en la función de circuitos dopaminérgicos (Jellen et al., 2013). Recientemente además se sugirió una respuesta celular al hierro ya que en experimentos con células en cultivo se demostró una respuesta dosis-dependiente entre la quelación del hierro en el medio de cultivo y la disminución de la expresión del transportador de dopamina (DAT) (Weisinger et al., 2007) y del receptor a dopamina D2 (Unger et al., 2008). Otros estudios han mostrado que la deficiencia de hierro puede inducir cambios en la expresión de genes en el SNC implicados en la morfogénesis dendrítica, la señalización por glutamato y la sinaptogénesis (Clardy et al., 2006; Carlson et al., 2007), sin embargo el mecanismo neurobiológico detrás del rol que juega el hierro en estas alteraciones aún requiere de más investigación.

Los datos anteriores sugieren las alteraciones en el nivel de hierro en el organismo, impactan en el desarrollo sináptico y que pueden jugar un papel crítico en la aparición del TDAH.

1.2 El hierro y su transportador DMT-1 (Malvolio)

El hierro es una de las sustancias inorgánicas más importantes para la vida ya que es necesario para reacciones biológicas fundamentales como el transporte de oxígeno (i.e. hemoglobina), la respiración celular, la generación de energía (i.e. citocromos), la síntesis de ADN (i.e. reductasa de ribonucleótidos) y de neurotransmisores (i.e. tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, fenilalanina-hidroxilasa; Revisado en Beard; 2001). Sin embargo, el hierro también es potencialmente tóxico para las células porque participa en la producción catalítica de radicales libres con peróxidos a través de la reacción de Fenton (Beard et al., 2001). Por estas razones la absorción del hierro y su concentración en órganos y tejidos debe ser regulada estrictamente. Muy poco hierro puede ser causa de desórdenes como la anemia y el hierro en exceso puede ocasionar daño a los tejidos.

En los mamíferos y algunos insectos como *Drosophila melanogaster*, la concentración de hierro en el cuerpo se regula principalmente a nivel de su absorción intestinal. El hierro inorgánico o en su forma hemo cruza a través de los enterocitos y es capturado por la proteína transportadora llamada *transferrina* (Conrad y Umbreit 2000; Conrad et al., 2000; Mandilaras et al., 2013).

El hierro inorgánico es transportado por el transportador divalente de metales (DMT-1) (Gunshin et al., 1997; Illing et al., 2012), proteína asociada a la resistencia natural de los macrófagos (*Nramp2* por sus siglas en inglés), se identificó por primera vez en 1995 en un tamizaje genético que intentaba encontrar homólogos de *Nramp1*, un gen de mamíferos relacionado con la atenuación de la proliferación de patógenos intracelulares en los macrófagos). El DMT-1 tiene mayor afinidad por el hierro que para otros metales (Illing et al., 2012) y acopla el transporte de protones al transporte del hierro (Gunshin et al., 1997; Mackenzie et al., 2007). Se le predicen 12 segmentos transmembranales en donde los extremos N y C terminal se encuentran en el lado citosólico. Posee un sitio de glicosilación

entre los dominios transmembranales 7 y 8 y una secuencia consenso de transporte en la 4^o asa intracelular (Gunshin et al., 1997) (*Fig. 1*).

La eliminación genética o las mutaciones en el DMT-1 que lo inactivan, disminuyen la absorción del hierro e inducen la anemia microcítica severa (Gunshin et al., 2005; Flemming et al., 1997,1998).

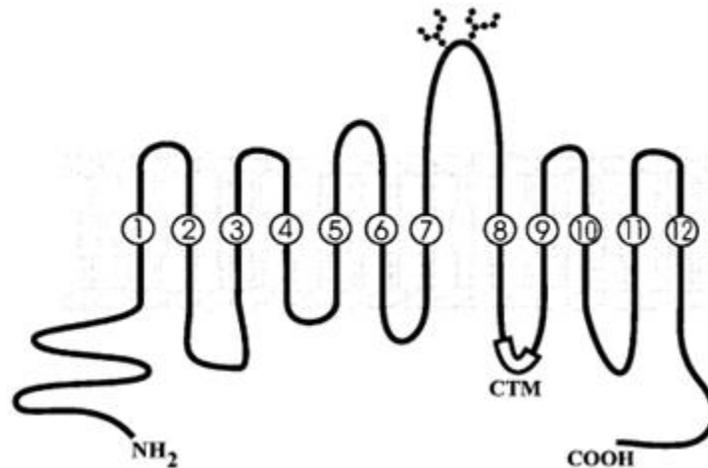


Figura 1.- Modelo de doce dominios transmembrana de la proteína DMT-1. Se indican los dominios con los números del 1 al 12. El motivo consenso de transporte se indica como (CTM) en el cuarto bucle intracelular, y el dominio con sitios de N-glicosilación se muestran en la 4^o asa extracelular (Modificado de Gunshin et al., 1997).

Malvolio es el nombre asignado al homólogo del gen DMT-1 en *Drosophila melanogaster*. La mutación de *Malvolio* disminuye los almacenes de hierro (Bettedi et al., 2011), suprime la acumulación de hierro en el intestino causada por un *RNAi* de ferritina (Tang et al., 2013) e induce la pérdida de la preferencia por el azúcar, y este fenotipo se puede rescatar por la exposición a un exceso de hierro dietético (Orgad et al., 1998).

1.3 El papel de la interacción entre Latrofilinas y Teneurinas en el desarrollo sináptico

Las neuronas son un tipo de células altamente diferenciadas del sistema nervioso cuyas principales características son la excitabilidad eléctrica de su membrana plasmática y su especialización para la recepción de estímulos y conducción de impulsos nerviosos (Kandel et al., 2000; Squire et al., 2008). Para llevar a cabo sus funciones, las neuronas deben formar redes complejas en las que cada una se comunica con otras a través de estructuras especializadas llamadas sinapsis (Giagtzoglou, 2009). La complejidad y especificidad de la generación de sinapsis específicas depende de la formación de contactos iniciales, su maduración y modificación posterior, proceso conocido como plasticidad funcional (Giagtzoglou, 2009; Missler et al., 2012; Benson y Huntley, 2012). Errores en la adhesión resultan en alteraciones del neurodesarrollo.

Se han descrito y estudiado muchas moléculas de adhesión sináptica, incluyendo a las neurexina, neuroliginas, cadherinas, NCAM's, etc.; Giagtzoglou, 2009; Shapiro et al., 2007) estas moléculas se han conservado evolutivamente y juegan un papel en la formación y el mantenimiento de las sinapsis.

Las latrofilinas (*Latrofilinas*) son moléculas de adhesión celular que se han conservado en invertebrados y que se han relacionado con la formación de las sinapsis (Meza-Aguilar et al., 2014) pero sus interacciones no han sido caracterizadas completamente. Las latrofilinas son moléculas de la subfamilia de receptores de adhesión de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que contienen una secuencia extracelular larga compuesta de un dominio de lectina N-terminal, un dominio central tipo olfactomedina, un dominio rico en serina/threonina, un dominio de unión a hormonas y un dominio GAIN que contiene un motivo GPS de autoproteólisis; en su región C-terminal comprende los siguientes dominios: una región de siete pasos transmembranales (7TM) y una cola citoplásmica que contiene un motivo de unión a PDZ (Sugita, 1998; Araç et al., 2012) (Fig.1), dicho arreglo modular le confiere la potencial capacidad de generar interacciones también en forma modular; hasta la fecha, sin embargo, la función biológica de las latrofilinas no es clara. *Latrofilinas* son parte de una familia aun no explorada de receptores que comprende 3 isoformas (Lphn1-3), que se identificaron inicialmente como receptores para α -latrotoxina (Sugita, 1998; Lelianova, et al., 1997) , un componente del

veneno de la araña viuda negra capaz de generar exocitosis en las neuronas y células neuroendocrinas (Rosenthal y Meldolesi, 1989), lo que sugiere una función para *Latrofilinas* en la regulación sináptica. Estudios de microscopía inmunoelectrónica y análisis de inmunodetección en sinapsis purificadas de neuronas de hipocampo han mostrado que *Latrofilinas* están enriquecidas en el cerebro y particularmente en los sitios de contacto sináptico donde pueden inducir señales de Ca^{2+} en los botones pre sinápticos (Silva et al., 2011); además, además se expresan desde los primeros días postnatales y alcanza su pico en la edad adulta (Boucard et al., 2014) indicando que pueden tener una importante función en la regulación de la actividad sináptica en el cerebro en desarrollo y adulto. Recientemente, mediante análisis bioquímicos de tejido cerebral, se identificó a las *Teneurinas* (una familia de glucoproteínas tipo II de adhesión expresadas en neuronas) como ligandos endógenos específicos para *Latrofilinas* a través de su interacción con el dominio de Lectina (O'Sullivan et al., 2012; Silva et al., 2011; Boucard et al., 2014) (Fig. 1). Estos hallazgos y el hecho de que los ligandos endógenos de *Latrofilinas* pertenezcan a la familia de las moléculas de adhesión sugiere que las éstas juegan un papel importante en la adhesión célula-célula y señalización (Silva et al., 2011; O'Sullivan et al., 2012; Boucard et al., 2012; Boucard et al., 2014); de hecho en fechas recientes se ha demostrado la propensión estructural de las *Latrofilinas* para moderar interacciones celulares (O' Sullivan et al., 2010; Boucard et al., 2012) y se ha sugerido un posible papel de las mismas en el desarrollo del sistema nervioso ya que se ha demostrado su participación en la plasticidad sináptica y la sinaptogénesis (O' Sullivan et al., 2010).

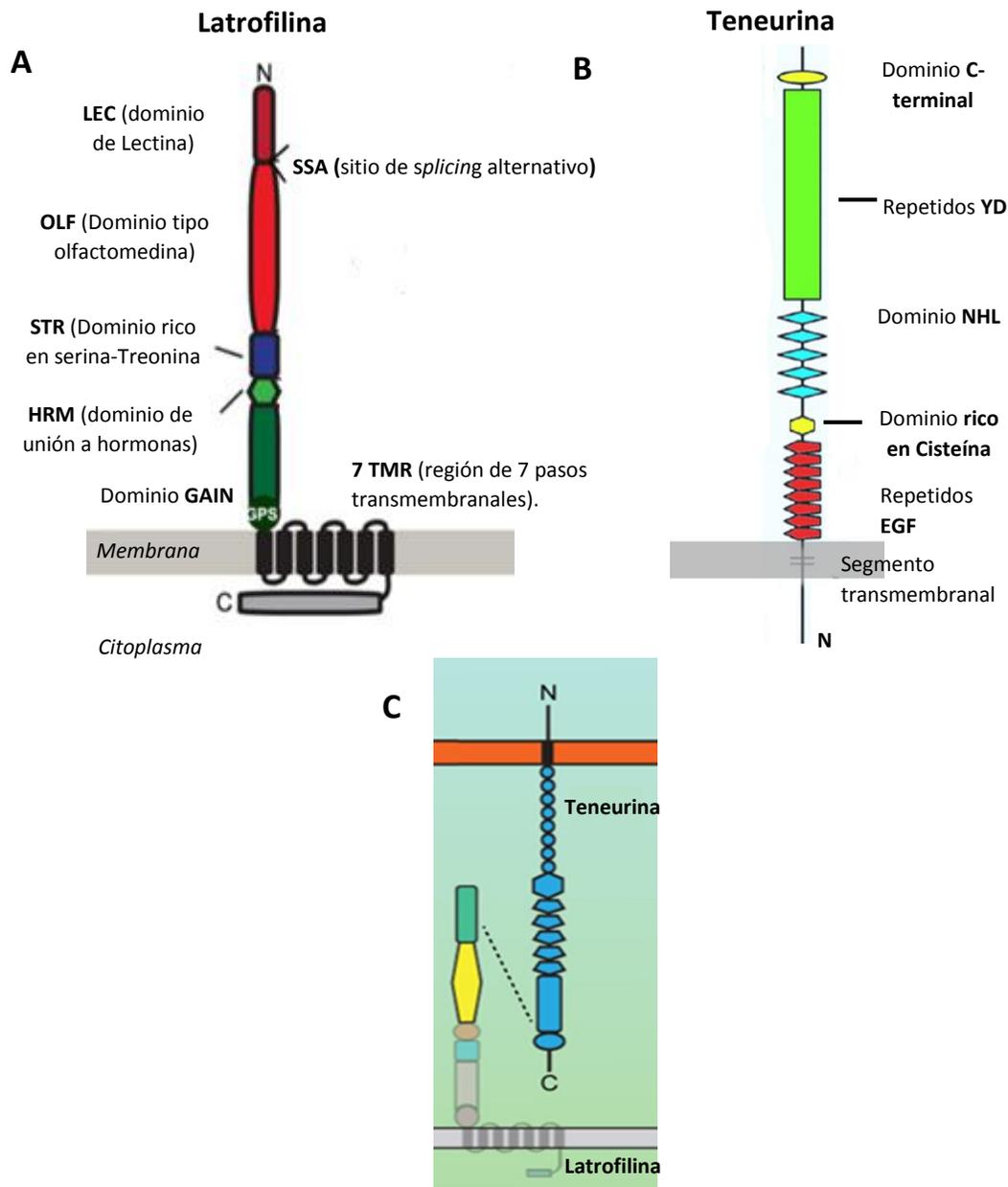


Fig 2 Representación esquemática de los dominios de latrofilina y teneurina. A) Latrofilina genérica y sus dominios funcionales; B) Teneurina genérica y sus dominios funcionales. C) Modelo de la Interacción propuesta para latrofilina y teneurina. Nótese que la interacción se sugiere entre el dominio Lectina de Lphn y el dominio C –terminal de Teneurina (Modificado de Meza-Aguilar y Boucard., 2014).

Las teneurinas (*Ten*), son proteínas transmembranales de tipo II altamente glicosiladas constituidas por una región corta N-terminal citoplasmática, una única región transmembranal (TMR) y una secuencia extracelular larga que contiene múltiples repetidos del tipo EGF, una secuencia rica en cisteínas y repetidos YD (Oohashi et al., 1999) (Fig.1). Las teneurinas se han visto involucradas en el desarrollo y la conectividad del tejido nervioso (Rubin et al., 2002; Wang et al., 2005; Tan et al., 2011; Dharmaratne et al., 2012; Hong et al., 2012). En vertebrados se conocen 4 genes que codifican para teneurina, todas expresadas específicamente en el cerebro (Oohashi et al., 1999), mientras que en invertebrados solo existen 2 genes relacionados.

En los vertebrados, las teneurinas están presentes en el cerebro en desarrollo (Li et al., 2006; Kenzelmann et al., 2008) y se han localizado en las sinapsis en cultivo celular (Leamey et al., 2007). Estudios (*in vivo*) han sugerido que la interacción homofílica de las teneurinas puede instruir la formación de conexiones neuronales (Kenzelmann et al., 2008; Hong et al., 2012; Mosca et al., 2012). Por ejemplo, en modelos de invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*, se les ha atribuido una función en eventos de direccionamiento axónico y morfogénesis (Trzebiatowska et al., 2008; Mörck et al., 2010; Mosca et al., 2012; Hong et al., 2012). Sin embargo, y aunque las funciones de las teneurinas aún no son claras, su rol en la adhesión celular y la formación de sinapsis *in vitro* parece residir en sus interacciones heterofílicas con las *Latrofilinas* (Silva et al., 2011; Boucard et al., 2014). Se ha demostrado, por ejemplo, mediante estudios de expresión heteróloga, que la Lphn-1- (expresada en células HEK293) es capaz de interactuar con Ten-2 e inducir el reclutamiento de hemisinapsis con neuronas co-cultivadas (Silva et al., 2011), se demostró también que esta interacción se logra con una afinidad en el rango nanomolar y es capaz de mediar la adhesión celular y la adhesión trans-sináptica (Boucard et al., 2014), principalmente a través del dominio de Lectina de Lphn y en conjunto con sus dominios de olfactomedina y la secuencia rica en serina- treonina (Fig.2), además de que puede modularse por el *splicing* alternativo del dominio de *splicing A* localizado en la unión entre el dominio de lectina y olfactomedina (Boucard et al., 2014).

Dado su patrón de expresión y las propiedades adhesivas y de señalización, los datos anteriores sugieren que las *Latrofilinas* pueden ser componentes sinápticos capaces de interactuar con diferentes ligandos postsinápticos -como las teneurinas- para regular la estabilidad sináptica y su función, dos eventos que influyen en el desarrollo y maduración del tejido nervioso, aunque poco se sabe acerca de la relevancia de esta función in vivo.

1.4 Las latrofilinas y su relación con el TDAH

Las alteraciones en la plasticidad sináptica son un mecanismo patogénico presente en varias categorías de desórdenes en el neurodesarrollo (Missler et al., 2012), sin embargo el intento de identificar variantes genéticas o sustratos moleculares que den pistas sobre los cambios que ocurren durante el desarrollo neuronal y que dirigen a la aparición de los síntomas del TDAH aún no ha generado datos consistentes. Recientemente, se reportó un haplotipo de riesgo para el TDAH en el gen que codifica a latrofilina 3 (Lphn3) (Arcos-Burgos et al., 2010) y un estudio de cohortes con pacientes diagnosticados con TDAH sugiere un rol importante de este gen en la persistencia del trastorno en la edad adulta (Ribases et al., 2011). Funcionalmente, este haplotipo de riesgo se asocia con una reducción de la actividad y viabilidad neuronal (Arcos-Burgos et al., 2010) y de manera interesante, algunos defectos en las variantes de *Lphn* también se han asociado con el desarrollo de habilidades cognitivas, malformaciones del cerebro e hiperactividad (Bonaglia et al., 2010); además, la temporalidad de expresión de Lphn3 en el sistema nervioso es consistente con un rol en el desarrollo del cerebro adulto, ya que su expresión es la más elevada en la adultez (Boucard et al., 2014) y su patrón topográfico de expresión coincide con las regiones implicadas en el TDAH (Sugita, 1998; Arcos-Burgos et al., 2010).

A consecuencia de lo anterior, se han llevado a cabo intentos por caracterizar la participación de las latrofilina en la patogénesis del TDAH mediante estudios en modelos animales de vertebrados; por ejemplo, Lange et al (2012) utilizaron el modelo de pez Zebra para investigar la función de Lphn3.1 (ortólogo de Lphn.3 humana) sobre el desarrollo y la conducta, al generar un “*knockdown*” inducido por la expresión de un RNAi para el transcrito del gen disminuyendo su actividad, se observó un posicionamiento aberrante de las neuronas positivas a dopamina en el diencéfalo ventral y un fenotipo locomotor

hiperactivo que sorprendentemente pudo revertirse tras la administración de metilfenidato y atomoxetina (Lange et al., 2012), dos drogas usadas comúnmente en el tratamiento del TDAH (Montañes-Rada et al., 2009). Ratones con una delección en el gen de *Lphn3* muestran alteraciones en la expresión (elevación) del ARNm del transportador de dopamina (DAT-1), además de generar un fenotipo impulsivo/hiperactivo y una respuesta incrementada en una prueba de locomoción inducida por administración de cocaína (Wallis et al., 2012). Resulta interesante mencionar también que otra variante de *Lphn* se ha asociado a cambios estructurales importantes en el tejido nervioso, tal es el caso de un estudio en humanos, que asocia la delección de un fragmento del cromosoma 9 que contiene al gen que codifica a la variante 1 de latrofilina (*Lphn1*) con la generación de malformaciones del cerebro, retraso mental e hiperactividad (Bonaglia et al., 2010). Por otra parte, el patrón de expresión de *Lphn* coincide con el patrón de expresión de las variantes de teneurina 2 y 4, por lo que estas últimas podrían ser candidatos potenciales de interacción; esto se resalta debido a que se ha reportado una delección del gen de *Ten-3* en un paciente con TDAH (Lionel et al., 2011) y que en estudios de asociación genética éste mismo gen se relacionó con el TDAH en niños y adultos (Lesch et al., 2008 y Stergiakouli et al., 2012). Asimismo, existe el reporte de una duplicación en el cromosoma 11q14.1 que afecta a *Ten-4* en un paciente con TDAH (Williams et al., 2011)

En resumen, las latrofilinas son moléculas de adhesión sináptica que regulan la expresión de transportadores de dopamina implicados en el TDAH, son necesarias en el desarrollo y función del SNC y podrían tener un papel en el desarrollo del TDAH.

