



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACIÓN CELULAR, FISIOLÓGICA Y
MOLECULAR DE UNA RED NEURONAL DISCRETA
INVOLUCRADA EN LA FORMACIÓN DE PATA Y ALA
EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A
LIBB. CRISTINA MARTINEZ GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA



2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

<i>Introducción:</i>	3
<u>Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>:</u>	4
<u>Desarrollo del sistema nervioso:</u>	4
<u>Desarrollo de la musculatura:</u>	7
<u>Discos imagales:</u>	8
<u>Desarrollo del ala:</u>	8
<u>Desarrollo de la pata:</u>	9
<u>Adulto:</u>	10
<i>Antecedentes:</i>	12
<i>Hipótesis:</i>	15
<i>Objetivos:</i>	15
<i>Estrategia experimental:</i>	16
<u>Sistema UAS-GAL4:</u>	16
<u>Enhancer Trap:</u>	16
<u>Toxina de tétanos:</u>	17
<u>GFP:</u>	18
<u>GAL80:</u>	18
<u>PCR reverso:</u>	18
<i>Resultados:</i>	20
<u>Caracterización fenotípica de la inserción 3A42:</u>	20
<u>Letalidad:</u>	22
<u>Ensayos de fertilidad:</u>	24
<i>GFP</i>	25
<u>Caracterización de la red neuronal en el SNC:</u>	25
<u>Caracterización de la red neuronal en la larva:</u>	27
<u>Tinción de Faloidina Rodaminada:</u>	28
<u>Discos Imagales:</u>	30
<u>Expresión de GFP en la Pupa:</u>	31
<u>Caracterización de la red neuronal en el adulto:</u>	31
<u>Expresión de GFP en la pata:</u>	33
<u>Expresión de GFP en el ala:</u>	34
<u>Caracterización neuro-química de la red neuronal en la línea 3A42:</u>	35
<u>Bursicon:</u>	35
<u>Mapa genético:</u>	35
<u>Inmunohistoquímica:</u>	36
<u>Actividad de la red neuronal en el desarrollo (GAL80):</u>	38
<u>Resultados GAL80:</u>	39
<i>Discusión:</i>	44
<i>Conclusiones:</i>	48
<i>Materiales y Métodos:</i>	50
<i>Referencias:</i>	53

Introducción:

¿Como funciona el sistema nervioso?

El cerebro es capaz de realizar funciones complejas debido a la intrincada red de interacciones entre sus componentes. La visión actual asume que el cerebro es un sistema dinámico, compuesto de muchas redes neuronales interconectadas, con una cierta capacidad de modificar estas conexiones dependiendo del medio ambiente y las necesidades del organismo.

Algunas de las funciones que lleva a cabo el sistema nervioso involucran síntesis de proteínas específicas en una ventana espacio temporal definida, en grupos de neuronas funcionalmente relacionadas, como por ejemplo, la memoria a largo plazo en *Aplysia* y el comportamiento sexual en los machos de *Drosophila* (Bailey CH, Kandel ER, Si K. 2004, Manolli et al., 2005).

En el desarrollo del sistema nervioso, miles de neuronas funcionan como unidades independientes, que van adquiriendo conexiones sinápticas formando redes, las cuales se modifican a lo largo del tiempo. En el concepto de red incluimos a grupos de neuronas no conectadas entre sí, pero que comparten la expresión de un enhancer determinado durante el desarrollo. Para entender un poco mas acerca de como funciona el sistema nervioso es necesario comprender las propiedades de estas redes, ¿cómo se forman sus conexiones?, ¿qué determina a los componentes involucrados? y ¿como se comportan a lo largo del tiempo? (Hua JY *et al.*, 2004).

Nosotros estamos interesados en buscar las reglas de construcción de redes neuronales y como afectan el comportamiento y el desarrollo en la mosca *Drosophila melanogaster*.

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, cuenta con aproximadamente doscientas mil neuronas. Este sistema nervioso, relativamente pequeño entre los insectos de vida libre le permite tener conductas complejas como la orientación en el vuelo, el aprendizaje y el cortejo y a su vez, es un modelo sencillo de estudio en comparación con mamíferos y otros organismos superiores. *Drosophila* nos permite utilizar una gran cantidad de herramientas genéticas, moleculares y celulares para su estudio.

La mosca de la fruta fue uno de los primeros modelos de estudio del desarrollo del sistema nervioso y guiamiento axonal (Seeger, M. *et al.*, 1993), ya que es ideal para estudios de genética (Klambt and Goodman., 1991), se puede marcar cada uno de sus 4 cromosomas y mantener líneas con “balancers” (cromosomas que no recombinan, lo que nos permite mantener una mutación o transgen estable y a la vez seleccionarla mediante un marcador asociado a un fenotipo), y existen disponibles miles de líneas con mutaciones, inserciones, deleciones y genes reporteros. Su genoma está secuenciado en su totalidad y existe una gran variedad de técnicas diseñadas y estandarizadas que permiten resolver muchas preguntas. Se ha descrito con gran detalle su ciclo de vida y la organización anatómica básica de su sistema nervioso, a lo largo de sus diferentes estadios de vida (Demerec, 1946. Hertweck, 1931. Taylor, 1992).

Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*:

El ciclo de vida de *D. melanogaster* desde el huevo hasta la eclosión del individuo adulto es de 10 días a 25°C, después de esto emerge como un adulto totalmente desarrollado y vive en promedio 60 días. La embriogénesis comienza con 13 rápidas divisiones sincrónicas del núcleo ya fecundado, y posterior a esto sucede la celularización. A partir de este momento se le conoce como blastodermo celular.

El desarrollo del blastodermo celular se divide en 17 estadios, a largo de los cuales se llevan a cabo cambios morfológicos importantes como la gastrulación (estadio 6-8), cuando se forman las tres capas celulares mesodermo, endodermo y ectodermo, que dan origen a los diferentes linajes celulares. El proceso de embriogénesis completo toma alrededor de 24 horas en completarse; después la mosca pasa por tres estadios larvarios y de dos mudas. La primera muda ocurre a las 25 horas, la segunda a las 48 horas, y la tercera a las 72 horas. Después le sigue una etapa corta de prepupa y posteriormente la formación del pupario alrededor del cuarto día. La pupa se desarrolla durante 5 días y eclosiona como un adulto completamente desarrollado alrededor del décimo día (Bate and Martínez, 1993).

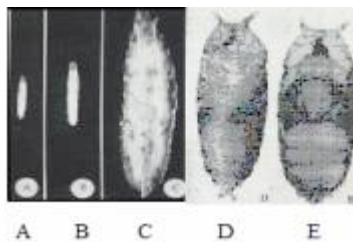


Figura 1.- Estadios larvarios y pupales de *D. melanogaster*. A-Primer instar. B- Segundo instar. C-Tercer instar. D-Prepupa. E-Pupa (Modificado de Demerec, 1946).