1.5 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio para el TDAH

Drosophila melanogaster es un pequeño insecto perteneciente al orden díptera de la familia *Drosophilidae*, que se alimenta y crece en la fruta podrida (su nombre literalmente significa “amante del rocío de vientre negro”) por lo que comúnmente se le denomina mosca de la fruta. Es uno de los organismos de estudio más utilizados en biología porque es fácil manipular su genética, sus procesos celulares y del desarrollo, comunes a los eucariontes, incluido el humano. Este modelo se ha utilizado extensamente desde hace ya más de 100 años por razones tanto históricas como metodológicas; entre éstas últimas se incluyen:

- Facilidades de crianza: su dieta es simple (a base de levadura, azúcares y agar) y requieren de poco espacio de alojamiento.
- Periodo de vida corto: Se pueden obtener nuevas generaciones de moscas en un periodo de dos semanas.
- Fecundidad: Una mosca hembra puede colocar cientos de huevos fertilizados en su corto periodo de vida haciendo asequible el uso de métodos estadísticos en investigación.
- Manipulación conductual: Es un organismo que posee un gran repertorio de conductas que hacen asequible el estudio de procesos dependientes de la función del sistema nervioso como el aprendizaje, la memoria, la atención, el movimiento, la senso-percepción, sueño/vigilia, etc.

Drosophila melanogaster tiene 4 pares de cromosomas que se han secuenciado casi por completo y consiste de aprox. 13,600 genes (Adams et al., 2000); de los que aprox. 61% son análogos a los alterados en enfermedades humanas (Reiter et al., 2001).

Más aún, con el avance en las técnicas de manipulación genética, en la actualidad es posible inducir mutaciones específicas en el genoma de *Drosophila melanogaster* (i.e. mediante la inducción de mutaciones químicas con etil metano sulfonato [EMS], por inserción de elementos P en el genoma, la utilización de RNAi o por la inserción o delección de segmentos genómicos por recombinación homóloga). Gracias a ello existen cepas de moscas mutantes para un gran número de genes disponibles en varias colecciones públicas (<http://flybase.org/>) lo que significa que este modelo puede utilizarse para investigar las bases genéticas de gran variedad de procesos biológicos.

La posibilidad de utilizar a *Drosophila* como modelo para el TDAH se ha sugerido recientemente en estudios de mutantes que despliegan un fenotipo hiperactivo como Kume et al. (2005) quienes describieron niveles anormales de actividad y periodos sueño reducido en una cepa de mosca denominada Fumin (*fmn*) que lleva una mutación en el gen homólogo de DAT-1 implicado en el TDAH. Así mismo, Van Swideren et al., 2010 describen a una mutante que demuestra inatención e hiperactividad en un laberinto de elección visual y en

pruebas de atención en una arena de simulación de vuelo, mismas que pueden revertirse al administrar metilfenidato. En este trabajo, la hipótesis gira alrededor del par de adhesión *Lphn-Ten* como candidatos en la etiología del TDAH. Las latrofilinas (*Latrofilinas*) son moléculas de adhesión celular que se han conservado evolutivamente y en el genoma de *Drosophila* se codifica una isoforma cuya arquitectura se ha mantenido a lo largo de su filogenia (Scholz et al., 2015) (Fig.3). Además, su ligando Teneurina, también se ha conservado durante la evolución y en *Drosophila* se ha sugerido que tiene funciones en el desarrollo sináptico (Mosca et al., 2015), aunque hasta la fecha no existe evidencia de la interacción molecular de Lphn-Ten en este organismo, ni de su papel fisiológico en vertebrados e invertebrados. Debido al hecho de que *Drosophila* tiene sólo una isoforma de *Lphn* y una de *Ten*, éste es un modelo ideal para el estudio de la interacción Lphn-Ten.

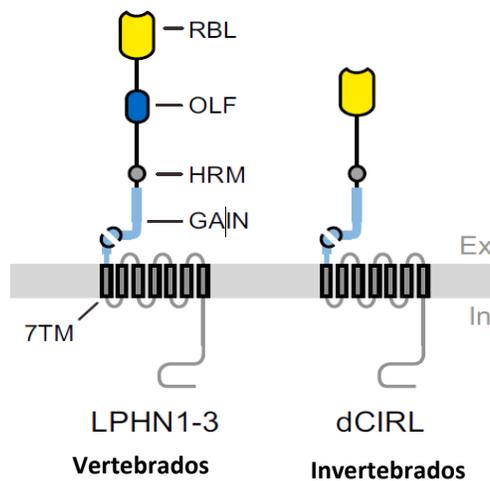


Fig.4 Estructura conservada de las Lphns en vertebrados e invertebrados. *Lphn* es un miembro de una subfamilia denominada GPCR'S (Receptores de adhesión acoplados a proteína G). Se muestran los dominios RBL= Dominio de unión a Ramnosa; OLF= Olfactomedina (Presente solo en vertebrados); HRM= dominio de unión a hormonas; GAIN= Dominio de auto proteólisis; 7TM= Siete dominios transmembranales; dCIRL= Latrofilina de *Drosophila melanogaster*. (Modificado de Scholz et al., 2015).

De manera interesante, durante el desarrollo de este trabajo surgió evidencia experimental que apoya nuestras consideraciones teóricas al proveer evidencia de que una interferencia del gen de *Lphn* en *Drosophila melanogaster* (a partir de un RNAi para *Lphn*) es capaz de generar un leve fenotipo de actividad incrementada y una reducción de los periodos de sueño, de la misma manera que lo hace la delección del gen homólogo de DAT-1 (der Voet et al., 2015), dichas alteraciones en la conducta de *Drosophila* se acrecientan en el periodo nocturno (donde se ha descrito que la actividad dopaminérgica es responsable del incremento de ésta actividad mediante la inhibición de la iniciación del sueño; Shang et al., 2011), y se revierten parcialmente tras la administración de metilfenidato (*Fig 3*). Estos datos sugieren que la alteración en el gen de *Lphn* altera a su vez la señalización dopaminérgica validando así la relevancia de los síntomas para TDAH en este modelo animal.

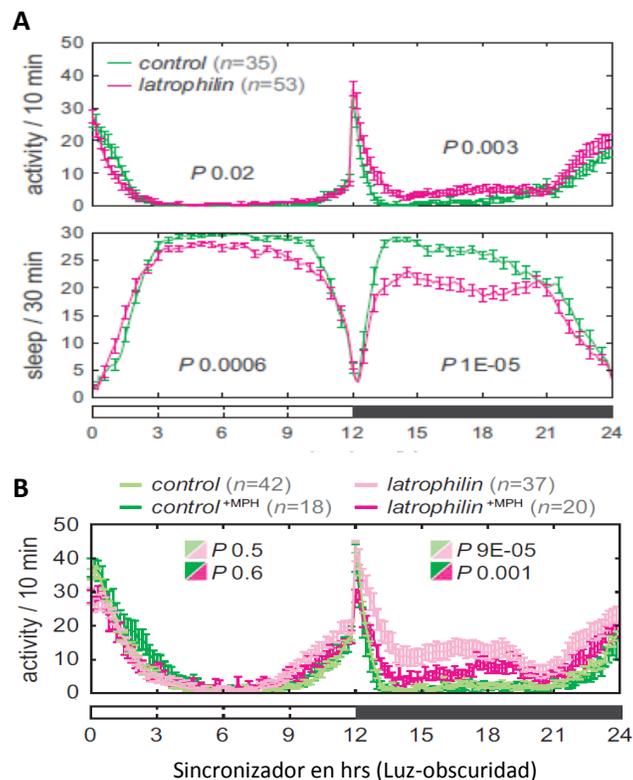


Fig.4 Disminuir la expresión de *Lphn* origina alteraciones conductuales. **A)** Actividad locomotora y periodos de sueño en función del ciclo luz oscuridad (12:12 hrs) Después de la eliminación del gen de *Lphn*. **Nótese** el incremento de la actividad y la disminución en los periodos de sueño en el periodo de oscuridad. **B)** La hiperactividad disminuye después del tratamiento con metilfenidato, y este efecto es más notorio en el periodo de oscuridad. (P = probabilidad asociada con el estadístico de prueba). (Figura modificada de der Voet et al., 2015).

En este trabajo se evaluó a nivel conductual y genético a moscas mutantes en los genes *Lphn*, *Ten*, y *Mvl* para probar por posibles afectaciones conductuales semejantes a las del TDAH y que derivan de la alteración de su función. Además se propone la realización de construcciones que nos permitan evaluar la interacción molecular *in-vitro* de *Lphn* y *Ten* y se hizo un análisis de los patrones de expresión de *Ten in vivo*.

2.0 Justificación:

La presencia del hierro y la expresión de las Latrofilinas y de sus ligandos endógenos, las Teneurinas se requieren para el desarrollo del sistema nervioso y actúan principalmente sobre sistemas de neurotransmisión como el dopaminérgico.

Este trabajo investigará el efecto de mutaciones en los genes que codifican al posible par de adhesión molecular *Lphn-Ten-m* además de estudiar el efecto de las deficiencias de hierro sobre la expresión de los mismos. Se utilizará a *Drosophila melanogaster* como modelo por que este organismo posee un sistema dopaminérgico implicado en conductas de locomoción y aprendizaje (White et al., 2010), contiene solo una isoforma de *Lphn* y una de *Ten* (Scholz et al., 2015; Silva et al., 2011; Mosca et al., 2012), con lo que se facilita el estudio de sus interacciones, y las cepas con mutaciones en estos genes de interés están disponibles en colecciones públicas (pero sin ser aún caracterizadas). El modelo de deficiencia de hierro ha sido previamente desarrollado en el laboratorio y consiste en la utilización de cepas mutantes en genes importantes para el metabolismo del hierro, como la cepa *Mvl* donde la mutación del gen *Malvolio* reduce los almacenes de hierro en el organismo (Bettledi et al., 2011).

3.0 Hipótesis:

- *En Drosophila melanogaster* está conservada la interacción transcelular entre Lphn y Ten la cual puede regularse por el nivel de hierro.

4.0 Objetivos:

4.1 Generales

Evaluar las interacciones genéticas de *Lphn*, *Ten* y *Mvl* en *Drosophila melanogaster*.

Evaluar si *Lphn* de *Drosophila melanogaster* interactúa con *Ten* en un ensayo *in-vitro*.

4.2 Específicos

1. Isogenizar las diferentes cepas mutantes (Latrofilina, Teneurina y Malvolio) de *Drosophila melanogaster*.
2. Realizar PCR en tiempo real para evaluar si las mutaciones en las moscas (a base de la inserción de un elemento transposón) interfieren con la expresión de los genes de interés y en consecuencia pueden ser utilizadas como mutantes válidos.
3. Evaluar si las moscas mutantes presentan diferencias en la cantidad de actividad que despliegan durante el día
4. Generar construcciones moleculares que nos permitan evaluar la interacción *in-vitro* de *Lphn* y *Ten*.

5.0 Métodos:

5.1 Cepas de *Drosophila*

Las diferentes cepas de *Drosophila melanogaster* fueron mantenidas en alimento estándar que contiene: agar (6.5%), levadura (40.9%), piloncillo (51.2%), grenetina (1.1%) y ácido propiónico (0.1%), Todas se alojaron en una incubadora a 24°C. La cepa utilizada como control fue *White* (*Flybase annotated symbol*: CG2759) isogénica. Las cepas mutantes contienen un elemento transposon (*P-element*) susceptible de causar cambios en la expresión de alguno de los genes de interés, como se muestra en la tabla 1. Todas las cepas se obtuvieron del Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC).

Tabla 1. *Stokcs* de moscas y sus genotipos correspondientes.

Número de stock (BDSC)	Genotipo	Genotipo abreviado
5151	w[1118]; P{w[+mC]=lacW}MvI[97f]	w; P (MvI)
13773	y1 w67c23; P{SUPor-P}KG03335	y w; P (Lphn) ¹
20922	y1 w67c23; P{EPgy2}EY14367	y w; P (Lphn) ²
21398	y1 w67c23; P{EPgy2}CirI EY12930	y w; P (Lphn) ³
19688	y1 w67c23; P{EPgy2}Ten-mEY03921	y w; P (Ten-m)
19588	w; PBac{GAL4D,EYFP}Ten-m,	Ten-m ^{Gal4,EYFP}

Se muestra el número de stock para consulta en (<http://flybase.org/>). El punto y coma (;) separa cromosomas distintos. El primer cromosoma corresponde al X; el segundo representa un autosoma. La **P** indica la presencia de un elemento transposón en el autosoma correspondiente seguida por el gen blanco (en paréntesis). Los superíndices se indican en la abreviatura para distinguir los diferentes transposones que afectan a LPHN. 'y' y 'w' representan el genotipo yellow y white respectivamente.

5.2 Isogenización de cepas de *Drosophila melanogaster*

La isogenización es la técnica más eficiente para obtener material genético homogéneo en *Drosophila melanogaster*. La definición más simple del término implica identidad genética, es decir, organismos isogénicos son aquellos que tienen pares cromosómicos idénticos. El protocolo de isogenización se llevó a cabo como se describe en la *figura 5*: La presencia del elemento transposon se puede monitorear a través del rescate del color del ojo hacia el rojo (las moscas white tienen ojos blancos) mediada por el elemento-P.

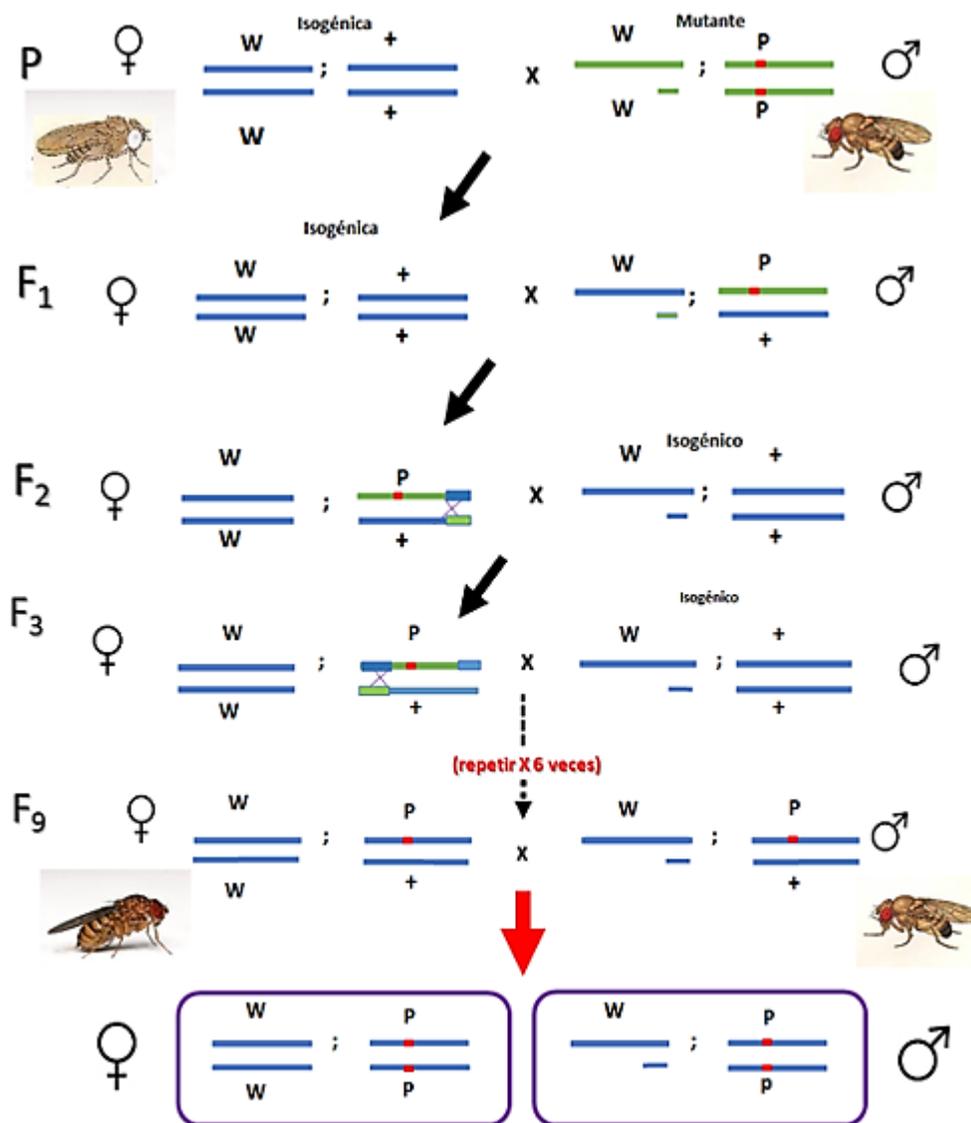


Fig.5 Esquema de cruces para isogenización sobre el fondo genético de la cepa white isogénica. W= gen white; += indica genotipo silvestre. P y la barra roja en los cromosomas verdes [cepas mutantes] señalan la inserción de un P-element. Ver descripción de procedimiento en texto.

El procedimiento consistió de los siguientes pasos (ver *Fig5*):

P) Cruza parental (hembra de la cepa *white* cruzada con un macho con la mutación de interés).

La inserción de un P-element se señala con la letra P sobre la barra roja en los cromosomas verdes [cepas mutantes]. Los diferentes colores en los cromosomas representan diferentes fondos genéticos.

F1) Primera generación Filial.

Primero cambiamos los cromosomas sexuales de las cepas mutantes con los cromosomas sexuales de la cepa isogénica *white*. Se tomó un macho que incorporó en su genoma el elemento P paternal (identificable fenotípicamente por un marcador de color de ojos en el elemento P inserto) y el cromosoma *w* isogénico de la madre y se cruzó nuevamente con una hembra de la cepa isogénica *white* para dar paso a la generación F2.

F2) Segunda generación Filial.

Ésta vez se tomó una hembra que incorporó un cromosoma mutado del padre para cruzarla con un macho de la cepa *w* isogénica. Nótese que los cromosomas *w* de ésta hembra ahora son completamente isogénicos en el fondo de *white*. Los cromosomas en los oocitos de la hembra siguen un evento de recombinación (marcado con una x que contacta las barras en este esquema).

F3-F8) Sigüientes generaciones Filiales.

Seguimos el mismo esquema de cruce que en F2. Destaca aquí el hecho de que, tras varias generaciones, se selecciona las hembras de cada generación filial que conservan el elemento P en un cromosoma que además ha incorporado cada vez más material genético originario de la cepa *white* isogénica (mostrado en azul en el esquema de la *Fig.5*).

F9) Novena generación Filial.

Tras la repetición sucesiva de este esquema de cruce la generación filial F9 contiene al elemento P inserto en un fondo genético muy homogéneo derivado de la cepa isogénica *white*. Solo es necesario hacer una cruce de una hembra y un macho de la misma generación

filial F9 para recuperar la homocigocidad del elemento P. Este stock final se utilizó en los experimentos conductuales y de RT-PCR.

5.3 Evaluación conductual

5.3.2 Perfil de actividad de las moscas “*Drosophila Activity Monitor System*”

La actividad locomotora individual de moscas macho de 3-5 días de edad se registró con el *Drosophila Activity Monitor System* (DAM) (Trikinetics, Waltham, MA, USA) en el que se detecta movimiento de moscas, mantenidas en pequeños tubos sellados, mediante un láser infrarrojo dirigido al centro del mismo. Se consideraron medidas de actividad a la cantidad de veces que la mosca atravesaba el láser en un periodo de tiempo definido. Los eventos detectados se suman en el curso de intervalos consecutivos a lo largo de toda la fase experimental; de esta manera la actividad se registró durante 4 días en un ciclo de 12 hrs luz-oscuridad. Los datos crudos de actividad se colectaron en periodos de 1 min (Sehadova et al., 2009; der Voet et al., 2015).

5.4 PCRs de tiempo real

Con el fin de caracterizar el efecto de las mutaciones (inserción de elementos P) en la expresión de los genes de interés (*Lphn*, *Ten-m*, *Malvolio*, *Rb49* [Control]) (Ver Fig 12 en sección de resultados y Tabla 1), se realizaron reacciones de PCR en tiempo real. Se aisló el RNAm de homogenados de tejido de ~30 moscas macho completas (3 a 5 días de edad), utilizando el reactivo de Trizol (Life Technologies cat.10296-010) y siguiendo un protocolo estándar. La concentración se midió utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Posteriormente se sintetizó ADNc utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen Cat.28025-013) y el oligo (dT)₂₀ (Invitrogen Cat. 18418-020) siguiendo el protocolo estándar.

Se realizaron reacciones en cadena de polimerasa en tiempo real (q-PCR), para cada DNAc obtenido de las cepas mutantes, usando el kit de q-PCR Green master (Jena Bioscience). Todas las cuantificaciones de RNAm fueron normalizadas al gen de proteína ribosomal Rb49 utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Haimes y Kelley; 2010). Los “iniciadores”

empleados se describen en la *Tabla 2* y los componentes de reacción se muestra en la *Tabla 3*. Se hicieron tres réplicas técnicas por cada experimento. Se generaron iniciadores para evaluar la expresión de transcritos largos y cortos de *Lphn*.

Tabla 2.- Iniciadores utilizados en la cuantificación por RT-PCR

Secuencia (5'→3')	Longitud (nucleótidos)	sentido	Gen blanco	Longitud de amplicón (pb)
ACCAGTCAGTCCAATGTGCC	20	For	<i>Lphn*</i>	91
TCAGATTGTTGCGGTGTGAGT	21	Rev	<i>Lphn*</i>	91
ACCAGTCAGTCCAATGTGCC	20	For	<i>Lphn</i>	91
TCAGATTGTTGCGGTGTGAGT	21	Rev	<i>Lphn</i>	91
GCTGTCCAACAAAGTAGTGCC	21	For	<i>Mvl</i>	143
AACTCCAGCTTGCGTAGACC	20	Rev	<i>Mvl</i>	143
CAATCTGGCAAGGTGGCATT	20	For	<i>ten-m</i>	121
GCACCTCCACGGACTTTACC	20	Rev	<i>ten-m</i>	121
CGATATGCTAAGCTGTGCACA	22	For	<i>Rb49</i>	116
CGCTTGTTGATCCGTAACC	20	Rev	<i>Rb49</i>	116

**Iniciadores que amplifican las variantes largas del transcrito de Lphn*

Tabla 3.- Componentes de las reacciones de PCR en el ADNc de mosca completa.

Componente	Concentración/Volumen Final en 12.5 µl de reacción
H2O	Aforada 12.5 µl
Sol. Green master con UNG	6.25µl
Iniciadores [10 µM]	0.3 µl c/u [0.2 µM c/u]
ADNc	200 ng

5.5 Aislamiento, Amplificación y Purificación de vectores de expresión (Métodos con ADN).

5.5.1 Transformación de bacterias por el método de choque térmico

25 ng de ADN vector (o de mezcla de la ligación. *ver sección 6*) se añadieron a 100 µl de bacterias químicamente competentes DH5- α . La mezcla se incubó en hielo durante 30 min después de lo cual se dio un choque térmico a 42°C por 45 segs. Posteriormente la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 2 mins y se añadieron 700 µl de medio SOB para crecer las bacterias durante 45 minutos a 37°C a 200rpm. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µL de medio LB. La suspensión se sembró en placas de agar con medio LB que contiene ampicilina [0.01 mg/mL]. Las placas se incubaron 16 hrs. a 37°C.

5.5.2 Crecimiento de bacterias

Después de la transformación bacteriana, y con el propósito de obtener colonias que incorporaron el plásmido seleccionado, las bacterias se crecieron en 5 ml de medio LB con

ampicilina en tubos de 15 mL a 37°C, 200rpm por 16 hrs. Los cultivos se inocularon con una colonia aislada de la placa de agar con LB y ampicilina.

5.5.3 Extracción y purificación de vectores

La extracción de los vectores de expresión se realizó mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell. 3ª edición; Vol.1; 2001) y su posterior purificación se logró mediante precipitación con Polietilen Glicol 8000 (SIGMA cat. P-5413) (Sambrook y Russell; 2001).

5.6 Construcción de vectores de expresión por el método de extensión por iniciadores para ensayo de reconstitución de GFP (Clyn View).

Brevemente, el ensayo de reconstitución de GFP es una técnica de biología molecular que se fundamenta en la complementación de fluorescencia bi-molecular (Kerppola; 2010). En este caso consiste en la separación de GFP en dos fragmentos (amino y carboxilo) no fluorescentes (un fragmento largo GFP1-10 y uno corto GFP-11) El fragmento largo se fusiona a una proteína y el fragmento corto a otra que se sospeche se una a la primera. Cuando las proteínas se unen, acercan los fragmentos promoviendo la reconstitución del fluoróforo Básicamente se propone el desarrollo de construcciones que contengan la secuencia completa de LPHN o Ten de *Drosophila melanogaster* fusionadas al fragmento corto GFP-11 y largo GFP1-10 de la proteína verde fluorescente respectivamente (*Ver Fig 8 para representación esquemática de las construcciones finales*), para expresarlas en células HEK239T. La interacción entre Latrofilina y Teneruina podrá visualizarse por fluorescencia. A ésta técnica se le se denomina “*Clyn View*” [de *CL*, otro nombre para LPHN].

El vector de expresión utilizado es p-UAS-K10attB (9.5 Kb, contiene gen de resistencia a ampicilina), cuya transcripción puede ser dirigida por Gal4 en *Drosophila Melanogaster*.

El método de extensión por iniciadores consiste en tres diferentes reacciones de PCR en las que se utilizan dos iniciadores adicionales a los diseñados para insertar la mutación de

interés (Ver Fig.7). Los plásmidos dónde se insertará *GFP* serán construidos mediante la subclona del respectivo fragmento de PCR que codificará lo siguiente:

A) *Lphn* de *Drosophila Melanogaster* con inserción de sitio *MluI* para subclona de GFP11 cerca del dominio LEC.

Brevemente: mediante el método de extensión por iniciadores se insertaron sitios de restricción para *MluI* (mutación A) (Tabla 4) en el plásmido vector que contiene la secuencia completa de *Lphn* de *Drosophila melanogaster*.

Los iniciadores usados para el empalme de fragmentos se diseñaron sobre las secuencias de *NotI* y *NheI* (contenidas en el ADN molde, ver Fig. 9) con el fin de clonar el fragmento nuevamente en el plásmido original.

B) *Ten-m* de *Drosophila Melanogaster* con inserción de sitio de restricción *KpnI* para subclona de fragmento GFP 1-10 en el dominio C-terminal.

Mediante el método de extensión por iniciadores se insertaron sitios de restricción para *KpnI* (Mutación B) (Tabla 4) en el plásmido vector que contiene la secuencia completa de *Ten-m* de *Drosophila melanogaster*. Los iniciadores usados para crear el fragmento final se diseñaron sobre las secuencias de *Xba I* y *Xho I* (contenidas en el ADN molde, ver Fig.10), con el fin de clonar el fragmento nuevamente al plásmido original. (La secuencia de *Ten* tiene un tag de *HA* y *Flag* para su identificación).

Los componentes de las reacciones para realizar estos fragmentos se detallan en las tablas 4, 5 y 5.1. El número de ciclos utilizados para su amplificación fué de 30 y los fragmentos resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Un diagrama esquemático del método se muestra en la fig. 7. Posterior a la construcción de los fragmentos por el método de extensión, se hará la inserción del fragmento correspondiente de GFP (flanqueada con el sitio de restricción para el cual se generó la mutación) que se extrajo mediante PCR de un vector previamente construido.

Tabla 4.- Pares de iniciadores usados en la mutagénesis por extensión.

<i>Mutación</i>	<i>Par de primers</i>	<i>Fragmento a amplificar</i>	<i>Secuencias (5'>3')</i>
A (MluI en Lphn)	<i>Frw 1-A</i>	Fragmento 1	CGACTCTAGACTGC
	<i>Rev 1-A</i>		GAACTTCTCACTGGTACCTGTTTTTCCACG
A (MluI en Lphn)	<i>Frw 2-A</i>	Fragmento 2	CGTGGAAAAACA GGTACC AGTGAGAAGTTC
	<i>Rev 2-A</i>		CAATTATGTCACACCAC
A (MluI en Lphn)	<i>Frw 1-A</i>	Empalme de fragmentos 1 y 2	CGACTCTAGACTGC
	<i>Rev 2-A</i>		CAATTATGTCACACCAC
B (KpnI en Ten-m)	<i>Frw 1-B</i>	Fragmento 1	GACTCACTATAG
	<i>Rev 1-B</i>		GTTTGGGCTGC ACGCGT ACTTATGCAC
B (KpnI en Ten-m)	<i>Frw 2-B</i>	Fragmento 2	GTGCATAAGT ACGCGT GCAGCCCAAAC
	<i>Rev 2-B</i>		GTATGTCGAACC
B (KpnI en Ten-m)	<i>Frw 1-B</i>	Empalme de fragmentos 1 y 2	GACTCACTATAG
	<i>Rev 2-B</i>		GTATGTCGAACC

Se indica la mutación objetivo y la combinación de iniciadores usados en su construcción (Ver Fig. 5 Para procedimiento de extensión). Se muestra en color rojo la secuencia diseñada para insertar el sitio de restricción correspondiente (GGTACC= MluI; ACGCGT=KpnI).

Tabla 5.- Componentes de reacción para generar las mutaciones en *Lphn* y *Ten-m*
(Reacciones 1 y 2, método de extensión por *iniciadores*).

Componente (Reacción 1 y 2)	Concentración/Volumen Final en 25 µl de reacción
H2O	Aforada 25 µl
5x Sol. amortiguadora	[1X] (5 µl)
Iniciadores [10 µM]	0.5 µl c/u [0.2 µM] c/u
dNTP's [10 mM]	2 µl [200 µM] c/u
ADN	1 ng
Polimerasa Prime star HS®	0.1 µl [0.25 U/25 µl]

Tabla 5.1- Componentes de reacción para generar las mutaciones en *Lphn* y *Ten-m*
(Reaccion 2, método de extensión por *iniciadores*).

Componente (Reacción 3)	Concentración/Volumen Final en 25 µl de reacción
H2O	Aforada 25 µl
Sol. amortiguadora (5x)	1x (5 µl)
Iniciadores (10 µM)	0.5 µl c/u [0.2 µM c/u]
Mezcla de dNTP's (2.5 mM c/u)	2 µl [200 µM] c/u
Fragmentos	1 µl c/u extraídos directamente desde gel
ADN 1 y 2 purificados	de agarosa sin pasos de purificación intermedios
Polimerasa Prime Star HS®	0.1 µl ([0.25 U/25 µl]

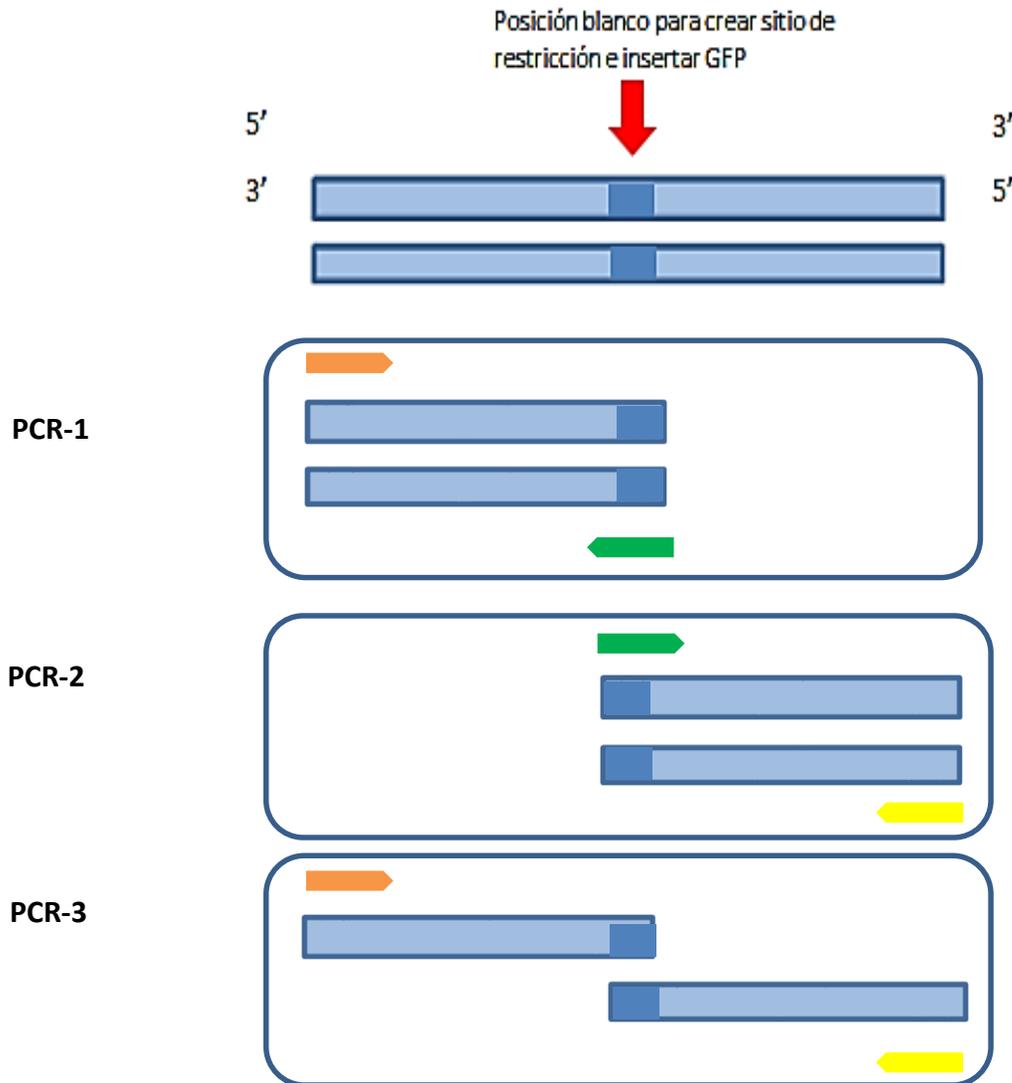


Fig. 7 Representación del método de extensión por iniciadores. Las barras azul claro representan ADN plasmídico. La flecha roja indica el sitio donde se requiere insertar un sitio de restricción (indicado por los cuadros azules oscuros) para la posterior subclona del fragmento de GFP. Los pentágonos verdes indican los iniciadores con la mutación (aquí denominados Primer B). Los pentágonos naranja y amarillo representan al primer A y C respectivamente. Durante la primera PCR se utilizan los iniciadores A y B para la mutación y el fragmento resultante se denomina fragmento 1. Durante la segunda PCR se utilizan los iniciadores B y C para la mutación y el fragmento resultante se denomina Fragmento 2. Los fragmentos 1 y 2 son ahora utilizados como molde para la PCR-3 colocando los iniciadores A y C de modo que el fragmento resultante contiene a la mutación inserta.

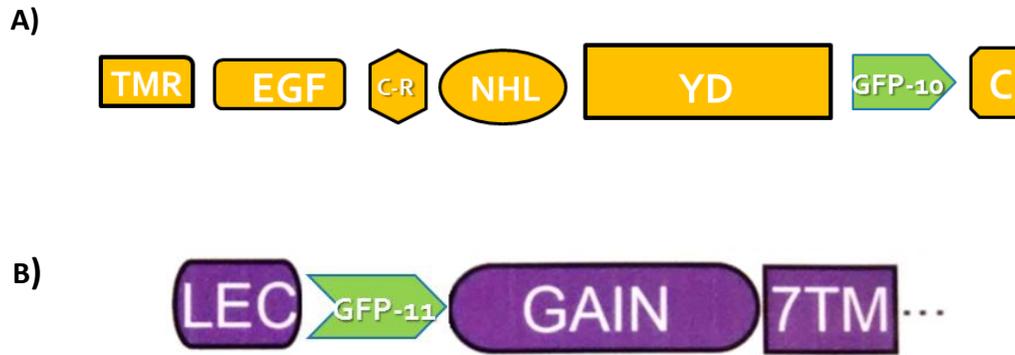


Fig. 8 Representación esquemática de las construcciones finales. En amarillo se muestra a Teneurina; en morado Latrofilina. En verde se muestran los fragmentos de GFP. **A)** Teneurina/GFP1-10 (inserto en su posición intramolecular **B)** Latrofilina/GFP11 (antes del dominio de Lectina).

5.7 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se utiliza para separar y detectar fragmentos de ADN o RNA. El ADN tiene carga negativa debido a su grupo fosfato. La electroforesis utiliza esta propiedad para separar los fragmentos cargados en el gel mediante un campo eléctrico. Los fragmentos corren desde el cátodo hacia el ánodo y pueden así detectarse por su tamaño utilizando un marcador de peso molecular como referencia.

Los fragmentos de ADN se analizaron usando el gel de electroforesis en agarosa al 0.8% (w/v). La agarosa (0.28g) se disolvió en 35 ml de sol. amortiguadora TE y la solución se calentó a 95°C hasta lograr la disolución de la agarosa, posteriormente se vertió la solución en un molde para geles, se colocó un peine para crear los carriles de corrida y se dejó enfriar a temperatura ambiente para que solidificara. Las muestras de ADN se mezclaron con solución de carga (6X) y se colocaron en el gel junto con un marcador de peso molecular (Thermo Scientific O'Gene ruler 1Kb cat.:SM1163). El gel se corrió utilizando 100V durante 45 min en sol. amortiguadora TE 1X y se reveló utilizando SyberSafe (Life Technologies Cat.: S33102) en solución (SyberSafe/40 mL agua) durante 10 minutos en agitación. La visualización se realizó bajo luz UV utilizando un sistema de imagen Bio-Rad.

5.8 Extracción de fragmentos del gel y purificación de ADN.

Los fragmentos de ADN se cortaron del gel utilizando una navaja de bisturí y se purificaron utilizando el kit Pure Link (Invitrogen: K220001), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó en 30 μ l de agua MilliQ.