Desarrollo del sistema nervioso:

El sistema nervioso central (SNC) de la mosca se empieza a desarrollar durante las primeras 24 horas de la embriogénesis. En las etapas más tempranas (estadios 5-7) las células de la parte polar y la parte media ventral del blastodermo se invaginan. Con este movimiento se generan tres capas celulares: las células que permanecen en la forma el ectodermo, y las que se invaginan forman el endodermo y el mesodermo. La región ventral media del ectodermo se convierte en el neuroepitelio formado de una lámina uniforme de células ectodermales.

Durante la gastrulación (estadio 8) el ectodermo, mediante una delaminación, da origen a precursores neurales llamados neuroblastos (NB). Después de la gastrulación, estos NB migran y comienzan a dividirse. Cada uno de ellos, a través de 70 divisiones asimétricas en promedio, genera un linaje propio (Doe, 1985. Doe., 1992; Broadus *et al.*, 1995, Bossing, 1996). Se puede saber de que linaje embrional o neuroblasto provino una neurona adulta, debido a que mantienen una posición física en el cerebro de la larva. Se han hecho mapas de cada segmento del ganglio torácico abdominal, con el número y posición exacta de algunos NBs y todas las células que se originaron a partir de éstos (Bossing., 1996, Schmidt., 1997).

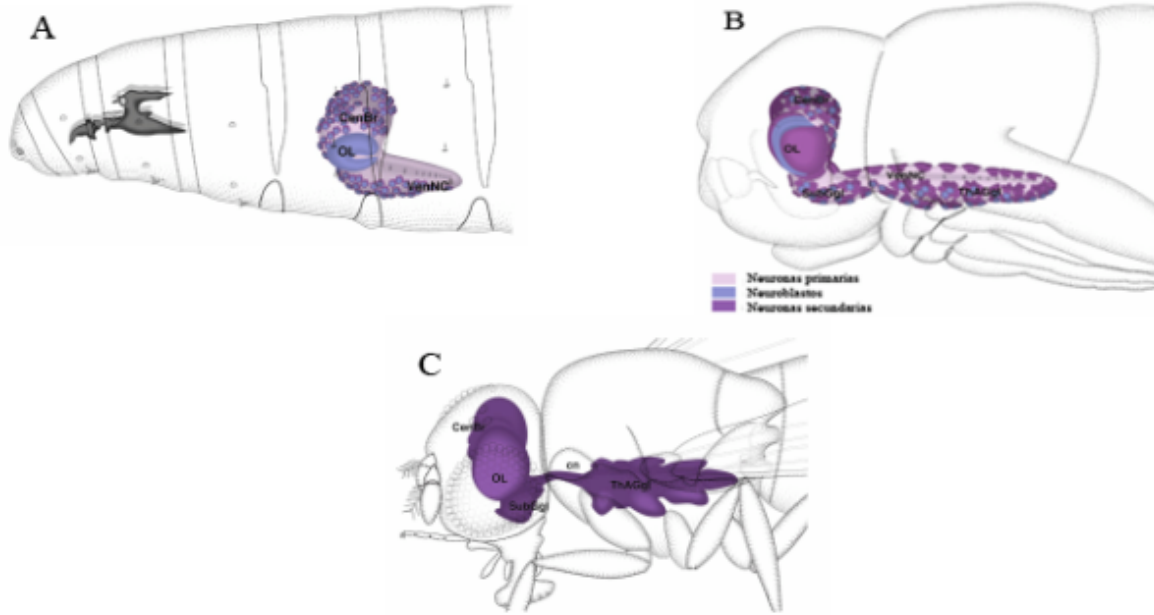


Figura 3.- Localización del sistema nervioso central en el desarrollo de *D. melanogaster*. A.- Larva de tercer Instar. B.-Pupa. C.-Adulto, neuronas primarias (rosa), neuroblastos (azul) neuronas secundarias (morado) (Modificada de Hartenstein, 1993).

El cerebro de la larva consta de dos hemisferios y un ganglio ventral compuesto. Los dos hemisferios están conectados entre si en la parte ventral. Toda la estructura de la cabeza está conectada a través del ganglio subesofágico con el ganglio ventral compuesto (ganglio torácico-abdominal (GTA) El GTA está compuesto por tres pares de segmentos del ganglio torácico y ocho pares del ganglio abdominal. La región más anterior del ganglio ventral inerva a los músculos maxilares, los músculos de la cabeza y órganos sensores de esta región. Del primer y segundo ganglio torácico surgen los nervios del primer y segundo par de patas, del primer y segundo segmento torácico y de los órganos sensores de éste. El tercer ganglio inerva directamente al tercer segmento torácico y de forma indirecta está comunicado con el tercer par de patas (Demerec, M. 1950) (Fig. 4).

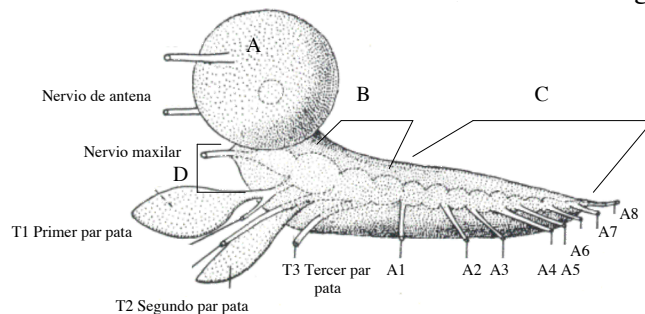


Figura 4.- Cerebro de larva de tercer instar vista lateral A.-lóbulo óptico. B.-Ganglios torácicos T1-3. C.-Ganglios abdominales 1-8. D.- Ganglio Subesofágico. (Modificado de Demerec, 1946).

En la larva, la proliferación neuronal es completada poco antes de convertirse en pupa y la metamorfosis es el momento en el desarrollo para la maduración y/o remodelación de las nuevas neuronas adulto-específicas (Truman., 1988. Fig. 5).

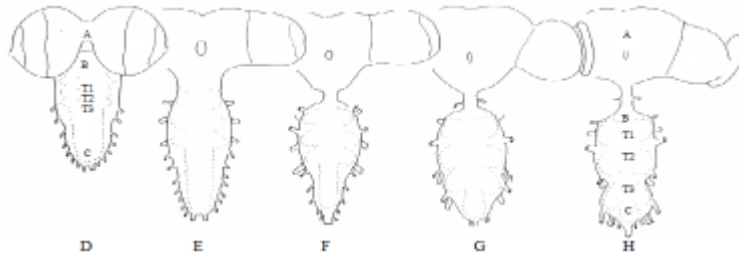


Figura 5.- Estructura y cambios del SNC de *Drosophila* durante la metamorfosis. A-cerebro. B-neurómeros torácicos 1-3. C-neurómeros abdominales D-cerebro de larva tercer instar. E- cerebro de mosca de 12 horas después de pupar. F- 24 horas después. G-48 horas después. H-cerebro de adulto (Modificada de Truman, 1990)

Desarrollo de la musculatura:

Durante el desarrollo de la larva, la musculatura adulta deriva del mesodermo embrionario; en el abdomen, los primordios están representados por pequeños grupos de células que se asocian a los nervios periféricos de la larva. En la cabeza y el tórax, los precursores de la musculatura adulta forman grandes grupos de células pegadas a los discos imagales, por lo que se les llaman células adepteliales y estas proliferan durante el periodo larvario (Bate and Martínez, 1993).