5.9 Digestión con enzimas de restricción

Se hicieron las restricciones correspondientes de los vectores (para verificar su identidad o para realizar los ensayos de ligación) o de los fragmentos y vectores para su subclonación por ligación. Las digestiones se realizaron por 2 hr a 37°C (Ver tabla 7 para ejemplo de reacción de restricción).

El fragmento de *Lphn* al que se insertó *MluI* está flanqueado por los sitios de *NotI* y *NheI*. Ambas enzimas cortan en el vector original en las posiciones 669 y 4100 respectivamente. (Fig. 9).

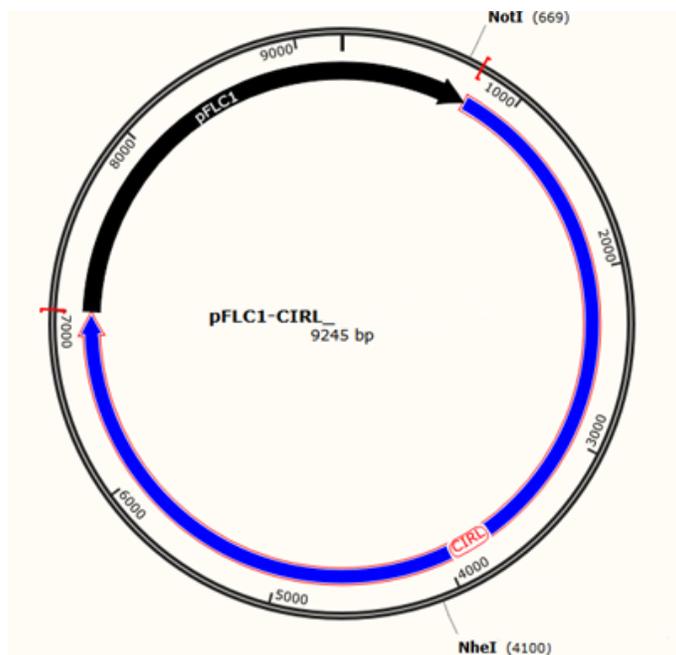


Fig.9.- Mapa del vector de expresión para *Lphn*. Se muestra en negro la región correspondiente al vector original *pFLC-1* y en azul la secuencia de *Lphn* (indicada como *CIRL*). Se muestran además los sitios de restricción para *NotI* y *NheI*. Sobre este vector se trabajó para realizar los fragmentos de *Lphn* por el método de extensión por iniciadores.

8.4 Preparación de muestras para microscopía confocal.

Para el análisis *in-vivo* de la expresión de *Ten-m*, se tomaron larvas o moscas adultas de *Drosophila*. La preparación de los tejidos se hizo con ayuda de un microscopio estereotáxico. La preparación del tejido de las larvas consistió en hacer drenar sus órganos y tejido graso para dejar sólo la carcasa. Para la preparación de los cerebros adultos se tomaron las moscas y se decapitaron, posteriormente se extrajo el cerebro al jalar, utilizando pinzas de disección, los extremos laterales de los ojos liberando así al cerebro. Todos los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se montaron en portaobjetos utilizando *Vecta Shield* con DAPI.

8.5 Microscopía confocal

Las muestras de tejido de *Drosophila* se evaluaron mediante microscopía confocal. Se obtuvieron secciones de tejido utilizando la función de *stack* en un microscopio confocal (Leica) equipado con objetivos de 60 y 20x usando aceite de inmersión.

10. Resultados:

10.1 Generación de cepas mutantes isogénicas.

La isogenización es un procedimiento que se requiere para poder evaluar el efecto de variaciones alélicas individuales al mismo tiempo que se elimina la contribución de la variación genética de fondo sobre el efecto estudiado. En este proyecto se isogenizó a las diferentes mutantes (*Lphn*, *Ten* y *Mvl*) después de la realización de retro cruza por 9 generaciones filiales, cuyo objetivo fue insertar el elemento transposón de cada cepa, en el fondo genético de una cepa *white* previamente isogenizada (*ver esquema en la Fig.5*). De este modo, podemos utilizar las nuevas cepas mutantes y compararlas, directamente contra la cepa *white* isogénica que se utilizó como su fondo genético.

10.2 Los elementos P insertados en el genoma de las cepas mutantes alteran la expresión de los genes de interés.

Un elemento P es un elemento transposón de tamaño variable que está presente específicamente en *Drosophila melanogaster* y se utiliza ampliamente para la mutagénesis ya que es capaz de insertarse en el genoma ocasionando diversos efectos según la posición que ocupe sobre un gen, por ejemplo, su inserción en la región extremo 5' UTR puede ocasionar una baja eficiencia de transcripción génica mientras que, su inserción en una región promotora, puede ocasionar la completa pérdida de la expresión del gen.

Con el fin de evaluar el efecto de la inserción de los elementos P, con los que se generaron nuestras cepas mutantes (*Fig. 12 y Tabla 1*) sobre la expresión del ARNm se realizó una extracción de ARN de homogenizado de mosca completa utilizando el reactivo de Trizol (*Ver Fig. 13*). A partir de estas muestras, se sintetizó el ADNc molde para evaluar por q-PCR la expresión de los genes de interés. En este proyecto utilizamos 3 cepas mutantes en el gen de *Lphn* que llamaremos *Lphn1 a 3* según la posición del elemento transposón (*Tabla 1 y Fig.12*). Los resultados de este experimento se muestran en la *Figura 13*.

El RNAm de las isoformas largas de latrofilina cursa con una reducción en su expresión en las cepas *Lphn1* y *Lphn2* de 61 y 38% respectivamente con respecto a la cepa control

white isogénica. La cepa *Lphn3* no mostró ningún cambio, mientras que en la cepa mutante en *Mvl* hay una sobreexpresión del 82% con respecto a la cepa control.

Al evaluar la expresión de las isoformas cortas de *Lphn* se observa una inducción mayor al 50% en su expresión en las tres cepas mutantes en *Latrofilina* (*Lphn1*=136%, *Lphn 2*=91% y *Lphn3*= 58%) y una disminución del 12% en la cepa mutante en *Mvl* con respecto a la cepa control. Por otro lado el ARNm de *Ten-m* reduce notablemente su expresión en todas las mutantes en *Lphn* (*Lphn1*=25%, *Lphn 2*=15% y *Lphn3*= 30%) así como en la mutante en *Mvl* (50% de reducción). Finalmente, el ARNm de *Mvl* reduce modestamente su expresión en la cepa mutante en *Lphn3* (18%) y *Mvl* (15%) e incrementa en la cepa mutante *Lphn2* (27%).

La evaluación de la expresión del RNAm de *Ten-m* no fue posible debido a que el gen de referencia (Rb49) es inducido por la mutación y esto impide su utilización en las normalizaciones.

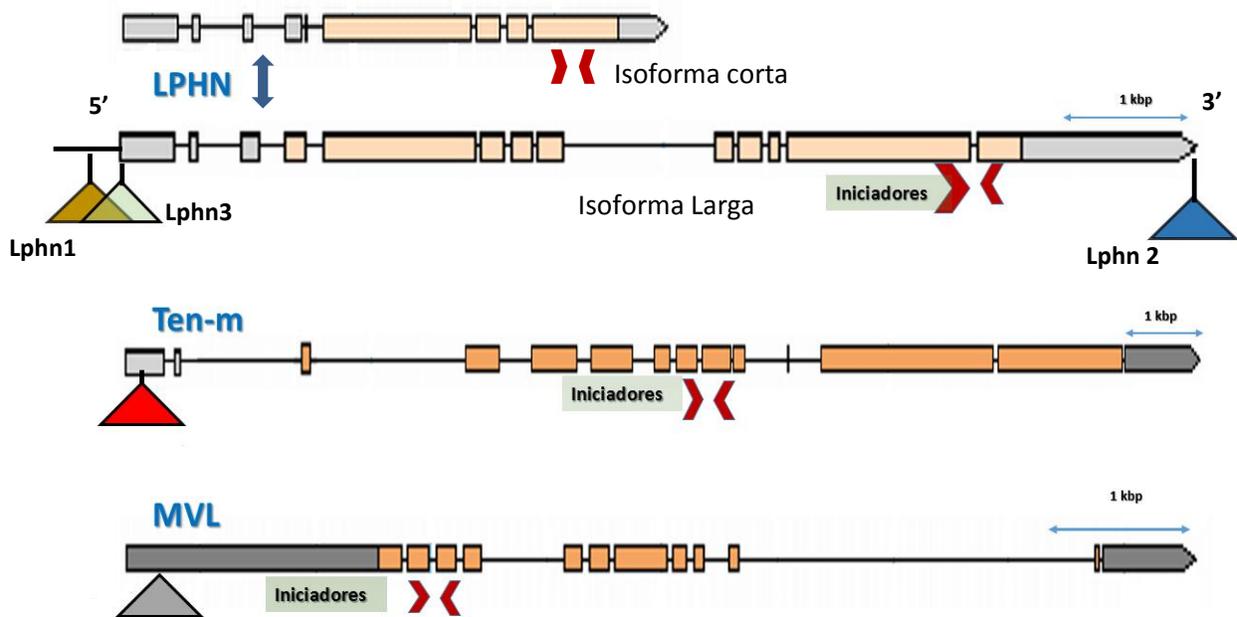


Fig.12 Diagrama esquemático de los elementos transposones insertados en las cepas mutantes. Se observan las secuencias del transcrito para *Lphn* (isoforma larga y corta), *Ten-m* y *Mvl* (obtenidas de <http://flybase.org/>). Los triángulos representan elementos transposones: se aprecia su posición relativa en el transcrito. Se muestra también la posición relativa de los iniciadores o iniciadores para la verificación de la expresión por PCR. **Nótese:** Las tres cepas mutantes en *Lphn* utilizadas en este proyecto (**Lphn 1 a 3**) se denominan según la posición del elemento transposón aquí numerado del **1 al 3**.

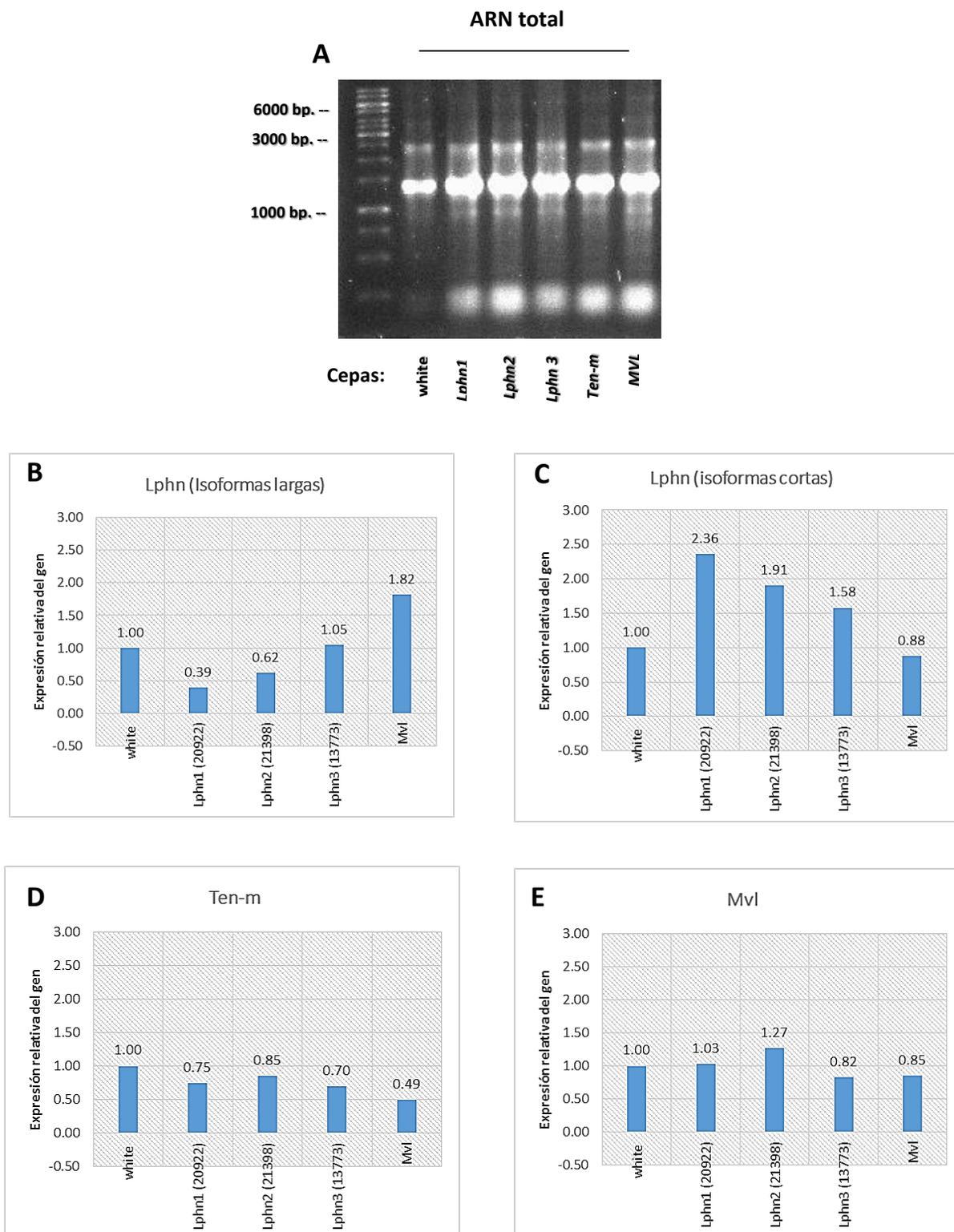


Fig.13. Expresión relativa de Lphn, Ten-m y Mvl en las moscas mutantes. El eje horizontal de los paneles indica la cepa mutante de origen. **A)** ARN de mosca total extraído de las cepas isogénicas. **B-E)** análisis de expresión del RNAm sobre el ADNc de mosca entera. Se muestra la expresión en valores relativos a la expresión del gen en la mosca white isogénica (Expresión= 1) y normalizados con respecto al gen de la proteína ribosomal Rb49.

10.3 Las mutaciones en *Lphn*, *Ten-m* y *Mvl* no alteran los ritmos circadianos pero sí incrementan la actividad de las moscas.

Previo a la realización de las evaluaciones conductuales, realizamos una evaluación general de las cepas de mosca probadas para descartar cualquier alteración sensorial o motora que pudiera afectar los resultados de las evaluaciones posteriores (*Ver apéndice*).

En este trabajo evaluamos el efecto de las mutaciones en *Lphn*, *Ten* y *Mvl* sobre la duración de los periodos circadianos y la actividad general en *Drosophila melanogaster*. Los actogramas obtenidos, que muestran la duración promedio del ciclo circadiano, indican que las mutaciones no alteran los periodos de alternancia entre sueño y actividad en *Drosophila* y revelan que dichos periodos son similares en todas las cepas probadas (*Fig.14*).

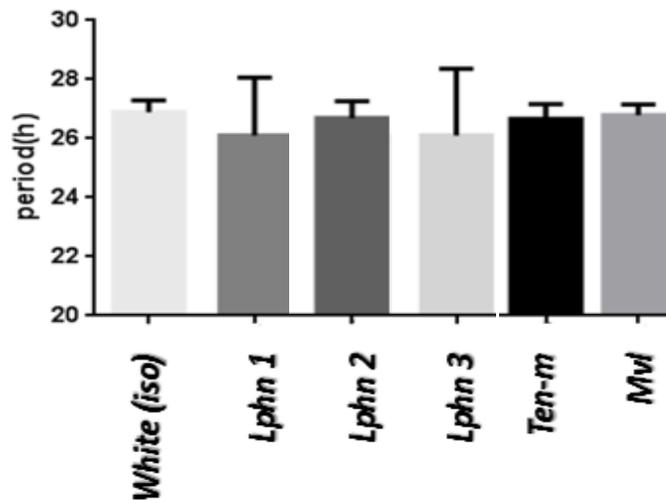


Fig.14 Evaluación de la duración del periodo circadiano en las moscas mutantes. El gráfico muestra la duración promedio de los periodos de actividad en función del genotipo de *Drosophila melanogaster*. Se observa que el periodo circadiano de todas las mutantes oscila entre las 27 horas y no hay diferencias significativas según el genotipo evaluado (Test de Kruskal Wallis= 28.46; $p > 0.0002$). Las medias para cada genotipo son: white (isogénica)=26.9, Lphn1=26.69, Lphn2=26.11, Lphn3=26.1, Ten-m=26.67, Mvl=26.79. **Nota:** El periodo circadiano hace referencia a un ciclo de conducta que oscila entre activación y sueño a lo largo del tiempo y que depende de la sincronización con estímulos ambientales como la luz y la temperatura.

Sin embargo, al evaluar la actividad general de las moscas mutantes en periodos de 1 min (Fig. 15) se observó una elevación en la cantidad de actividad total de las cepas mutantes *Lphn1* y *Lphn2* con respecto a las moscas control (*white* isogénicas), dichos cambios se originan en el incremento de la actividad tanto en el periodo de luz (*Lphn1*= 39.2, *Lphn2*=42.6 vs *White*=31; Fig. 15 B) como en el de oscuridad (*Lphn1*= 35.1, *Lphn2*= 47.4 vs *White*=29; Fig 15. C) del protocolo experimental. Por otro lado las cepas mutantes de *Ten-m* y *Mvl* mostraron elevación en la cantidad de actividad sólo en la fase oscura de las mediciones (*Ten-m*=38.8, *Mvl*= 32.5 vs *white*= 29; Fig. 15 C) manteniéndose al mismo nivel que la cepa control durante la fase iluminada (*Ten-m*=31, *Mvl*= 28.5 vs *white*= 31; Fig. 15 B). Por último la cepa mutante *Lphn 3* mostró niveles de actividad muy bajos comparada contra todas las demás cepas, en todas las fases del experimento (Fig. 15 A-C).

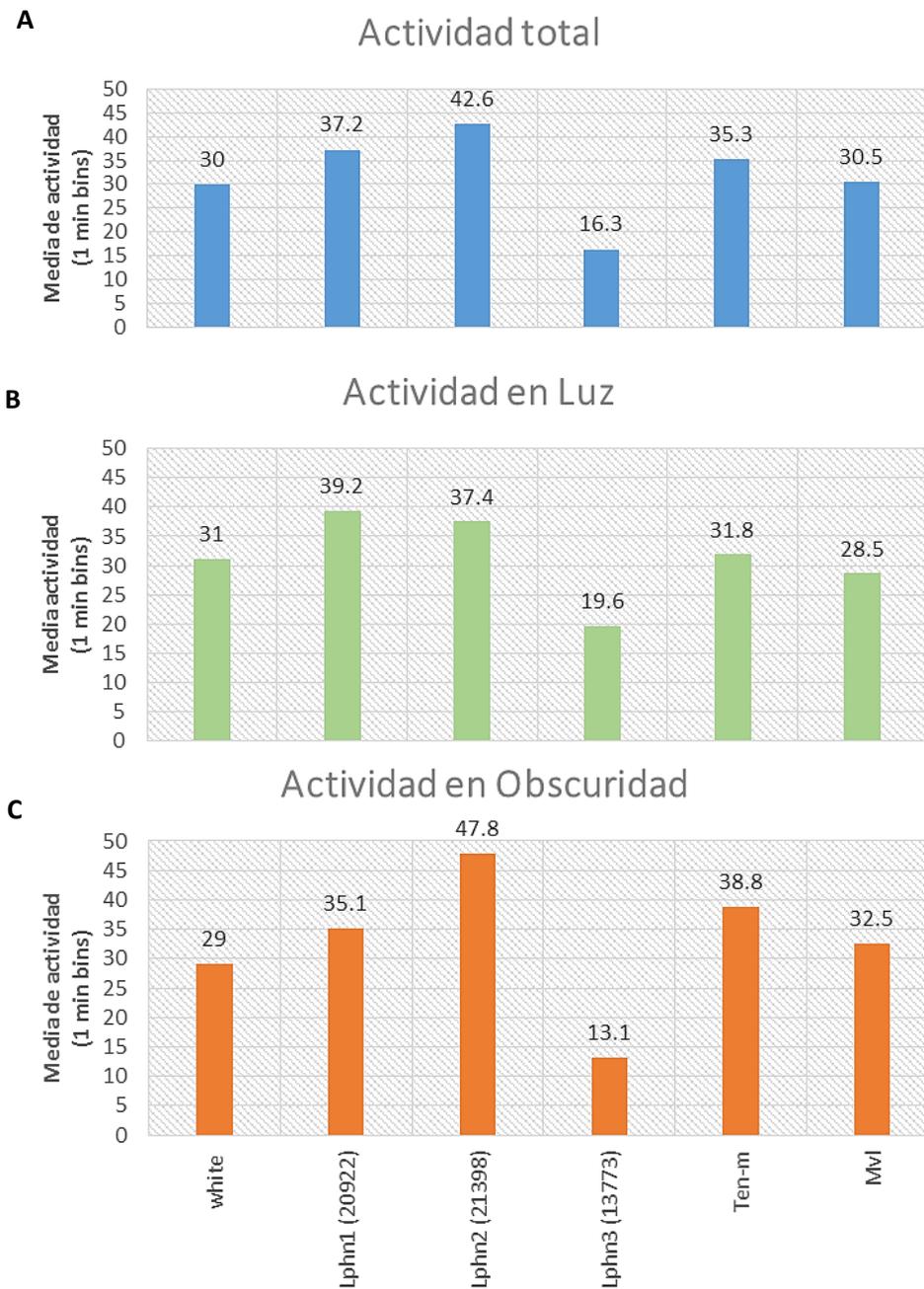


Fig 15. Mediciones de actividad en las cepas mutantes. Los valores mostrados indican la media del número de veces que la mosca atravesó el láser en el equipo de medición durante un periodo de un minuto. **A)** Actividad total (periodo luz y oscuridad). **B)** Actividad de la fase luminosa del protocolo experimental. **C)** Actividad de la fase oscura del protocolo experimental. Se puede apreciar el incremento en la actividad, con respecto a la cepa White isogénica control, de las cepas Lphn1 y 2 tanto en los periodos de luz como de oscuridad. Así también, se aprecia el incremento de la actividad de las cepas Ten-m y Mvl en la fase luminosa. Los números en paréntesis corresponden al número de catálogo de las cepas en el “Bloomington Drosophila Stock Center” (ver tabla 1).

10.4 Herramientas moleculares para el estudio de la interacción Lphn y Ten in vitro.

10.5 Amplificación, extracción y purificación de vectores de expresión

Para verificar la identidad de los plásmidos purificados, se realizaron ensayos de digestión con el fin de evaluar el patrón específico de bandas en gel de electroforesis (Fig. 17): **A)** La representación esquemática de la estrategia de corte sobre el vector *PFLC-Lphn* que contiene la secuencia completa de *Lphn* de *Drosophila melanogaster* y **B)** El gel de agarosa que contiene al vector con y sin digerir. El patrón de bandas de la restricción del vector se corresponde con el esperado según la estrategia de digestión, lo que indica que la amplificación, extracción y purificación del vector fueron exitosas.

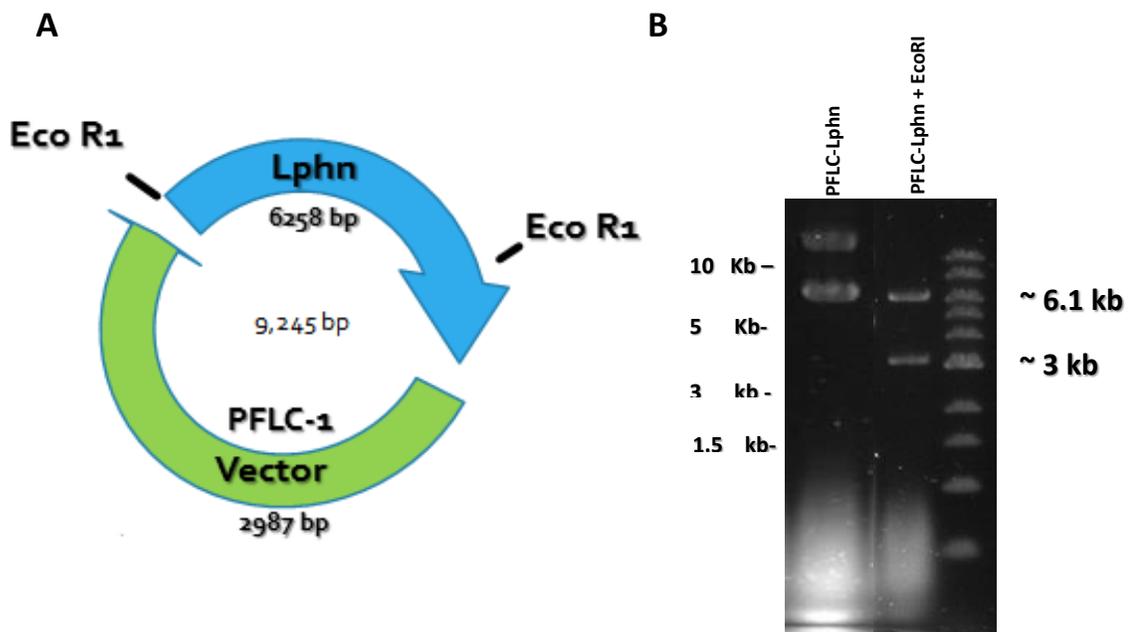


Fig. 17 Estrategia para la verificación de identidad del plásmido PFLC-Lphn. **A)** Representación esquemática de la estrategia de digestión con *EcoRI*. En verde se esquematiza el vector y en azul la secuencia de *Lphn*. **B)** Gel de agarosa teñido con Sybr Safe que muestra al vector sin restringir (Carril 1) y el patrón de bandas obtenido después de la digestión. A la derecha se indica el tamaño de las bandas restringidas y se anotó a la izquierda del marcador de peso.

Se muestra en *Fig.18: A)* la representación esquemática de la estrategia de corte sobre el vector *pUAS-Tenm* que contiene la secuencia completa de *Ten-m* de *Drosophila melanogaster* y **B)** El gel de agarosa que contiene al vector con y sin digerir. El patrón de bandas de la restricción del vector muestra las bandas de 10.8 Kb y 1.3 Kb esperadas debido a los cortes 2 y 3, pero no se obtuvo la banda de 4.6 Kb esperada debido al corte 1 y 2. En consecuencia se realizó una nueva estrategia de corte que incluye a los sitios *BglIII* y sitios adicionales de restricción para *XbaI* y *XhoI* predichos sobre la secuencia de *Ten-m*, como se muestra en *Fig.19*. El patrón resultante de la digestión con *XhoI* y *BglIII* es el de los fragmentos de 1.3 Kb, 1.6 Kb y >10Kb esperados entre los cortes 3-4, 4-5 y 5-2 respectivamente, pero no aparece el fragmento de 4.6 Kb esperado entre 1-3. Por otra parte el patrón que resulta de la digestión que combina a *XbaI* y *BglIII* es el de los fragmentos de 1.3 Kb, 4.5Kb y 8.4 Kb esperados entre los cortes 3-4, 2-3 y 4-2 respectivamente, pero no apareció el fragmento de 2.3 Kb esperado entre los cortes 4-6. Además, al hacer la suma del peso total del plásmido, ésta resulta en ~14.2 kb lo que significa la ausencia de ~2.6Kb del vector. El análisis detallado de los patrones de corte sugiere que el plásmido purificado contiene la secuencia completa de *Ten-m* ya que el patrón de bandeos coincide con todos los cortes que se hacen sobre la secuencia del gen, pero que a la secuencia del vector le hacen falta ~2.5Kb porque carece de los sitios de corte 1 [*BglIII*] y 6 [*XbaI*] (*Fig. 20*).

Este resultado ha conducido a la necesidad de diseñar iniciadores para secuenciar el vector y asegurar que la región faltante no contenga ningún sitio de importancia para la expresión de las construcciones. Sin embargo, la secuencia de *Ten-m* aún puede ser utilizada como molde para las reacciones de extensión por iniciadores y la posterior inserción de la secuencia de GFP.

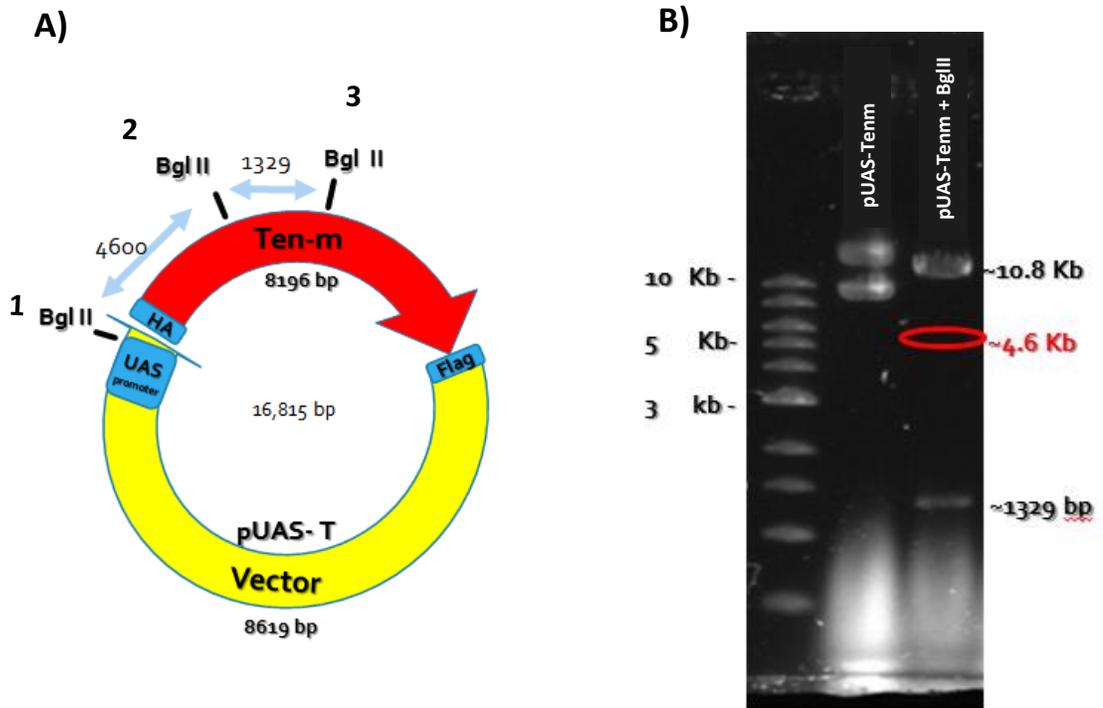


Fig. 18 Estrategia para la verificación de identidad del plásmido pUAS-Ten-m. A) Representación esquemática de la estrategia de digestión con BglIII. En amarillo se esquematiza el vector y en rojo la secuencia de Ten-m. **Nótese:** La presencia de banderas (Flag y HA) además de la secuencia promotora UAS. Los números del 1 al 3 indican sitios de corte. Las flechas dobles señalan la extensión (en pares de bases) de los fragmentos entre cortes. B) Gel de agarosa teñido con SybrSafe que muestra al vector sin restringir (Carril 1) y el patrón de bandas obtenido después de la digestión (carril 2). A la derecha se indica el tamaño de las bandas restringidas (en rojo se distingue la ausencia de bandas esperadas) y se indica a la izquierda el marcador de peso.

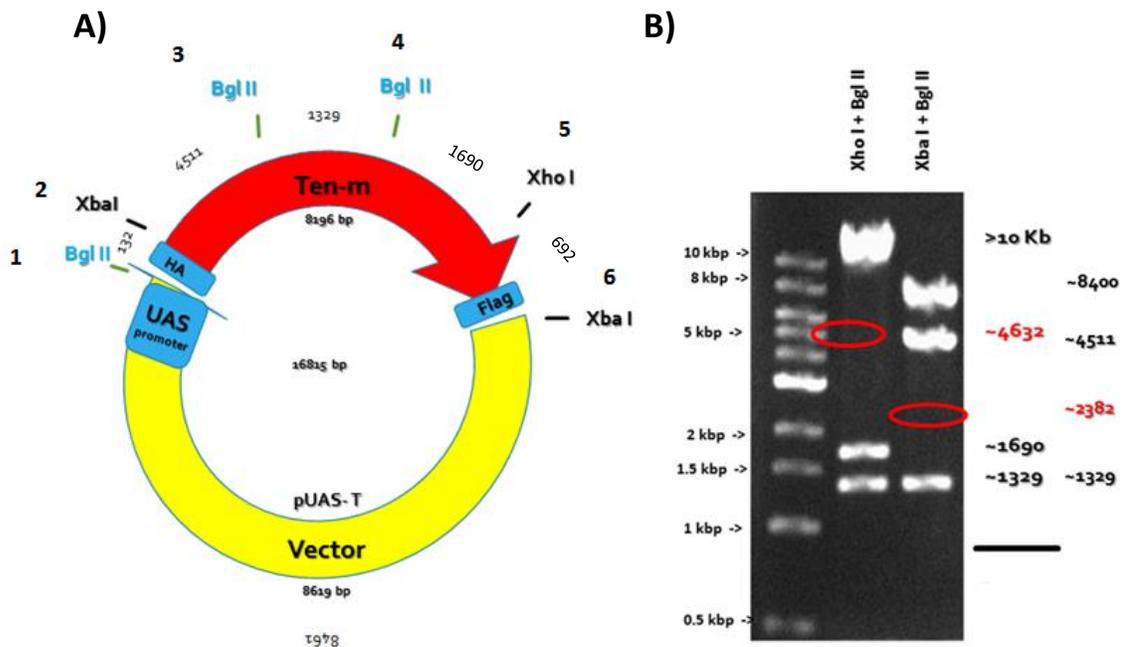


Fig. 19 Segunda estrategia para la verificación de identidad del plásmido pUAS-Ten-m. A) Representación esquemática de la estrategia de digestión con BglII. En amarillo se esquematiza el vector y en rojo la secuencia de Ten-m. Los números del 1 al 6 indican sitios de corte. Los números entre cortes señalan la extensión (en pares de bases) del fragmento resultante. B) Gel de agarosa teñido con SybrSafe que muestra al vector sin restringir (Carril 1) y el patrón de bandas obtenido después de la digestión (Carril 2). A la derecha se indica el tamaño de las bandas restringidas (en rojo se distingue la ausencia de bandas esperadas) y se indica a la izquierda el marcador de peso.

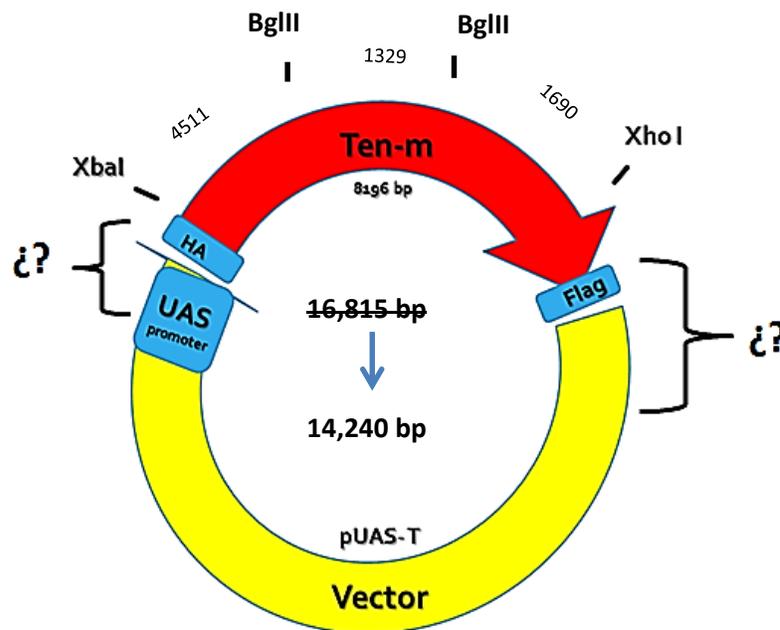


Fig. 20- Representación esquemática de las limitaciones encontradas durante análisis del vector pUAS-Ten-m. Se muestra en amarillo al vector y en rojo la secuencia de Ten-m. El análisis del patrón de digestión sugiere que, de los sitios de restricción predichos, sólo los que se encuentran sobre la secuencia de Ten-m se mantienen. Además hace falta una secuencia de ~2.6 Kb (nuestro vector tiene solo ~14.2 Kb de las ~16.8 supuestas). **Nótese:** la posibilidad de que la secuencia ausente podría afectar al promotor UAS.

10.6 PCR para mutagénesis por el método de extensión con iniciadores

Con el fin de iniciar la construcción de las proteínas de fusión Lphn::GFP-11 y Ten-m::GFP1-10, para probar su interacción específica *in vitro*, se utilizaron los vectores de expresión *PFCL-1-Lphn* y *pUAS-Ten-m* como moldes para insertar un sitio de restricción para *MluI* o *KpnI*, en la secuencia codificante para Lphn o Ten-m, respectivamente, mediante el método de extensión por iniciadores (Ver sección 5.6). Para efectos de claridad llamaremos mutación A a la inserción del sitio *MluI* en Lphn y mutación B a la inserción del sitio *KpnI* en la secuencia de Ten-m.

Las mutaciones **A** y **B** se comenzaron partiendo de las reacciones 1 y 2 que se muestran en las *tablas 8 y 9* (Ver métodos 5.6 y *Fig.5 para explicación*). Los fragmentos de PCR se analizaron en un gel de electroforesis en agarosa.

Tabla.8.- Condiciones de PCR para las reacciones 1 y 2 de las mutaciones A y B

Proceso de reacción	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	3 min	1
Desnaturalización	98°C	10 seg	30
Alineamiento	55°C	15 seg	30
Extensión	68°C	1 min por Kb	30
Extensión final	68°C	7 min	1

Tabla.9.- Tamaño esperado de los fragmentos después de la ronda de PCR. Se muestra la combinación de iniciadores para cada amplificación y el número de reacción.