Durante la pupación, la gran mayoría de los músculos de la larva degeneran, y los precursores de los músculos del adulto establecen el nuevo patrón muscular. Los músculos del tórax larvario degeneran durante el estadio de pre-pupa, los músculos abdominales persisten a la pupación y participan activamente en la metamorfosis y algunos de ellos sobreviven hasta etapas adultas tempranas (Bate *et al.*, 1990, Fernández *et al.*, 1991).

Durante el estadio de pre-pupa, los mioblastos del abdomen están agrupados a lo largo de los nervios larvales. En las siguientes 10-20 horas, estos mioblastos se fusionan y forman arreglos en forma de fibras paralelas al eje antero-posterior (músculo tergal longitudinal) o dorso-ventral (músculo abdominal tergosternal). Después de que la epidermis abdominal se forma, estas fibras se insertan en los apodemas (sitios de adhesión de los músculos dentro de la epidermis) recién formados. En el tórax, los tres pares de músculos dorsales longitudinales de la larva están involucrados en la formación de los músculos longitudinales indirectos del vuelo (Fernández *et al.*, 1991).

Las células adepteliales de los discos imagales del ala, migran hacia el notum y se concentran alrededor de las fibras musculares dorsales de larva, las cuales sirven como andamio para dirigir el patrón de los mioblastos en el adulto. Otros músculos, como los de la pata y los músculos indirectos del vuelo se desarrollan sin estos andamios formados por las fibras larvarias (Hartenstein, 1993) (Fig. 6).

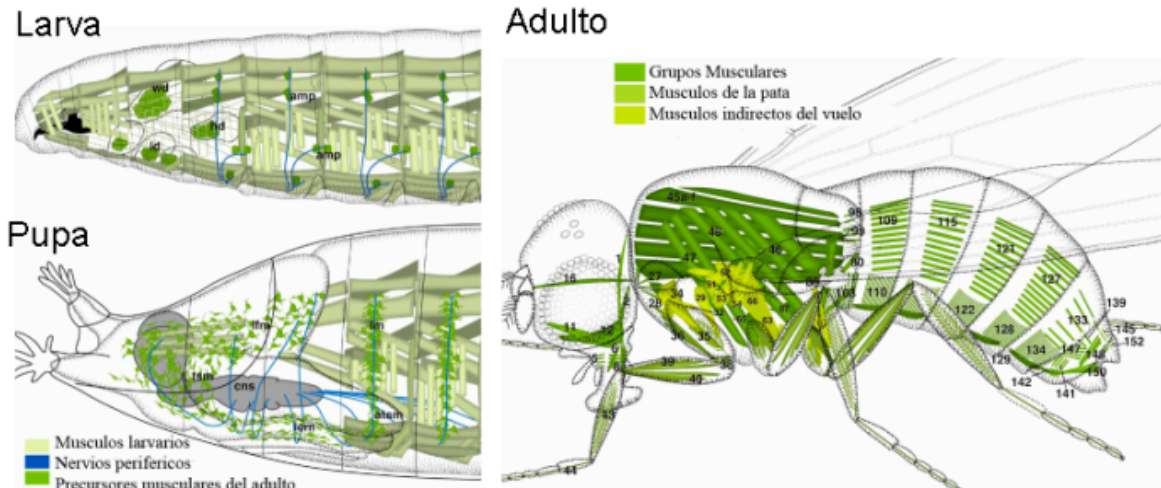


Figura 6.- Musculatura de larva de tercer instar y pupa: músculos larvarios (amarillo), nervios periféricos (azul), precusores musculares del adulto (verde); y musculatura de la mosca adulta: grupos musculares (verde fuerte) músculos de la pata (verde olivo), músculos indirectos del vuelo (verde claro) (Hartenstein, 1993).

Discos imaginales:

Existen estructuras tempranas que van a dar origen a tejidos en el adulto llamados discos imaginales en la larva. Están formados por monocapas de células epidermales que dan origen a las estructuras de las antenas, el ojo, las patas, las alas, el alterio y la genitalia. Su patrón de formación es organizado por gradientes de morfógenos, lo que permite que diferentes regiones adquieran identidades particulares mientras el disco aumenta de tamaño (Fig. 7).

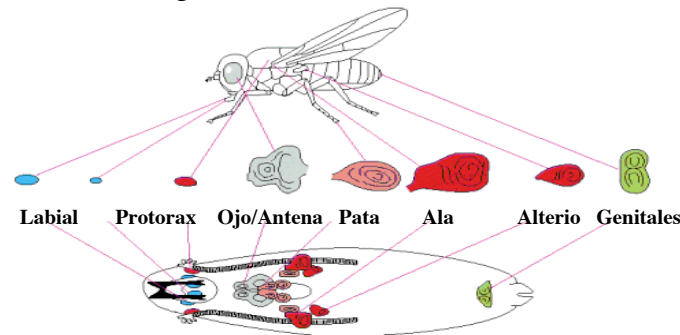


Figura 7.- Los discos imaginales en la larva de *Drosophila* y las estructuras que generan en la mosca adulta. (Alberts, B. *et al.*, 2002).

Posteriormente en la pupa, el desarrollo de los discos imaginales torácicos se divide en tres procesos: elongación y definición de los apéndices, eversión de los apéndices y extensión y fusión del tejido periférico para formar la epidermis en el adulto (Milner *et al.*, 1984).

Desarrollo del ala:

El ala se desarrolla a partir de un pequeño grupo de células (15-20), las cuales invaginan del ectodermo embrionario. Estas células vienen de la parte posterior del segundo segmento torácico y de la parte anterior del tercero (Cohen, 1993). Las células proliferan durante los

estadios larvarios para generar un disco imagal (5000 células aproximadamente) en el tercer instar tardío (Cohen, 1996).

El disco imagal de ala es una lámina de monocapas de epitelio, que se divide muy temprano durante el desarrollo en dos poblaciones de células, la anterior y la posterior, por la acción de morfógenos (Brook, WJ. *et al.*, 1996). La formación del ala a partir del disco imagal es resultado de una serie de cambios locales en la forma del saco imagal, a diferencia de la pata que sufre cambios morfológicos generales. La superficie dorsal y ventral del ala se separan en la pupación cuando el disco imagal comienza a inflarse. Durante las 30 horas posteriores a la pupación la bicapa se restablece y las dos superficies se separan nuevamente a las 60 horas cuando la cutícula se deposita.