Mutación	Combinación de iniciadores	Ronda de PCR	Tamaño esperado de fragmento (bp)
A (Fragmento 1)	<i>Frw 1-A; Rev 1-A</i>	Reacción 1	941
A (Fragmento 2)	<i>Frw 2-A; Rev 2-A</i>	Reacción 2	2525
B (Fragmento 1)	<i>Frw 1-B; Rev 1-B</i>	Reacción 1	883
B (Fragmento 2)	<i>Frw 2-B; Rev 2-B</i>	Reacción 2	7430

Para ambas mutaciones se obtuvieron los fragmentos esperados en ambos ciclos de PCR (Ver Figs. 21 y 22). Entonces, se realizó la tercera ronda de PCR, tomando como molde a los fragmentos 1 y 2 extraídos directamente del gel (producto de amplificación). Las condiciones de PCR fueron las mismas que se describen en la *tabla 9*. La *tabla 10* muestra el tamaño esperado de los fragmentos mutados después de la amplificación, los cuales se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

Tabla.10.- Tamaños esperados de fragmentos después de reacción 3

Mutación	Combinación de iniciadores	Ronda de PCR	Tamaño esperado de fragmento (bp)
A (Traslape 1y 2)	<i>Frw 1-A; Rev 2-A</i>	Reacción 3	3470
B (Traslape1 y 2)	<i>Frw 1-B; Rev 2-B</i>	Reacción 3	8282

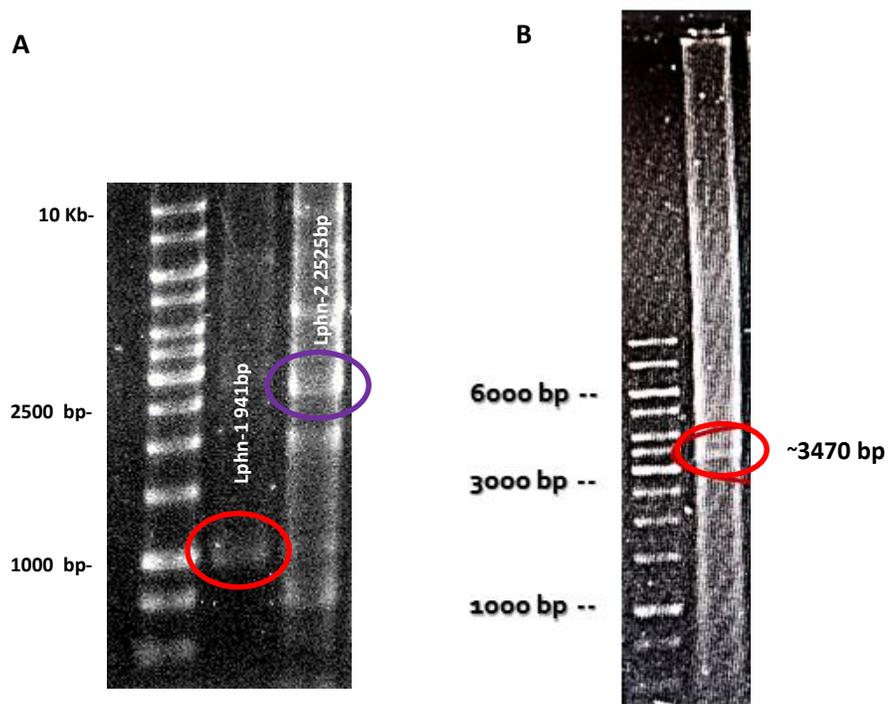


Fig.21. Generación de mutación A. A) Se muestran los fragmentos 1 (~941 bp) y 2 (~2525 bp) B) se Muestra el fragmento de traslape de los fregmentos1 y 2 (~3470 bp).

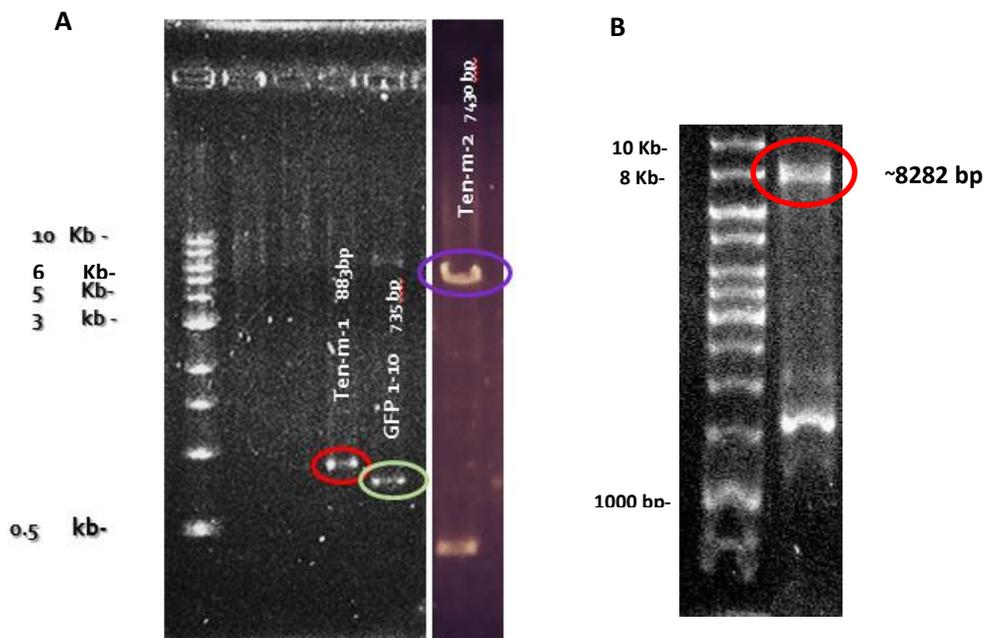


Fig.22. Generación de mutación B. A) Se muestran los fragmentos 1 (~883 bp) y 2 (~7430 bp) además de un fragmento de GFP para su posterior inserción en el fragmento mutante. B) se Muestra el fragmento de traslape de los fregmentos1 y 2.

Los resultados indicaron finalmente la obtención de las mutaciones A y B que se describen esquemáticamente en *Fig.23*

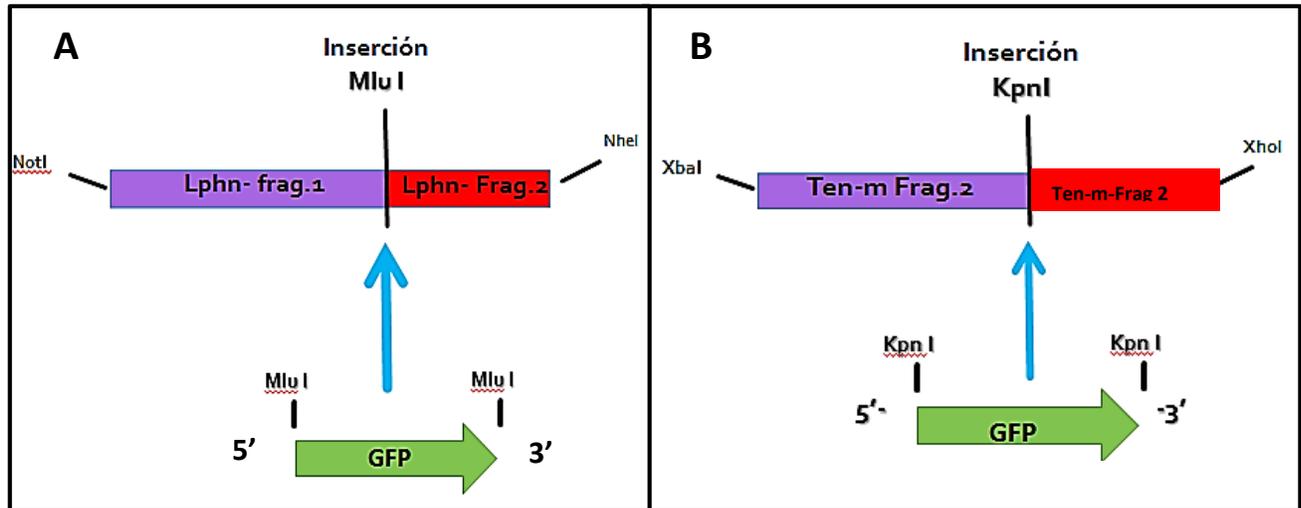


Fig.23. Productos finales de la mutagénesis por extensión con iniciadores (mutaciones A y B). Se indican los sitios de restricción que flanquean al producto final. También se ejemplifica el método para la inserción de la secuencia de GFP (flanqueada por los sitios específicos para los que se generó la mutación).

10.7 *Ten-m* se expresa en el SNC, los lóbulos ópticos y los órganos cordotonaes de *Drosophila melanogaster*

Para determinar qué células en *Drosophila* son las que expresan *Ten-m* utilizamos una cepa mutante que expresa al gen de la proteína amarilla fluorescente asociada con el promotor de *Ten-m* (*Ten-m*^{Gal4, EYFP}) y se analizó la larva completa mediante microscopía confocal.

Durante el periodo larvario, la expresión de *Ten-m* se observó principalmente en tres estructuras: **1)** Expresión prominente en el sistema nervioso central (*Fig. 24 A asterisco*) **2)** en el órgano de Bolwig (órgano visual de la larva) que extiende un axón largo que contacta con los lobulos ópticos en el sistema nervioso central (*Fig 24 A Flechas*) **3)** en los órganos cordotonaes (órganos mecanosensores) que aparecen en par por cada segmento en el eje

longitudinal de la larva (Fig. 24 A-D). En éste último, su expresión parece estar limitada a las células escolopoidales (Fig. 24 C y D).

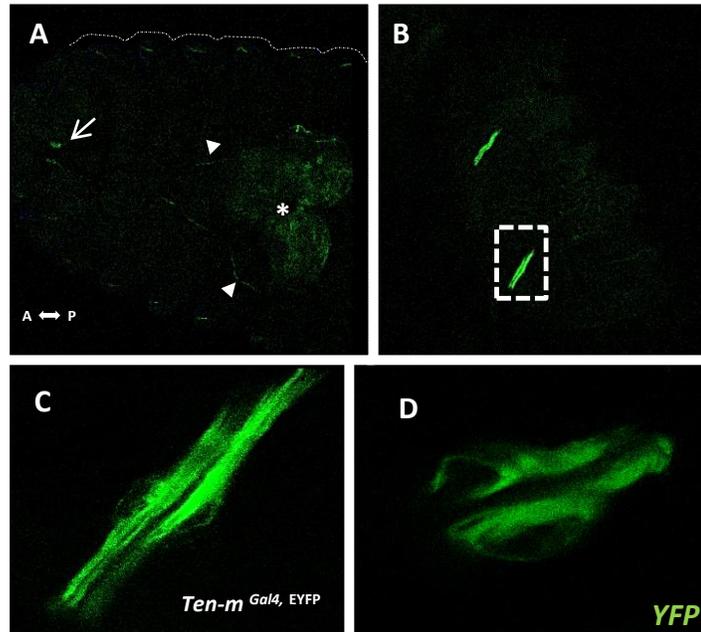


Fig.24 Patrón de expresión de *Ten-m* en larva de *Drosophila*. **A)** Magnificación 10x de segmento anterior de larva *Ten-m*^{Gal4, EYFP}. Se aprecia **1.-** el órgano de Bolwig como una estructura en par (Flecha blanca) de la que surgen dos axones (puntas de flecha) que proyectan hacia el cerebro (asterisco) y **2.-** La distribución segmentada de estructuras fluorescentes pares (a lo largo de línea blanca punteada que describe el borde lateral de la larva) que asemejan la distribución de los órganos cordotonaes **B)** Magnificación 40x de dos estructuras que asemejan a los órganos cordotonaes. **C)** inserto en B (60x). Se aprecia la aposición de dos células paralelas que, atendiendo a criterios morfológicos, podrían ser células escolopoidales de los órganos cordotonaes **D)** Magnificación 60x de una muestra en la que se aprecia la compresión en longitud de las células escolopoidales putativas. A <-> P = Eje antero-posterior.

Para la visualización del patrón de expresión de *Ten-m* en el cerebro adulto, se realizó una cruce entre una mosca con genotipo *Ten-m*^{Gal4, EYFP} (que asocia la expresión del factor de transcripción Gal4 con la del promotor de *Ten-m*) y una cepa reportera con genotipo *UAS-RFP-stinger*, que contiene al gen reportero de la proteína roja fluorescente más *stinger*, que dirige a RFP hacia el núcleo, asociados con la secuencia promotora UAS), de esta manera, las células que expresan a *ten-m* pueden visualizarse por YFP y contienen en sus núcleos a RFP.

En el cerebro adulto de *Drosophila* Ten-m se observa prominentemente en el ojo compuesto, en donde residen los núcleos de las neuronas que proyectan directamente hacia los lóbulos ópticos (que demuestran un patrón extendido de proyecciones desde el ojo, Fig. 25 A-C). En el panel B de la figura 25 se ve un acercamiento del ojo compuesto de la mosca y pueden apreciarse los núcleos de las células que expresan Ten-m. En el panel C se aprecia el quiasma formado por los axones provenientes del ojo hacia el lóbulo óptico. También se observa expresión generalizada de Ten-m, reminiscente del patrón observado en el cerebro de la larva, en todo el cerebro adulto (Ver Fig. 24 A).

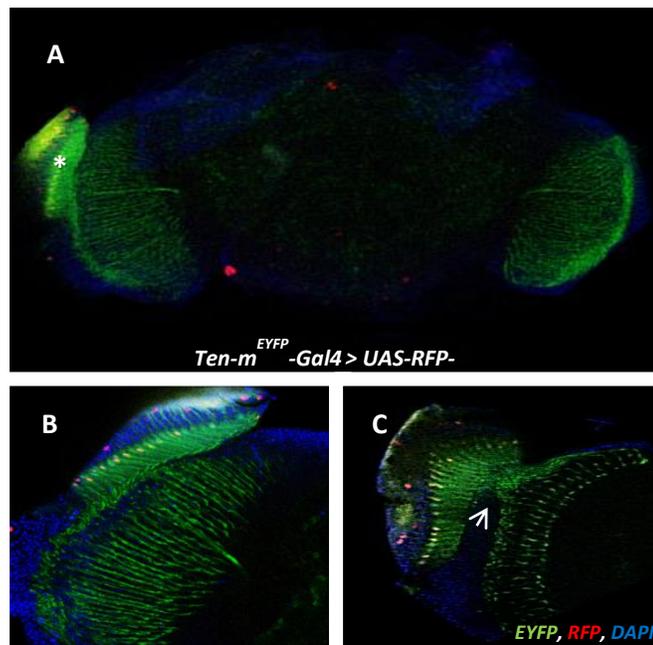


Fig.25 Patrón de expresión de Ten-m en cerebro adulto de *Drosophila*. A) Cerebro completo de *Drosophila* con genotipo *Ten-m^{EYFP}-Gal4 >UAS-RFP-stinger* (Magnificación 20x). Se aprecian dos estructuras laterales (Lóbulos ópticos) con amplia expresión de Ten-m. Además se observa expresión en el ojo compuesto de la mosca (asterisco). También se aprecia un patrón extendido y menos prominente por todo el neuropilo. B) Magnificación de A (60x) sobre la región que contiene al ojo compuesto. Se puede ver en verde el patrón extendido de proyecciones que emergen desde el ojo compuesto (Núcleos de las células en rojo) y se dirigen hacia el lóbulo óptico. C) Se muestra un corte profundo de la misma región que en B para señalar la aparición del quiasma óptico.

11. Discusión:

11.1 Caracterización genética y conductual

El TDAH es un desorden psiquiátrico de alta prevalencia en la población mundial y de etiología compleja que incluye factores genéticos y ambientales. En este trabajo consideramos que se puede usar a *Drosophila melanogaster* para evaluar procesos relacionados con el TDAH como la interacción entre Latrofilina y Teneurina, el efecto de mutaciones en estas proteínas y del transportador de hierro, así como los desbalances en la función dopaminérgica y cambios en los niveles de actividad asociados con las inserciones de elementos-P en los genes de *Lphn*, *Ten-m* y *Mvl*.

Una de las formas en que puede usarse a *Drosophila* como herramienta para el estudio de genes conservados evolutivamente, y que se consideran responsables de enfermedades humanas, es la generación de líneas mutantes (i.e. mediante la inducción de mutaciones químicas con etil metano sulfonato [EMS], inducción de mutaciones por inserción de elementos P en el genoma, utilización de RNAi o la inserción/delección de segmentos genómicos por recombinación homóloga) que modelen algunos de los aspectos de la enfermedad en cuestión. En el caso particular de los desórdenes del desarrollo (para los que muchos genes tienen un alto grado de conservación evolutiva en *Drosophila*, Reiter et al., 2001) las mutaciones de genes humanos homólogos a menudo afectan el mismo tejido o tipo celular que en *Drosophila* durante el desarrollo (Reiter et al., 2001). En este trabajo se seleccionaron líneas mutantes de *Drosophila* en los genes *Lphn*, *Ten-m* y *Mvl*, que tienen su homólogo en humanos y que se han asociado con diversas alteraciones del desarrollo (Bonaglia et al., 2010) además del TDAH (Arcos-Burgos et al., 2010). Las mutaciones en las cepas que utilizamos se deben a la inserción de un elemento transposón (P-element) que al estar posicionado río arriba de la región promotora en el gen (*Ver fig. 12 en resultados*) pueden teóricamente generar una baja eficiencia de transcripción o la pérdida completa de su expresión. Nuestros resultados

indican que dichas mutaciones afectan la expresión de los genes de interés, dándonos como resultado cepas mutantes hipomórficas, es decir, cepas donde la expresión del gen es reducida pero no anulada. Aunque los datos aquí mostrados son el resultado de repeticiones técnicas que deberán ser confirmados con un análisis más exhaustivo que incluya repeticiones biológicas. Por esta razón el análisis subsecuente que aquí se hace deberá tomar en consideración los resultados como una fuente preliminar de ideas para delinear el trabajo futuro. Dicho esto, del análisis de expresión génica realizado es interesante destacar los siguientes resultados:

1) Las mutaciones *Lphn1* y *Lphn2* generaron una baja en la expresión de las isoformas largas de Latrofilina y una sobreexpresión de las isoformas cortas. En *Drosophila* se describen variantes isoformicas largas y cortas del transcrito debidas al procesamiento alternativo del ARNm. La expresión inversa de las isoformas tras la manipulación genética podría estar sugiriendo funciones diferenciales de las mismas (en procesos no traslapados) que deberán ser probadas para entender mejor la función del gen.

2) El ARNm de las formas largas de *Lphn* incrementa tras la mutación en *Mvl* (y *viceversa*, en el mutante *Lphn2* se nota un ligero aumento en la expresión de *Mvl*).

La evidencia en la literatura científica ha sugerido una relación entre la homeostasis del hierro y la función dopaminérgica, además de una relación entre el hierro y el TDAH; asimismo se ha sugerido que *Lphn* juega un papel en la etiología del TDAH. La observación de que la reducción de la expresión de *Lphn* o *Mvl* cause una elevación en la expresión de *Mvl* o *Lphn*, respectivamente, puede sugerir una interacción genética entre ambos, que de confirmarse, dará pistas sobre el papel que juega el hierro en la etiología del TDAH.

3) El ARNm de *Ten-m* reduce su expresión en todas las cepas mutantes en *Lphn* y en la cepa mutante en *Mvl*.

En mamíferos, *Lphn* y *Ten* son capaces interactuar específicamente y de formar contactos adhesivos *in vitro*. Ambas moléculas se han visto implicadas en el desarrollo

del sistema nervioso y localizadas en los sitios de contacto sináptico, sin embargo, el papel funcional de su interacción no se conoce. En nuestro análisis, la reducción de la expresión de *Ten-m* cuando se ha mutado a *Lphn* puede estar indicando una interacción a nivel genético que, de poder confirmarse, permitirá investigar la regulación de la expresión del par molecular y su homeostasis en el tejido nervioso.

Una vez analizado el patrón de expresión de los genes de interés en las cepas mutantes, nuestra siguiente aproximación fue la evaluación conductual de las mismas, para lo cual utilizamos el monitor de actividad de *Drosophila* (*Drosophila Activity Monitor System*): una prueba estándar que permite la medición de la actividad y los patrones de sueño y vigilia de moscas individuales.