Antes de la eclosión, las células degeneran y poco después de la eclosión, el ala se desdobra para formar una bicapa de cutícula que es en si el ala adulta. (Jonson and Milner 1987). Para el mantenimiento de la bicapa en el ala se requieren integrinas, que son glicoproteínas transmembranales altamente conservadas. Las conexiones entre las dos superficies del ala son morfológicamente similares a los sitios de adhesión entre los músculos y las células epidermales (Lai-Fook 1967; Poostledwait and Schneiderman 1970).

Las células del disco imagal de ala sufren un proceso de diferenciación y dan lugar a las células epidermales adultas y a los órganos sensoriales. De aproximadamente 5000 células del disco imagal en una larva de tercer instar cerca de 500 serán de tipo sensorial (Romani *et al.*, 1989), incluyendo bristles o pelos sensores (macro y microquetas) y los campanilla sensila.

El ala de la mosca adulta tiene 5 venas que la atraviesan longitudinalmente (L1-L5) y dos transversalmente, una anterior y otra posterior. Las venas L2 y L4 se localizan en la superficie ventral y L3 y L5 en la parte dorsal. Su posición final se observa entre las 3-4 horas después de la pupación y los axones que inervan a los pelos del ala terminan su crecimiento durante este periodo (Fig. 8).

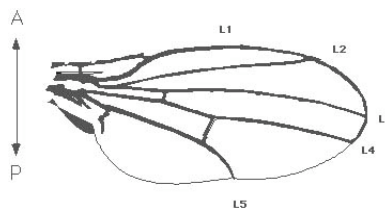


Figura 8.- Posición de las venas en el ala adulta L1-L5 (modificado de Brook *et al.*, 1996).

Desarrollo de la pata:

El disco imagal de pata se divide en cuatro regiones de acuerdo al proceso celular durante la morfogénesis. La región uno incluye los segmentos del tarso del 2-5, la región dos está formada por el primer segmento del tarso y la tibia distal, la región tres está compuesta por la tibia proximal y el fémur distal, y la región cuatro está formada por el fémur proximal, la coxa y el trochante.

La pata es un apéndice cilíndrico dividido en segmentos por uniones flexibles, cada pata tiene 9 segmentos. En la pre-pupa el disco imagal se dobla en su parte más apical y se depositan las primeras capas de la cutícula. La inflación de la pata es causada por la presión hidrostática que ejercen las contracciones abdominales durante la eversión de la cabeza.

El mecanismo por el cual la región tibia-femoral se separa en dos segmentos distintos entre las 18 y las 36 horas antes de la pupación es la formación de invaginaciones laterales que avanzan hacia el centro por la línea media del cilindro. Esto crea un surco cada vez más profundo, hasta crear dos tubos epiteliales separados conectados por un solo punto similar a una articulación (Bate and Martínez, 1993). Las uniones y los segmentos tienen posiciones determinadas a lo largo de la extremidad y esta organización está dada por la expresión de genes específicos, los cuales dan identidad a cada estructura dentro de la pata. Estas moléculas dirigen y activan a otros morfógenos posteriores en el desarrollo, lo que le da a las células toda la información requerida para establecer la forma, la posición e inervación de los músculos y tendones en la pata (Soler, C. *et al.*, 2004) (Fig 9).

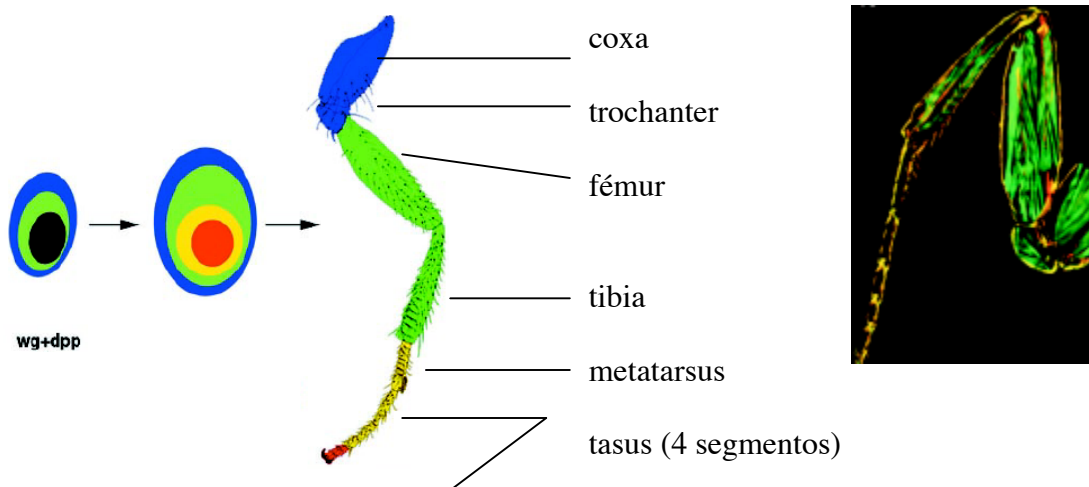


Figura 9.- Patrón de desarrollo del disco imagal de la pata y las regiones que dan origen a los diferentes segmentos en la pata totalmente desarrollada. Músculos de la pata en verde y tendones en rojo (Modificado de Galindo et al., 2002 y Soler, C. *et al.*, 2004).

Adulto:

La metamorfosis empieza al cuarto día, cuando la larva deja de alimentarse y sus movimientos cesan totalmente; extiende sus espiráculos y se transforma en un pupario inmóvil. Después de esto la cutícula se torna rígida para proteger a la pupa en su interior, mientras se diferencia a la etapa adulta; si durante éste proceso de pupación la mosca muere, se le conoce entonces como farato (Demerec., 1946).

Durante las últimas horas de la pupación, una cascada de hormonas es responsable de coordinar los eventos requeridos para que la mosca adulta pueda eclosionar. En los lepidópteros y dípteros, la hormona esteroide ecdisona (20-hidroxiecdisona) y cuatro péptidos: la hormona de eclosión (EH), la hormona que dispara la pre-ecdisis (PETH), la hormona que dispara la ecdisis (ETH) y el péptido cardioactivo de crustáceo (CCAP), regulan y coordinan de forma conjunta la ecdisis; y por otro lado un solo péptido, bursicon,

regula los eventos de post-ecdisis en el desarrollo (Baker *et al.*, 1999, Dewey *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2003, Ewer, J., 2005).

Durante la eclosión, la presión de la hemolinfa aumenta para la correcta expansión de las alas y por otro lado, el inicio de la pigmentación de la nueva cutícula; éste proceso es iniciado por la hormona bursicon (Luo *et al.*, 2005). Esta hormona es liberada a la hemolinfa por neuronas del ganglio torácico, que son reguladas a su vez por otras neuronas que estimulan su liberación de manera dependiente de PKA (Luan *et al.*, 2006). En la última parte de la metamorfosis el adulto emerge al décimo día, se expanden las alas, y la cutícula se vuelve dura y se oscurece (Fig. 10).