Los resultados indicaron un cambio notorio en el nivel general de actividad de todas las cepas mutantes, especialmente de las cepas *Lphn1* y *Lphn2* que demostraron el mayor porcentaje de reducción de la expresión de *Lphn* en los análisis previos. Además, estas dos últimas cepas mantuvieron el nivel elevado de su actividad durante ambas fases (luz y oscuridad) del protocolo experimental, esto puede ser indicativo de que la reducción del gen es capaz de alterar fuertemente los sistemas que controlan la conducta motora y/o el ciclo sueño vigilia, aunque éste último no mostró alteraciones evidentes en nuestros análisis (*Fig.14*). Por otra parte, las cepas mutantes en *Mvl* y *Ten-m* demostraron un incremento en su actividad únicamente durante la fase oscura del protocolo de evaluación.

Nuestras observaciones son interesantes en vista de la evidencia que indica que la actividad dopaminérgica es responsable del incremento de la actividad mediante la inhibición de la iniciación del sueño en el periodo nocturno (Shang et al., 2011), debido a la posible participación de estos genes en el TDAH, y son consistentes con los del estudio de der Voet et al., 2015., quienes durante la realización de nuestro proyecto publicaron evidencia conductual en moscas con un ARNi para el gen de *Lphn* y demostraron un fenotipo de actividad incrementada y periodos de sueño más cortos comparado contra moscas control; dichos fenotipos, aunque significativos, fueron modestos posiblemente por la incompleta anulación de la función del gen (no mostrado en la publicación de der Voet et al., 2015) y se aliviaban parcialmente administrando metilfenidato. Será

interesante probar por una afectación en esta y otras conductas (*i.e. atención, memoria, aprendizaje*) cuando la función del gen se suprime completamente. Afortunadamente Scholz et al. (2015), han logrado generar una cepa viable de *Drosophila* “*Knockout*” de *Lphn* para la cual no se ha realizado una evaluación conductual exhaustiva; los experimentos aquí descritos y otros clave deberán conducirse en esta nueva línea mutante para poder dar conclusiones más precisas (Por ejemplo se ha demostrado que los órganos cordotonales de *Drosophila* se ven implicados en la regulación de los ciclos circadianos enviando estímulos desde la periferia hacia el sistema nervioso (Sehadova et al., 2009) y nuestros hallazgos sugieren que la interacción entre *Lphn* y *Ten* podría jugar un papel importante en la función de éstas estructuras [Ver sección 11.3] por lo que vale la pena probar por afecciones a la conducta de nuestras mutantes en el mismo tipo de ensayos). Hasta el día de hoy sin embargo, la información disponible sugiere que la *Lphn* puede regular la conducta locomotora en *Drosophila*, dándole validez a la hipótesis de que las afecciones en este gen se implican en la función dopaminérgica y son susceptibles de ser estudiadas en este organismo en vistas hacia un modelo de TDAH.

11.2 Construcción de vectores de expresión.

En este trabajo la construcción de vectores consiste en la utilización de secuencias de ADN plasmídicas a las que podemos insertar secuencias extrañas. El propósito es obtener una construcción final que exprese a *Lphn* de *Drosophila* fusionada con un fragmento de la proteína fluorescente (GFP 1-10), inserta justo antes del dominio de Lectina en *Lphn*, capaz de reconstituirse al contactarse de manera específica con Ten-m de *Drosophila* fusionada con su complemento (GFP 11) inserta en su región C terminal.

Hasta el momento de la realización de este texto, las construcciones *Lphn::GFP* y *Ten::GFP* están en proceso, habiéndose creado ya los sitios de restricción que permitan insertar a GFP's en la región correspondiente (Ver Fig 23). Sin embargo, algunos problemas han detenido los procedimientos siguientes, que consisten en subclonar los fragmentos mutados en el plásmido original para finalmente añadir las secuencias de GFP y probar su expresión en cultivos celulares. Éstos se enlistan a continuación:

1) **Ligación de los fragmentos que contienen las mutaciones A y B en plásmido original.**

Hasta el momento las ligaciones realizadas con el intento de clonar el fragmento mutado dentro del vector original han resultado en el nulo crecimiento de colonias bacterianas una vez que han sido transfectadas con el plásmido supuestamente reconstruido (ligado). Esto podría deberse a las razones siguientes:

- A) El vector y el fragmento no contienen los sitios apropiados para la ligación. Esta idea, aunque posible es poco probable, ya que los fragmentos de traslape llevan en sus extremos sitios de restricción que dan origen a cortes "pegadizos" (*Xba I*, *Xho I*, *Nhe I*, *Not I*). La extensiones de los fragmentos 1 y 2 parecen funcionar ya que amplifican fragmentos en el rango de tamaños correspondientes, lo que nos hace suponer que el problema está en algún paso de la ligación.

- B) Proporción inserto vector: Después de las amplificaciones, los fragmentos son purificados para su ligación mediante un kit (Invitrogen, Cat.K220001). Las cantidades de ADN recuperadas son pobres, siendo de ~15% de la concentración original. Por esta razón se hace un ajuste de las proporciones moleculares inserto-vector en la ligación que finalmente es 1:1. Esto podría ocasionar pocos eventos de ligación (ya que para promover una tasa eficiente de ligación se requiere una razón molar 1:1 de inserto vector [A diferencia de la razón 1:1 en número de moléculas que aquí estamos forzados a probar], además de que reduce la cantidad de ADN disponible durante el proceso de transformación bacteriana).
- C) Un tercer problema puede derivar de que la amplificación de los fragmentos 1 y 2 en el protocolo de extensión por iniciadores, originan bandas inespecíficas, después de lo cual se seleccionan por peso molecular las que se ajustan al tamaño esperado. Una posibilidad es que en el proceso de selección de bandas, éstas sean elegidas incorrectamente por similitud en sus pesos. Se propone revisar con detalle los protocolos de PCR para buscar errores en su estandarización (*i.e. Temperatura de alineamiento, número de ciclos de amplificación, temperatura de extensión, tamaño del vector*) y conseguir amplificaciones específicas. Además se propone revisar los iniciadores con el objetivo de corregir posibles errores de diseño.

Estas posibilidades están siendo evaluadas para obtener una alta eficiencia de ligación y proporciones óptimas de clonas plasmídicas para su transformación.

2) El vector que contiene a *Ten-m* carece de una secuencia de ~2.6 Kb.

El análisis de los fragmentos de restricción para verificar la identidad del vector *Ten-m-pUAS* indica que el plásmido carece de un fragmento dentro de la región correspondiente a la secuencia del vector, misma que podría estar afectando la región promotora UAS y la

consecuente transcripción del gen en el vector. Para probar la integridad del vector, haremos una secuenciación que nos indique que al vector no le faltan las secuencias promotoras. Además, se están llevando a cabo ensayos de co-transfección, para verificar mediante inmunodetección la presencia de *Ten-m* en la fracción membranal de las células co-transfectadas. Con estas dos estrategias decidiremos si es apropiado continuar la construcción sobre este vector o utilizar uno nuevo de secuencia conocida.

3) El vector que contiene *Lphn* no tiene etiqueta para su identificación:

La identificación de la expresión de las construcciones se hará mediante una etiqueta (HA o Flag). El vector *pUAS-Ten-m* inserta ambas etiquetas en el dominio 5' y 3' de la secuencia de *Ten-m* respectivamente y esto nos permitirá visualizar la proteína UNA expresada en las células HEK293. El vector *PFLC-Lphn* en cambio, no tiene ninguna etiqueta que permita la identificación de *Lphn* una vez traducida. La estrategia para la resolución del problema consiste en la subclona de la secuencia completa de *Lphn* en un vector PCMV que insertará una etiqueta *Flag* a la construcción. Posteriormente, *Flag-Lphn* se transferirá a un vector pUAS para su expresión mediada por el sistema *Gal4-UAS* en células HEK293 (Ver métodos 8.2; Fig 27).

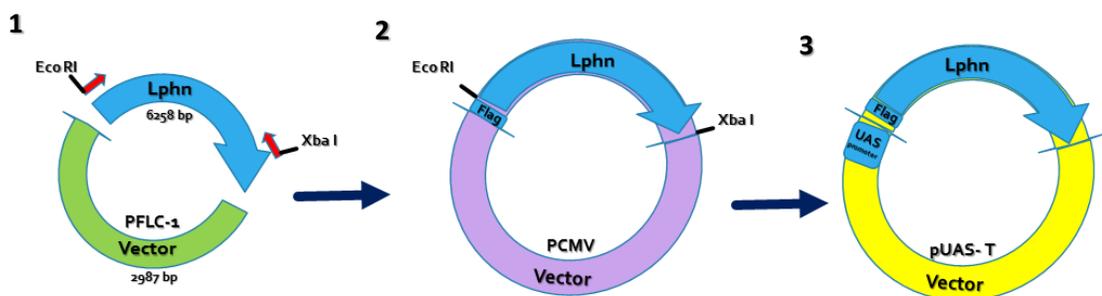


Fig. 27 Estrategia para la inserción de etiqueta Flag en Vector PFLC-Lphn. 1) Extensión por PCR de secuencia completa de *Lphn*. Los iniciadores insertan secuencias de corte para *EcoRI* y *XbaI* en los extremos, mismos que serán utilizados para su subclona en un vector PCMV. **2)** Vector PCMV. Se muestra esquemáticamente los sitios de restricción para *EcoRI* y *XbaI* y la secuencia inserta de *Lphn*. **3)** El tercer paso de la estrategia consiste en cortar la secuencia de *Flag-Lphn* para su subclona en un vector pUAS.

11.3 Patrón de expresión de *Ten-m* en larvas y en el cerebro de la mosca adulta

Lphn y *Ten* son dos moléculas evolutivamente conservadas que han demostrado tener funciones en el desarrollo y la función sináptica. Además, los homólogos de *Lphn* y *Ten* de los mamíferos son capaces de interactuar para mediar adhesiones célula a célula en cultivo; sin embargo, hasta el día de hoy no se ha probado la conservación de la interacción en invertebrados, no existe evidencia de su interacción *in vivo*, y no se tiene información acerca del papel funcional que pueda mediar dicha interacción. Evaluar su posible interacción en un modelo de invertebrados como *Drosophila* puede darnos pistas sobre mecanismos universales de interacción de este par y ayudará a investigar su papel funcional.

Con el fin de conocer el patrón de expresión de *Ten-m* en *Drosophila in vivo* hicimos uso de una cepa reportera en la que el gen de la proteína amarilla fluorescente se asocia con el promotor de *Ten-m*. La evaluación muestra que *Ten-m* se expresa de manera extendida en todo el cerebro de *Drosophila* durante el periodo larvario (Fig. 24). Este patrón de localización en una etapa de desarrollo temprano es sugestivo de una importante función en el desarrollo de este órgano y da soporte a la idea sugerida de una función de *Ten-m* en el desarrollo de circuitos sinápticos.

Ten-m también mostró un patrón de localización en el que, atendiendo a criterios anatómicos y morfológicos, creemos son las células escolopoidales de los órganos cordotonales de la larva (Fig. 24 A-D). Los órganos cordotonales de la larva de *Drosophila* son estructuras compuestas que gobiernan la percepción de estímulos mecánicos incluyendo estímulos propioceptivos, tacto y sonido (Yack; 2004). Las células escolopoidales a son las principales células de soporte que recubren a las neuronas sensoriales encargadas de la recepción y envío de estímulos hacia el sistema nervioso central y se cree que son capaces de regular su función mediante el acople de su capacidad de estiramiento o contracción con la generación de estímulos apropiados sobre las neuronas sensoriales (Yack, 2004; Fig.28).

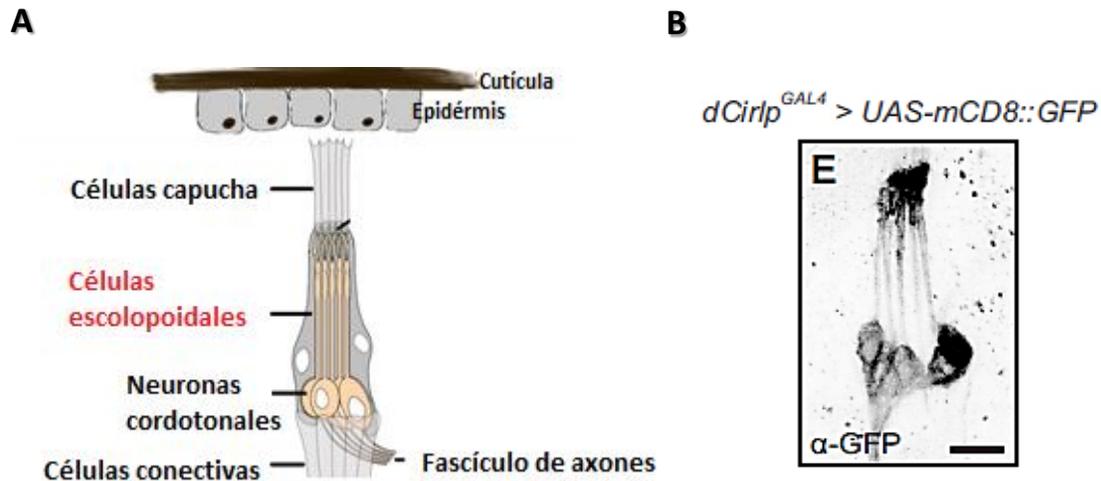


Fig. 28. El órgano cordotonal de *Drosophila melanogaster*. Se muestra en **A)** Figura esquemática de un órgano cordotonal señalando sus principales tipos celulares así como los tejidos a los que se asocia en el cuerpo de *Drosophila*. Nótese: la localización de las células escolopoidales que recubren a las neuronas cordotonaes sensoriales regulando su función. **B)** Inmunohistoquímica para GFP, usada como reportero de *Lphn*, muestra la localización de esta última específicamente sobre las neuronas cordotonaes de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Scholz et al., 2015).

Es interesante destacar que, bajo esta observación, la idea de una interacción in vivo entre *Ten-m* y *Lphn* cobra fuerza en vista de un trabajo de reciente publicación que indica que *Lphn* se expresa en las neuronas sensoriales de los órganos cordotonaes (recubiertas por las células escolopoidales que expresan *Ten-m*). En su trabajo Scholz et al., 2015 han sugerido que en el periodo larvario de *Drosophila* *Lphn* es capaz de modular la mecanosensación a través de regular la respuesta eléctrica de las neuronas sensoriales en los órganos cordotonaes, donde su papel podría estar asociado con la regulación de la respuesta de otras moléculas especializadas en la mecano-sensación. De esta manera, las observaciones de Scholz et al. 2015 complementan a las que aquí mostramos y dan soporte a nuestra hipótesis. Además, en conjunto estas observaciones proveen pistas sobre nuevos mecanismos de acción para éste receptor de adhesión.

Ten-m también se observa expresada en los órganos de Bolwig, estructuras par que componen el sistema visual de la larva y cumplen funciones en la regulación de los ritmos

circadianos (Fig. 24 A; Hassan et al., 2005). A partir de éstos, se puede distinguir un largo axón que proyecta hacia el sistema nervioso central. Estos axones originan de las células fotorreceptoras, que son de origen neural, encargadas de transmitir las señales del medio hacia el sistema nervioso central para su procesamiento (Hassan et al., 2005). De manera interesante el patrón de expresión de *Ten-m* en el cerebro de *Drosophila* adulta se describe también extensamente en axones que conectan directamente hacia los lóbulos ópticos y que se originan en las células fotorreceptoras de los ojos compuestos de la mosca (Fig. 25). El hecho de que *Ten-m* se localice en éstos órganos sugiere que su expresión podría ser importante el desarrollo del sistema visual, la modulación de la función de los fotorreceptores, así como en la regulación de los ciclos sueño vigilia en *Drosophila*. Esta idea es consistente con un estudio reciente de der Voet et al. (2015) quienes, en moscas con un RNAi de interferencia pan-neuronal para *Lphn*, observaron un fenotipo de sueño y actividad anormal que es dependiente de la luz.

12. Conclusiones

- La inserción de los elementos P en las mutantes afecta la expresión de los genes de interés y esto permite la caracterización de las mutantes en evaluaciones de interacción genética y conductuales. *Drosophila* es un organismo útil en el estudio de la función de genes candidatos para enfermedades humanas, y debido a su gran repertorio conductual, el uso de las mutantes que aquí hemos evaluado sugiere que es pertinente continuar con las evaluaciones para determinar la participación de estos genes en el TDAH. Sin embargo, la utilización de la cepa mutante recientemente reportada por Scholz *et al.*, (2015) servirá mejor a los propósitos de esta investigación en el futuro.
- Las mutantes en *Lphn*, *Ten-m* y *Mvl* muestran un incremento de su actividad locomotora y esto es consistente con los datos reportados por der Voet *et al.* (2015) sobre la función de Latrofilina y su traslape con sistemas conductuales dependientes de la función dopaminérgica.
- El patrón de expresión de *Ten-m* y *Lphn* en los órganos cordotonales y en los lóbulos ópticos sugiere la posibilidad de una interacción conservada en *Drosophila* y da pistas sobre nuevos mecanismos de acción de este par molecular.

13. Perspectivas

- Proponemos la finalización de las construcciones para evaluar la posible conservación evolutiva de la interacción entre *Lphn* y *Ten* mediante el ensayo *de (Clyn View)*. Esto podrá dar pistas sobre mecanismos moleculares universales (*i.e.* la selección de blancos y especificidad sináptica) de la función nerviosa y generará avances hacia la creación de un modelo para el estudio del TDAH en *Drosophila melanogaster*. Este ensayo tiene la ventaja de ser específico y sensible a interacciones naturales Proteína-Proteína. Además sentará las bases para generar una herramienta molecular que pueda evaluar la interacción propuesta en organismos vivos.
- Realizar las replicas biológicas de los experimentos de q-PCR omstrados en este texto para confirmar los resultados de expresión génica.
- Profundizar en el análisis conductual (*i.e.* realizar mediciones de actividad en un protocolo de obscuridad total y hacer un análisis de los patrones de sueño en las moscas mutantes).
- Se propone la generación de cepas dobles mutantes (*i.e.* *Lphn /Ten-m*; *Lphn/Mvl*, *Ten-m/Mvl*) para identificar fenotipos combinados que indiquen posibles las interacciones genéticas
- Se propone el estudio de la expresión de *Lphn in vivo*, *para complementar las observaciones sobre la expresión de Ten-m*.
- Se harán manipulaciones dietéticas del hierro, para determinar si éste juega un papel importante en la regulación la interacción *Lphn-Tenm*, *seguido de un análisis de expresión génica y conductual*.
- Evaluar la intergridad del sistema dopaminérgico de *Drosophila melanogaster* después de las manipulaciones genéticas y dietéticas.