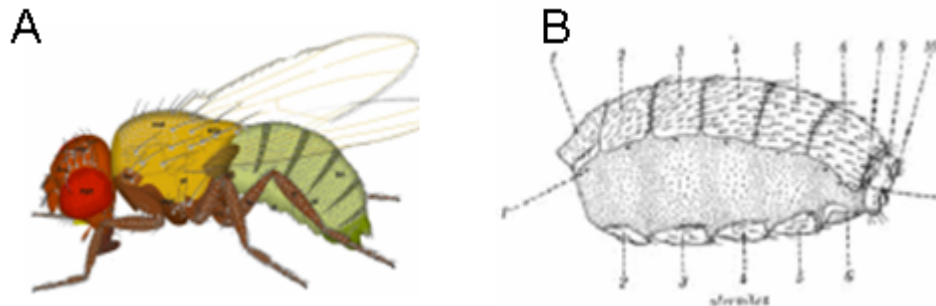


Figura 10.- A.-Mosca adulta. Ojos color rojo. Cabeza color naranja. Tórax color amarillo. Patas y alas color café. Abdomen color verde. B.-Abdomen vista lateral segmentos del 1 al 8 inervados por los correspondientes nervios del ganglio torácico abdominal segmentos 1-8 (Modificado de Demerec 1946 y Hartenstein, 1993).

En la mosca adulta la cabeza contiene a las estructuras de los ojos y las antenas, mientras que en el tórax se localizan los tres pares de patas, las alas y los genitales (Fig. 11).

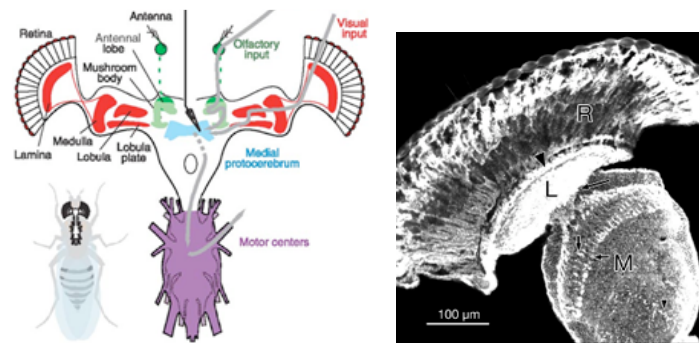


Figura 11.- A-Representación esquemática del cerebro de la mosca adulta con las estructuras que los conforman. Corte frontal de la cabeza. R-retina (fotorreceptores) L- lamina y M- medula de lóbulo óptico (modificado de Frye and Dickinson, 2003 y Borycz et al, 2005).

Para entender como la actividad del sistema nervioso regula las funciones de *Drosophila melanogaster* podemos usar diversas técnicas como “UAS-GAL4-Enhancer Trap” (O’Kane and Gehring. 1987, Brand and Perrimon, 1998) como una aproximación experimental.

Antecedentes:

Anteriormente en el laboratorio se construyó una colección de líneas con inserciones independientes de un elemento enhancer trap P-GAL4 de *D. melanogaster* (Rodríguez-Valentín *et al.*, 2006). En cada una de estas líneas, la inserción atrapó las secuencias regulatorias de un gen en particular. Estas moscas expresan GAL4 en un patrón definido por el contexto genómico en el que cayó la inserción del elemento P. Estas líneas se utilizaron para dirigir de manera específica la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLC) (*ver estrategia experimental pag. 19*). Ésta al expresarse en las neuronas las inactivó causando un fenotipo que nos interesó estudiar.

La línea 3A42 presentó un marcado defecto en la forma de la tibia y el fémur en el tercer par de patas y defectos en la extensión de las alas. Como parte de mi tesis de licenciatura identifiqué el sitio de inserción y el patrón de expresión en el sistema nervioso larvario de la línea 3A42 utilizando el gen reportero GFP de GAL4 (Fig.12).

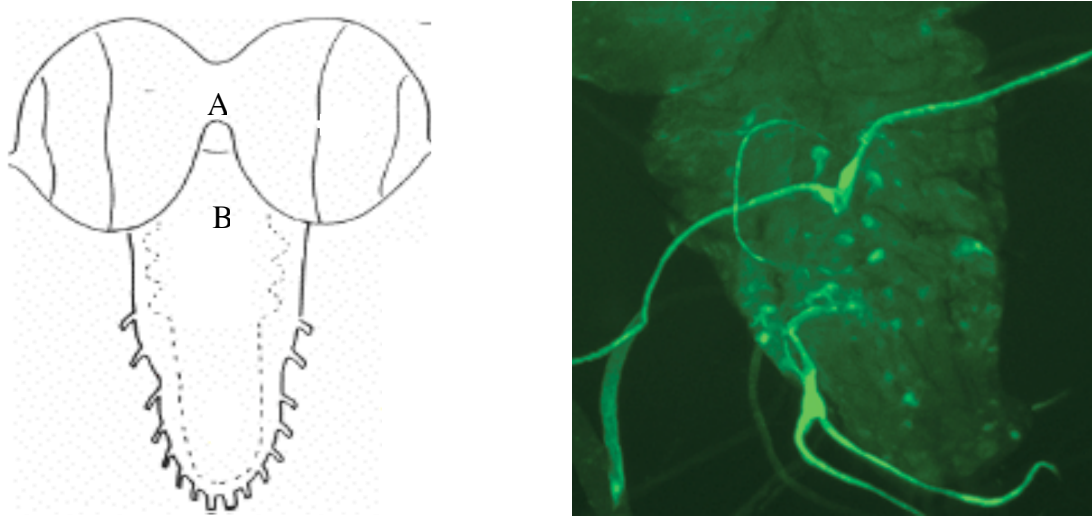


Figura 12.- Cerebro de larva mosca. A-Cerebro B-Ganglio Torácico Abdominal. C-Línea 3AA2/GFP en donde observamos 10 pares de neuronas verdes a lo largo del GTA y dos pares de nervios que salen del segundo y quinto par de neuronas.

Como antecedente del proyecto, busque el sitio de inserción del elemento P en la línea 3A42 mediante un PCR reverso, y usando un análisis tipo BLAST identifiqué al gen CG7922 como sitio de inserción del elemento P. Este gen codifica para una helicasa de RNA, lo cuál es inferido a nivel de homología de secuencia y no existe ninguna evidencia experimental acerca de su función.

Mediante un PCR reverso (*ver estrategia experimental pag. 23*) obtuve un producto de amplificación el cual mandé a secuenciar; hice un BLAST con la secuencia obtenida e identifiqué al gen CG7922 como el sitio de la inserción del elemento P-GAL4 (Fig.13).

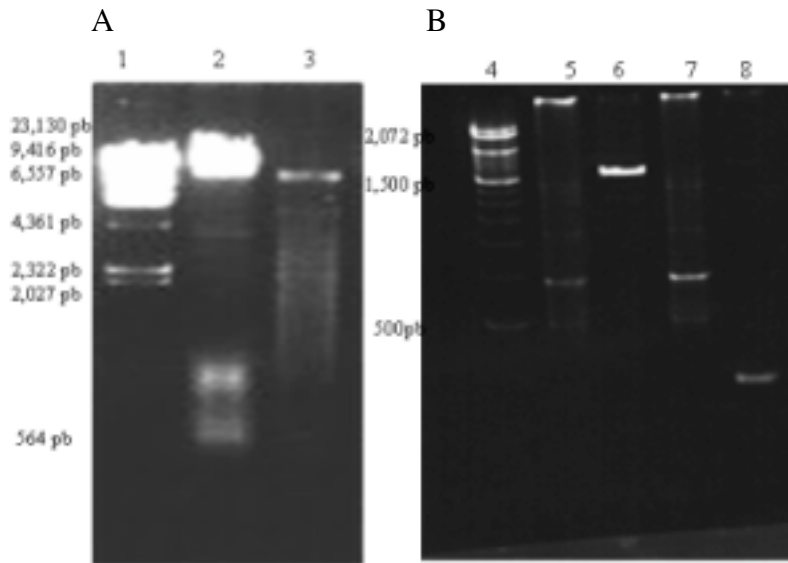


Figura 13.-A λ -Hind III (carril 1). DNA genómico de la línea 3A42 (carril 2). Digestión con la enzima de restricción MspI (carril 3). B.-Marcador de pesos moleculares 100 pb (carril 4). PCR usando como templado DNA de la línea 3A42 digerido con la enzima de restricción MspI con lo oligos Amp 5' (carril 5 y 6) y Amp 3' (carril 7 y 8) (gel de agarosa 1%, bromuro de etídio).

Para corroborar el sitio de la inserción diseñé oligos para amplificar 680 pb del gen CG7922 y probé dos templados diferentes: el de la línea homóciga para inserción 3A42/3A42, el cual no debería amplificar nada y el de la línea heteróciga 3A42/Tm2 el cual debería amplificar un fragmento de 680 pb, dado que solo uno de los alelos de este gen tiene insertado al elemento P (Fig. 14).

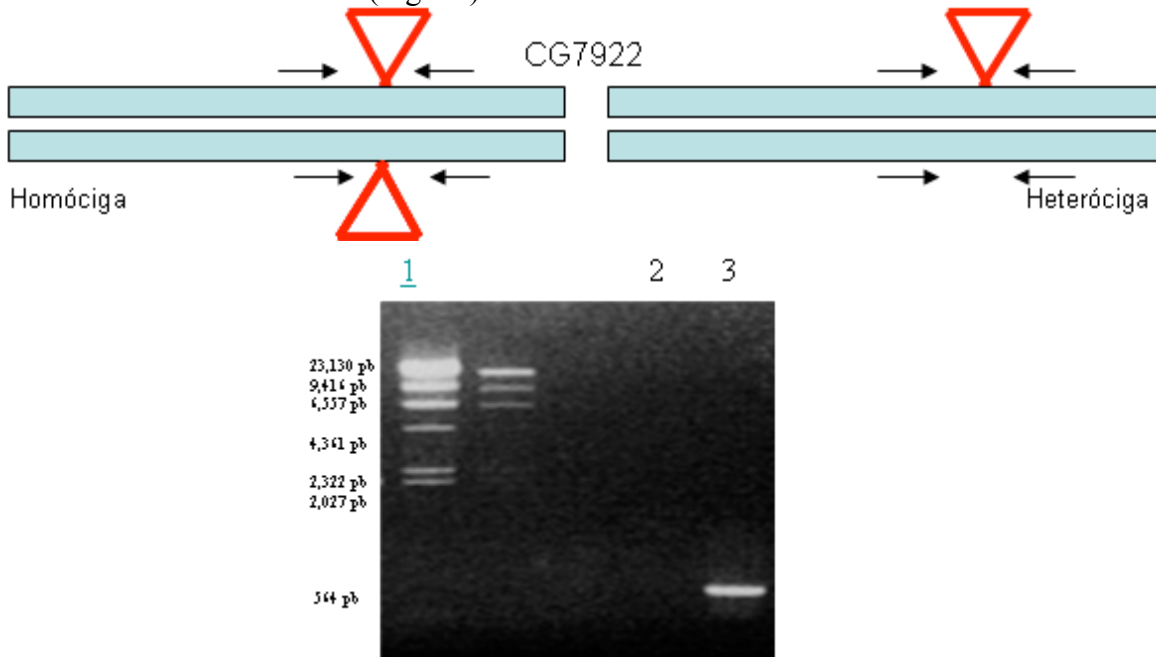


Figura 14.-Marcador 100 pb (carril 1). PCR usando DNA de moscas homócigas para la inserción 3A42/3A42 (carril 2). PCR usando DNA de moscas 3A42/Tm2 con oligos 3A Fw y 3A Rv. Estos oligos amplifican un producto de 680 pb del gen CG7922 (carril 3) en la línea heteróciga para la inserción. (gel de agarosa 1%, bromuro de etídio).

Solo se amplificó un producto de PCR de 680 pb aproximadamente cuando usamos como templado DNA de la línea homóciga para la inserción.

Otra aproximación para confirmar este dato fue hacer un PCR usando un oligo que alineara dentro de la secuencia del elemento P y otro que alineara en la secuencia gen CG7922 (Fig. 15).