14. Referencias

1. Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G. *et al.*, (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 24; 287: 2185-95.
2. Adisetiyo V., Jensen J.H., Tabesh A., Fieremans E., Di Martino A., et al., (2014) Multimodal MR imaging of brain iron in attention deficit hyperactivity disorder: a noninvasive biomarker that responds to psychostimulant treatment?. *Radiology*. 272:524-42.
3. Apostolopoulou A.A., Widmann A., Rohwedder A., Pfitzenmaier J.E., Thums A.S, (2013) Appetitive Associative olfactory learning in *Drosophila* Larvae. *Journal of Visualized Experiments*. (72), e4334.
4. Araç D, Boucard A a, Bolliger MF, Nguyen J., Soltis S.M., Südhof T.C., Brunger A.T., (2012) A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *The EMBO Journal*; 31:1364-78.
5. Arcos-Burgos, M., Jain, M., Acosta, M. T., Shively, S., Stanescu, H., Wallis, D., & Castellanos, F. X. (2010). A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Molecular psychiatry*, 15:1053-1066.
6. Beard J.L., Chen Q., Connor J., Jones B.C. (1994) Altered monoamine metabolism in caudate-putamen of iron deficient rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.48:621-4.
7. Beard J.L., Erikson K.M., Jones B.C., and (2002) Neurobehavioral analysis of developmental iron deficiency in rats. *Behavioral Brain Research*.134:517-24.
8. Betti L., Aslam M.F., Szular J., Mandilarasand K., Missirlis F., (2011) Iron depletion in the intestines of *Malvolio* mutant flies does not occur in the absence of a multicopper oxidase. *The Journal of Experimental Biology*. 214: 971-978.
9. Bianco L.E., Wiesinger J., Earley C.J., Jones B.C., Beard J.L. (2008) Iron deficiency alters dopamine uptake and response to L-DOPA injection in Sprague –Dawley rats. 106:205-15.
10. Boucard, A. a, Maxeiner, S., & Südhof, T. C. (2014). Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 387–402.
11. Borycz J., Borycz J.A., Kubów A., Lloyd V., Meinertzhagen I.A. (2008) *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *Journal of experimental Biology*. 211:3454-66.

12. Burhans M.S., Dailey C., Beard Z., Wiesinger J., Murray-Kolb L., Jones B.C., Beard J.L. (2005) Iron deficiency: differential effects on monoamine transporters. *Nutritional Neuroscience*. 8: 31-8.
13. Carlson ES, Stead JDH, Neal CR, Petryk A, Georgieff MK. (2007) perinatal iron deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. *Hippocampus*.17:679–691.
14. Brod M., Schmitt E., Goodwing M., Hodkings P., Niebler G. (2012) ADHD burden of illness in older adults: a life course perspective. *Qual. Life. Res.* 21:795-9.
15. Bonaglia, M. C., Marelli, S., Novara, F., Commodaro, S., Borgatti, R., Minardo, G., et al., (2010). Genotype-phenotype relationship in three cases with overlapping 19p13.12 microdeletions. *European Journal of Human Genetics*, 18: 1302–9.
16. Conrad M.E., Umbreit J.N., (2000) Iron absorption and transport- An update. *American Journal of Hematology*. 64.287-298.
17. Conrad, M. E., Umbreit, J. N., Moore, E. G., Hainsworth, L. N., Porubcin, M., Simovich, M. J., et al., (2000). Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(4), G767-G774.
18. Cortese, S., Azoulay, R., Castellanos, F. X., Chalard, F., Lecendreux, M., Chechin, D., et al., (2012). Brain iron levels in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot MRI study. *World Journal of Biological Psychiatry*, 13: 223-231.
19. Cortese, S., Konofal, E., Dalla Bernardina, B., Mouren, M. C., & Lecendreux, M. (2009). Sleep disturbances and serum ferritin levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *European child & adolescent psychiatry*, 18: 393-399.
20. Clardy SL, Wang X, Zhao W, Liu W, Chase GA, Beard JL, True Felt B, Connor JR (2006). Acute and chronic effects of developmental iron deficiency on mRNA expression patterns in the brain. *J Journal of Neural Transmission. Supplementa* .71:173–196.
21. Danckaerts, M., Sonuga-Barke, E. J. S., Banaschewski, T., Buitelaar, J., Döpfner, M., Hollis, C., et al., (2010). The quality of life of children with attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 19: 83–105.
22. der Voet M., Harich B., Franke B., Schenck A., (2015) ADHD-associated dopamine transporter, latrophilin and neurofibromin share a dopamine-related locomotor signature in *Drosophila*. *Molecular Psychiatry*. 1-9.
23. Elia J., Devoto M. (2007) ADHD genetics: 2007 update. *Current Psychiatry Reports*. 9:434-9.

24. Erikson K.M., Jones B., Beard J.L. (2000) Iron deficiency alters Dopamine transporter functioning in rat striatum. *Journal of Nutrition*.130: 2831 – 7.
25. Erikson K.M., Jones B.C., Hess E.J. et al., (2001) Iron deficiency decreases dopamine receptors D1 and D2 in rat brain. *Pharmacology, Physiology and Behavior*.69:409-418.
26. Faraone, S. V, Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., & Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 57: 1313–23.
27. Fleming M.D., Trenor C.C., Su M.A., et al., (1997) Mycroctic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics*. 16:383-6.
28. Fleming M.D., Trenor C.C., Su M.A., et al., (1998) Nramp 2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Procedures of the National Academy of Sciences USA*. 95:1148-53.
29. Giagtzoglou, N. (2009). Cell adhesion, the backbone of the synapse: “vertebrate” and “invertebrate” perspectives. *Harbor Perspectives*, 1–25. recuperado desde <http://cshperspectives.cshlp.org/content/1/4/a003079.short>
30. Geisler J., Lesch K.P. (2011) A life-time of attention-defficit/hyperactivity disorder: diagnostic challenges, treatment and neurobiological mechanisms. *Expert Review of Neurotherapeutics*. (10):1467-84.
31. Gizer I.R., Ficks C., Waldman I.D. (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Human Genetics*. 126:51-90.
32. Gunshin H., Fujiyara Y., Custodio A., et al., (2005) SIC11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *Journal of Clinical investigation*. 115: 1258-1266.
33. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.v., et al., (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Letters to Nature*. 388, 482-488.
34. Haimes, J., Kelley, M. (2010). Demonstration of a $\Delta\Delta Cq$ calculation method to compute relative gene expression from qPCR data. Thermo Fisher Scientific Tech Note. Disponible en línea desde : <http://dharmacon.gelifesciences.com/uploadedfiles/resources/delta-cq-solaris-technote.pdf>
35. Hassan J., Iyengar B., Scantlebury N., et al., (2005) Photic input pathways that mediate the *Drosophila* Larval response to light and circadian rhythmicity are developmentally related but functionally distinc. *The Journal of Comparative Neurology*. 481:226-275.

36. Illing QA., Shawki A., Cunningham C., Mackenzie B., (2012) Substrate profile and metal ion selectivity of human divalent metal-ion transporter 1 . *Journal of Biological Chemistry* 287: 30485–30496.
37. Jellen L.C., Lu L., Wang X., Unger E.L., Earley C.J., Allen R.P., Williams R.W., Jones B.C.,(2013) Iron deficiency alters expression of dopamine related genes in the ventral midbrain in mice. *Neuroscience*. 12:13-23.
38. Kenzelmann, D., Chiquet-Ehrismann, R., Leachman, N. T., & Tucker, R. P. (2008). Teneurin-1 is expressed in interconnected regions of the developing brain and is processed in vivo. *BMC developmental biology*, 8:30.
39. Kerppola, T. K. (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chemical Society Reviews*, 38:2876-2886.
40. Konofal, E., Lecendreux, M., Arnulf, I., & Mouren, M. C. (2004). Iron deficiency in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 158:1113-1115.
41. Kooij, S. J. J., Bejerot, S., Blackwell, A., Caci, H., Casas-Brugué, M., Carpentier, P. J., et al., (2010). European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry*, 10, 67. doi:10.1186/1471-244X-10-67.
42. Kume K., Kume S., Park S.K., ET AL., (2005) Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *Journal of Neuroscience*. 25: 7377-7384.
43. Lozoff B., (2011) Early iron deficiency has brain and behavior effects consistent with dopaminergic dysfunction. *The Journal of nutrition*.141: 740S-746S.
44. Leamey, C. a, Merlin, S., Lattouf, P., Sawatari, A., Zhou, X., Demel, N.,et al., (2007). Ten_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. *PLoS Biology*, 5(9), e241.
45. Lesch, K. P., Timmesfeld, N., Renner, T. J., Halperin, R., Röser, C., Nguyen, T. T., et al., (2008). Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *Journal of neural transmission*, 115: 1573-1585.
46. Lionel A.C., Crosibe J., Barbosa N., Goodale T., Thiruvahindra-puram B., Ricckaby J., Gazzellone M., Carson E.R., Howe J.L., Wang Z., et al., (2011) Rare copy number variation

- discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Science Translational Medicine*. 3,95ra75.
47. Lozoff B., Beard J., Connor J., Felt B., Georgieff M., Schallert T., (2006) Long-lasting Neural and Behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutrition Reviews*. 64:S34–S91.
 48. Mackenzie, B., Takanaga, H., Hubert, N., Rolfs, A., & Hediger, M. (2007). Functional properties of multiple isoforms of human Divalent Metal-ion Transporter 1 (DMT1). *The Biochemical Journal*, 403, 59-69.
 49. Mandilaras K., Pathmanathan T., Missirlis F., (2013) Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients*. 5, 1622-1647.
 50. Meza-Aguilar, D.G. Y Boucard A.A., (2014) Latrophilins Updated. *Biomolecular concepts*. 5:457-478.
 51. Mosca T. (2015) On the Teneurin track: a new synaptic organization molecule emerges. *Frontiers in cellular neuroscience*. 9:1-14.
 52. Mosca, T. J., Hong, W., Dani, V. S., Favaloro, V., Luo, L. (2012). Trans-synaptic Teneurin signalling in neuromuscular synapse organization and target choice. *Nature*, 484: 237–41.
 53. O’Sullivan, M. L., de Wit, J., Savas, J. N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J. R., & Ghosh, A. (2012). FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development. *Neuron*, 73: 903–10.
 54. Oohashi, T., Zhou, X. H., Feng, K., Richter, B., Mörgelin, M., Perez, M. T., et al., (1999). Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *The Journal of Cell Biology*, 145:563–77.
 55. Orgad S., Nelson H., Segal D., Nelson H., (1998) Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *Malvolio*. *Journal of Experimental Biology*. 201:115-120.
 56. Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E., (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*. 11: 1114-25.
 57. Ribases M., Ramos-Quiroga J.A., Sanchez-Mora C., Bosch R., Richarte V., Palomar G., Gastaminza X., Biesa A., Arcos-Burgos M., Muenke M., et al., (2011) Contribution of LPHN3 to the genetic susceptibility to ADHD in adulthood: a replication study. *Genes Brain Behav*. 10:149-157.

58. Rosenthal, L., & Meldolesi, J. (1989). α -Latrotoxin and related toxins. *Pharmacology & therapeutics*, 42:115-134.
59. Russel V.A., (2011) Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Current Protocols of Neuroscience*. Jan; Chapter 9: Unit9.35. doi: 10.1002/0471142301.ns0935s54.
60. Sambrook J., y Russell D., (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Third edition. Vol. 1. CSHL press.
61. Scholz N., Gehring J., Guan C., et al., (2015) The adhesion GPCR Latrophilin/CIRL shapes mechanosensation. *Cell Reports*. 11: 1-9.
62. Schonwald, A., & Lechner, E. (2006). Attention deficit/hyperactivity disorder: complexities and controversies. *SheCurrent Opinion in Pediatrics*, 18: 189–95.
63. Sehadova H., Glaser F.T., Gentile C., Simoni A., Giesecke A., Albert J.T., Stanewsky R. (2009) Temperature entrainment of *Drosophila*'s Circadian Clock involves the gene nocte and signalling from Pheripheral Sensory Tissues to Brain. *Neuron*. 64, 251–266.
64. Shang Y., Haynes P., Pirez N., et al., (2011) Imaging analysis of clock neurons reveals light sol. amortiguadoras the wake-promoting effects of dopamine. *Nature Neuroscience*. 14:889-895.
65. Shapiro L, Love J, Colman DR. Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annual Reviews Neuroscience*. 2007; 30:451-74.
66. Silva, J.-P., Lelianova, V. G., Ermolyuk, Y. S., Vysokov, N., Hitchen, P. G., Berninghausen, O., et al., (2011). Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:12113–8.
67. Spencer, T. J. (2006). ADHD and comorbidity in childhood. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 67 Suppl 8, 27–31.
68. Stergiakouli, E., Hamshere, M., Holmans, P., Langley, K., Zaharieva, I., Hawi, Z., et al., (2012). Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *American Journal of Psychiatry*, 169:186-194.
69. Sugita, S. (1998). Alpha -Latrotoxin Receptor CIRL/Latrophilin 1 (CL1) Defines an Unusual Family of Ubiquitous G-protein-linked Receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 32715–32724.

70. Tang, X., Zhou, B., (2013) Ferritin is the Key to iron absorption and tissue iron detoxification in *Drosophila Melanogaster*. *The FASEB Journal*.27: 288-298.
71. Unger, E. L., Wiesinger, J. A., Hao, L., & Beard, J. L. (2008). Dopamine D2 receptor expression is altered by changes in cellular iron levels in PC12 cells and rat brain tissue. *The Journal of nutrition*, 138:2487-2494.
72. van Swideren B., Brembs B. (2010) Attention-like deficit and hyperactivity in a *Drosophila* memory mutant. *Journal of Neuroscience*. 30: 1003-1014.
73. Wallis D., Hill d.s., Mendez I.A., Abbott L.C., Finnell R.H., Wwillman P.J., Stelow B., (2012) Initial characterization of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Brain Research*. 1464,85-92.
74. Wang L, Rotzinger S, Al Chawaf A, et al. Teneurin proteins possess a carboxy terminal sequence with neuromodulatory activity. *Molecular Brain Research*. 2005; 133: 253-65.
75. White K.E., Humphrey D.M., Hirt F. (2010) The Dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Frontiers in Neuroscience*. 4:2005.
76. Wiesinger J.A., Buwen J.P., Cifelli J.C., et al., (2007) Down-regulation of Dopamine transporter by iron chelation in vitro is mediated by altered trafficking, not synthesis. *Journal of Neurochemistry*. 100: 167-179.
77. Williams N.M., Zaharieva I., Martin A., Langley K., Mantripragada K., Fosssdal R., et al., (2010) Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *The Lancet*, 376:1401-1408.
78. Yack J., (2004) The structure and function of auditory chordotonal organ in insects. *Microscopy Research and Technique*. 63:315-337.
79. Yodium m., (2008) Brain iron deficiency and excess: cognitive impairment and neurodegeneration with involvement of striatum and hippocampus. *Neurotoxicity Research*. 14: 45-56.

Apéndice. Evaluación inicial de la salud general de las mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Caja problema rectangular para evaluación de salud de *Drosophila*

En cada ensayo se dispusieron 3 viales con alimento estándar en el 5° compartimento de una caja problema (*Fig.1.1*). La prueba consistió en colocar un grupo de 40 moscas (controlando por edad [3-4días], dieta [estándar] temperatura [21°C], hora del día e iluminación de la habitación [completa oscuridad]) en el 1° compartimento de modo que estaban libres para moverse a través de la caja problema permitiéndoles la búsqueda de alimento. Se cuantificó el número total de moscas que alcanzaron el compartimiento meta [comida] después de 12 horas de experimentación. Se graficaron los datos para cada una de las cepas probadas y se hizo el análisis estadístico correspondiente.

Los resultados se muestran en Fig. 1

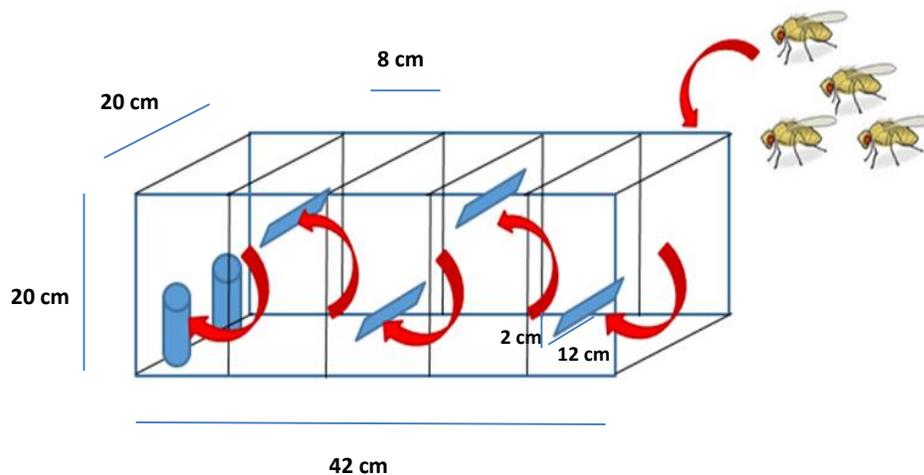


Fig. 1.1 Esquema de laberinto para evaluación conductual. Se muestran las dimensiones de la caja problema y sus compartimentos. Se aprecia la posición alternada de las ventanas que comunican los distintos compartimentos (Trapecios azules) y la posición de los viales de alimento (cilindros) en el compartimento 5. En flechas rojas se indica la dirección de avance de las moscas al resolver la prueba. Los compartimentos se enumeran de derecha a izquierda como 1-5.

Las mutantes en *Lphn*, *Ten-m* y *Mvl* tienen sistemas sensoriales íntegros y son capaces de desplegar conducta motora.

Se muestra en Fig. 1.2 el resultado de 3 grupos experimentales por cada cepa en una caja problema diseñada para probar la capacidad gruesa de las moscas para detectar una fuente de alimento y desplegar conducta motora. En cada ensayo se probó a 40 moscas macho controlando por edad (3-4 días de nacidas), dieta (estándar), temperatura (21°C) e iluminación (obscuridad). Se evaluaron conductas básicas de la especie (escalamiento, búsqueda de una fuente de alimento, percepción olfativa, percepción gustativa). Los resultados no arrojaron diferencias significativas en el número de moscas que alcanzaron y permanecieron en el compartimiento meta al término de la sesión experimental.

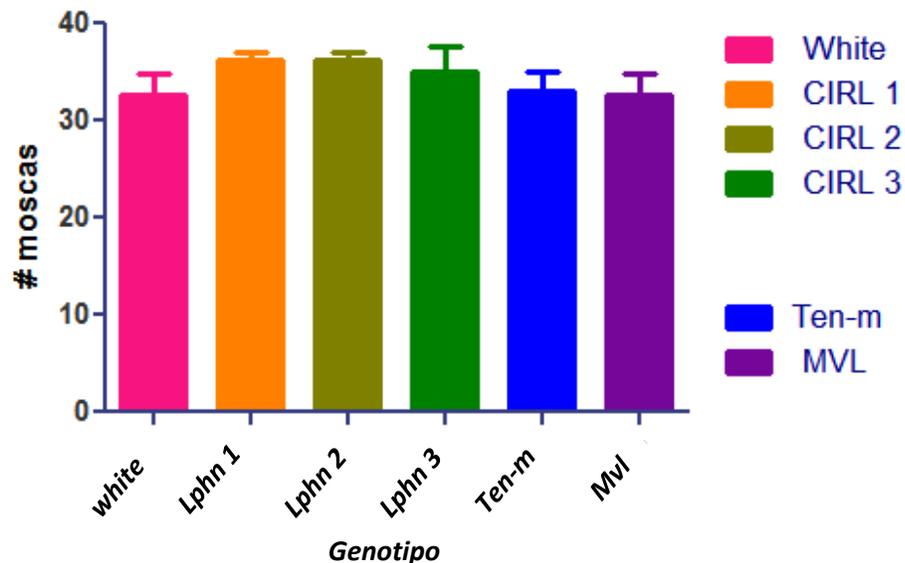


Fig. 1.2 Ejecución en caja problema. El gráfico representa el número total de moscas que alcanzaron el compartimiento meta en función del genotipo de los diferentes grupos evaluados. Todos los grupos ejecutaron la prueba de forma homogénea no significativamente distinto del control (white) [$F=$] $P>0.05$; aunque se aprecia que las cepas mutantes de *Lphn* tuvieron una media de ejecución ligeramente más alta que *Ten-m*, *Mvl* y *White*.