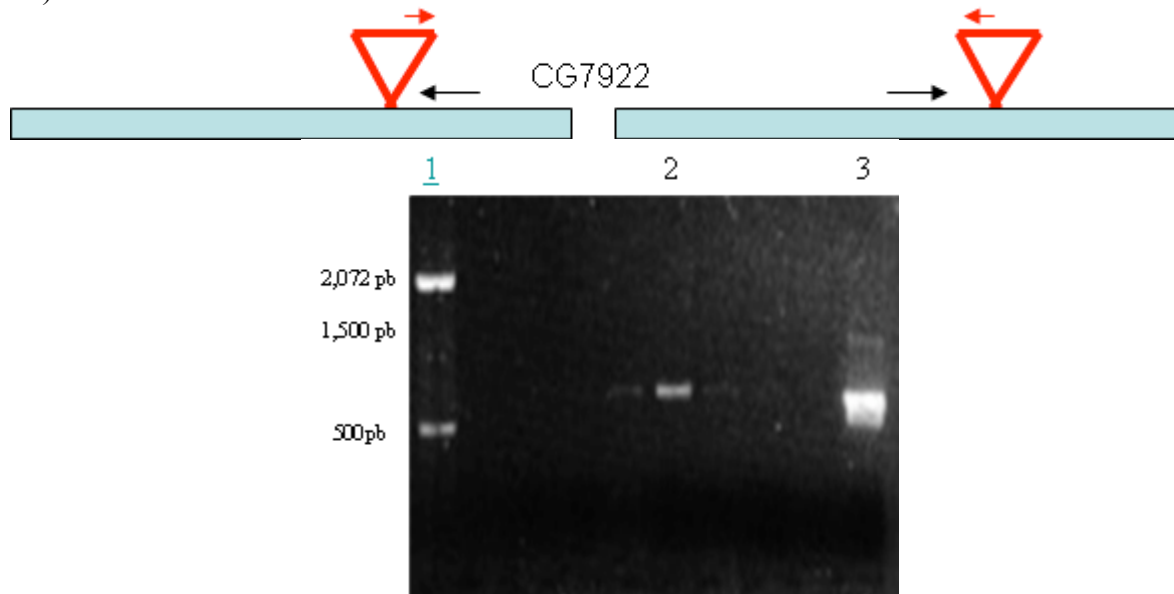


Figura 15.-Marcador 100 pb (carril 1). Fragmento de PCR amplificado usando DNA de la línea 3A42/Tm2 con oligos 3A Fw del gen CG7922 y el oligo Amp 3' Fw del elemento P (carril 2). Control de PCR usando los oligos 3A Fw y 3A Rv amplificando 680 pb del gen CG7922 (gel de agarosa 1%, bromuro de etidio).

Se corroboró como sitio de la inserción al gen CG7922, ya que se obtuvo un producto de amplificación usando un oligo que anilla en la secuencia de este gen (3A Fw) y otro dentro del elemento P (Amp 3' Fw).

Se hizo un PCR control a todos los oligos por separado para comprobar que no se amplificara ninguna banda al usar el oligo solo sin su complementario. Además se probó el mismo juego de oligos pero usando el DNA de una línea con un elemento P insertado en otro sitio como templado y no se amplificó ningún producto de PCR.

Hipótesis:

En la línea 3A42 atrapamos una red neuronal necesaria para la expansión del ala y la correcta formación del fémur y la tibia en la pata. La actividad química de estas neuronas es necesaria durante el desarrollo para que se forme correctamente la pata y se extienda el ala.

Objetivos:

- 1.-Caracterizar el fenotipo de alas y patas en las moscas TeTxLC;3A42.
- 2.-Determinar la letalidad en las moscas TeTxLC;3A42.
- 3.-Cuantificar la fertilidad en ambos sexos de moscas TeTxLC;3A42.
- 4.-Caracterizar la red neuronal y los sitios de innervación en larvas GFP;3A42 mediante disecciones de cerebros y de larvas completas.
- 5.-Caracterizar la red neuronal en el adulto en moscas GFP; 3A42 y mCD8-GFP;3A42 mediante disecciones de cerebros.
- 6.-Identificar los sitios de innervación de las neuronas de la red en faratos GFP;3A42 mediante disecciones.
- 7.-Identificar el tipo de neuronas que conforman la red, mediante inmuno-histoquímica, usando anticuerpos contra diferentes marcadores neuronales.
- 8.-Identificar en que momento del desarrollo es necesaria la actividad de la red neuronal para la formación de estas estructuras y cual seria el efecto de inactivar la red en una mosca adulta, usando la proteína termo sensible GAL80 bajo el control de UAS.

Estrategia experimental:

Sistema UAS-GAL4:

En este sistema tenemos dos elementos involucrados: UAS y GAL4: El gen GAL4 codifica para una proteína que se une al DNA de forma dimérica; fue identificado en *Saccharomyces cerevisiae* como un regulador maestro de la transcripción y se ha demostrado su papel como activador transcripcional (Ptashne, 1988). GAL4 se une al DNA de forma directa a una secuencia específica conocida como “upstream activator sequences” o UAS (Giniger *et al.*, 1985).

GAL4 no tiene secuencias blanco en el genoma de *Drosophila* y ha sido expresando en diversos tipos celulares sin presentar efectos o toxicidad alguna; por otro lado las secuencias UAS tampoco se encuentran de forma natural en el genoma de *D. melanogaster* (Laughton and Gesteland, 1984). Usando animales transgénicos se ha demostrado que GAL4 es capaz de activar la transcripción de genes que se encuentran bajo el control de secuencias UAS en diversos organismos, incluyendo *Drosophila melanogaster* (Fischer *et al.*, 1988).

Enhancer Trap:

Tenemos una línea de moscas transgénicas que tienen insertado un elemento P-GAL4 con un promotor mínimo el cual tiene la capacidad de “atrapar” las secuencias regulatorias de genes adyacentes al sitio de inserción; de esta manera GAL4 se expresa en un patrón espacio temporal definido por el enhancer capturado, y podemos seguirlo mediante un gen reportero.

Por otro lado, tenemos una línea de moscas que tienen un transposón insertado con las secuencias UAS fusionadas a un gen reportero, o a un gen efector. Cuando se cruzan éstas dos líneas de moscas, la progenie que hereda ambos elementos expresa el gen efector, causando así un fenotipo. A menos que GAL4 se encuentre presente, el gen efector no se expresa. En teoría podemos atrapar cualquier secuencia regulatoria en el genoma ya que estas inserciones caen de manera semi-aleatoria (Fig. 16).

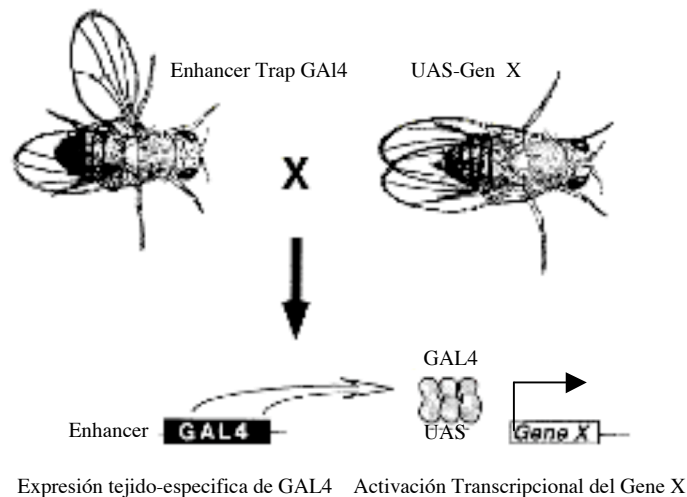


Figura 16.- Esquema de Enhancer Trap. (Modificado de Brand and Perrimon 1993).

Una cualidad muy importante de este sistema es que podemos dirigir la búsqueda de forma tejida específica con respecto al tipo de gen efector que utilicemos. Como nuestro interés es encontrar genes del sistema nervioso podemos usar un efector que solo afecte a neuronas. Para ello la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLC), es una herramienta ideal ya que inhibe la liberación sináptica mediada por calcio sin afectar la viabilidad de las neuronas (Sweeney et al., 1995).

Toxina de tétanos:

La toxina de tétanos (TeTxLC) es una metalo-proteasa de zinc, que bloquea la neurotransmisión cortando de manera específica a la proteína sináptica de membrana asociada a vesículas llamada sinaptobrevina (VAMP) (Verderio *et al.*, 1999). La toxina está formada por una cadena pesada de 100 kDa y una cadena ligera de 50 kDa unidas por un puente disulfuro. La cadena pesada está involucrada en la unión e internalización de la toxina a la neurona y la cadena ligera es la metaloproteasa que corta de forma selectiva a la sinaptobrevina.

La toxina de tétanos completa actúa de dos formas: extracelularmente la cadena pesada se pega a las uniones neuromusculares y permite la internalización, e intracelularmente la cadena ligera está involucrada en inhibición sináptica (Niemann *et al.*, 1994, Schiavo *et al.*, 2000).

Es importante recalcar que solamente usamos la cadena ligera de la toxina, ya que así se inactiva solamente la neurona que la expresó, sin la posibilidad de que las células vecinas se inactiven por difusión de la toxina, pues para ello se necesitaría de la cadena pesada.

Esto hace que el sistema esté restringido a las neuronas que expresan GAL, con esta toxina las neuronas no se mueren pero quedan inhibidas en la liberación de neurotransmisores, lo que las hace quedar en “silencio” con respecto a su entorno. La expresión de la TeTxLC fuera del sistema nervioso no presenta ningún fenotipo ni alteración alguna, puesto que la acción de la TeTxLC es específica de neuronas.

Usando esta estrategia experimental tenemos tres posibilidades con respecto al tipo de gen atrapado:

Primero: que la inserción atrape la secuencia regulatoria de un gen no neuronal, por lo tanto no se vea un fenotipo, ya que la proteína GAL4 activaría la expresión de la TeTxLC fuera del sistema nervioso, en donde no es capaz de actuar.

Segundo: que la inserción atrape a un gen neuronal de expresión generalizada, el sistema nervioso completo se apagaría y la progenie no sería viable. Estas dos posibilidades son excluidas al principio de nuestra selección.

Tercero: que la inserción atrape a un enhancer que se expresa en una red neuronal discreta, y que al inactivarla con la toxina se observe un fenotipo definido. Estos casos son los que nos interesa estudiar.

Una vez que se tiene a la línea con el fenotipo de interés, podemos utilizar genes reporteros como GFP, para visualizar directamente la red neuronal, o genes efectores como GAL80 para regular la actividad neuronal durante el desarrollo de la mosca.

GFP:

La proteína verde fluorescente GFP ha sido usada ampliamente en la mosca como gen reportero del sistema UAS-GAL4 para visualizar el sistema nervioso (Sun Banhua. *et al.*, 1999, Murray *et al.*, 1998). No interfiere con el crecimiento ni con la proliferación celular y no es tóxica (Yeh, *et al.* 1995. Chalfie M. *et al.* 1994. Chalfie M. 1995). Además existen fusiones con otras proteínas que sirven para dirigir la localización de la GFP dentro de la célula. Una de estas fusiones fue de gran utilidad para este trabajo. La mCD8-GFP que marca de forma preferencial las membranas celulares en neuronas (Lee and Luo. 1999). Así tenemos una variedad de herramientas moleculares para discernir con mayor claridad a las neuronas y sus proyecciones.

GAL80:

Otra herramienta del sistema UAS-GAL4 es la proteína GAL80. GAL80 es un represor de la transcripción, que impide que GAL4 funcione como activador mediante una interacción proteína-proteína. Como consecuencia, GAL80 impide la transcripción de cualquier gen bajo las secuencias UAS en presencia de GAL4 (Hirst *et al.*, 2001; Melsher and Xu, 2001).

Usamos una línea de moscas transgénicas que llevan a la proteína GAL80-termosensible, ésta proteína GAL80 modificada es funcionalmente activa a 18°C pero se desnatura a 30°C, lo que nos permite tener moscas que lleven el gen de la toxina sin que ésta se exprese, por la acción de represor GAL80 (Figura 17). Esto nos permite que las moscas se desarrollen normalmente, y tengan una actividad neuronal normal a 18°C hasta el momento del desarrollo que necesitamos estudiar al pasarlas a la temperatura no permisiva.

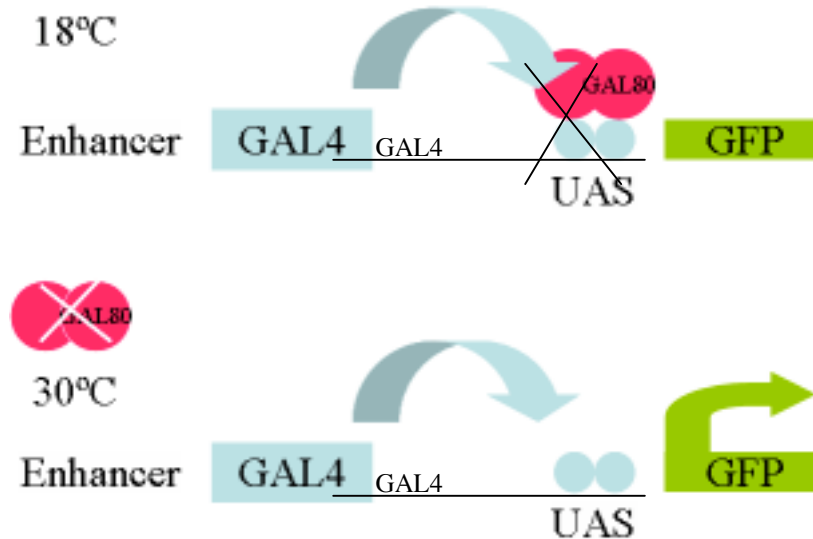


Figura 17.- Esquema de GAL80.

PCR reverso:

El PCR Reverso es una técnica que nos permitió identificar el sitio de inserción del transposón, la estrategia es digerir el DNA genómico completo con una enzima de restricción que corte frecuentemente en el genoma. Una vez digerido todo el DNA

esperamos tener una serie de fragmentos de diversos tamaños, dentro de los cuales algunos contendrán simultáneamente un fragmento del transposón y un fragmento del DNA geonómico adyacente. Después, ligamos todos los fragmentos favoreciendo que lo hagan sobre si mismos. Así obtenemos una colección de fragmentos de DNA circular, algunos de las cuales, llevaran secuencias de nuestro transposón y secuencias genómicas adyacentes a la inserción en una misma molécula (Sullivan *et al.*, 2000).

Dado que conocemos la secuencia de nucleótidos de nuestro transposón podemos predecir los sitios de corte de la enzima de restricción que usamos y en base a eso diseñar oligos internos sobre las secuencias palindrómicas del transposón. Los oligos amplifican lo que se encuentra hacia afuera del transposón. Se hace un PCR usando como templado las moléculas de DNA circularizado para obtener un amplificado, el cual contiene las secuencias adyacentes al sitio de la inserción. Al secuenciar este producto de PCR se puede usar la información obtenida para hacer un análisis tipo BLAST contra el genoma completo de *Drosophila melanogaster*. Esto nos proporciona información del gen adyacente a la inserción (Fig.18)

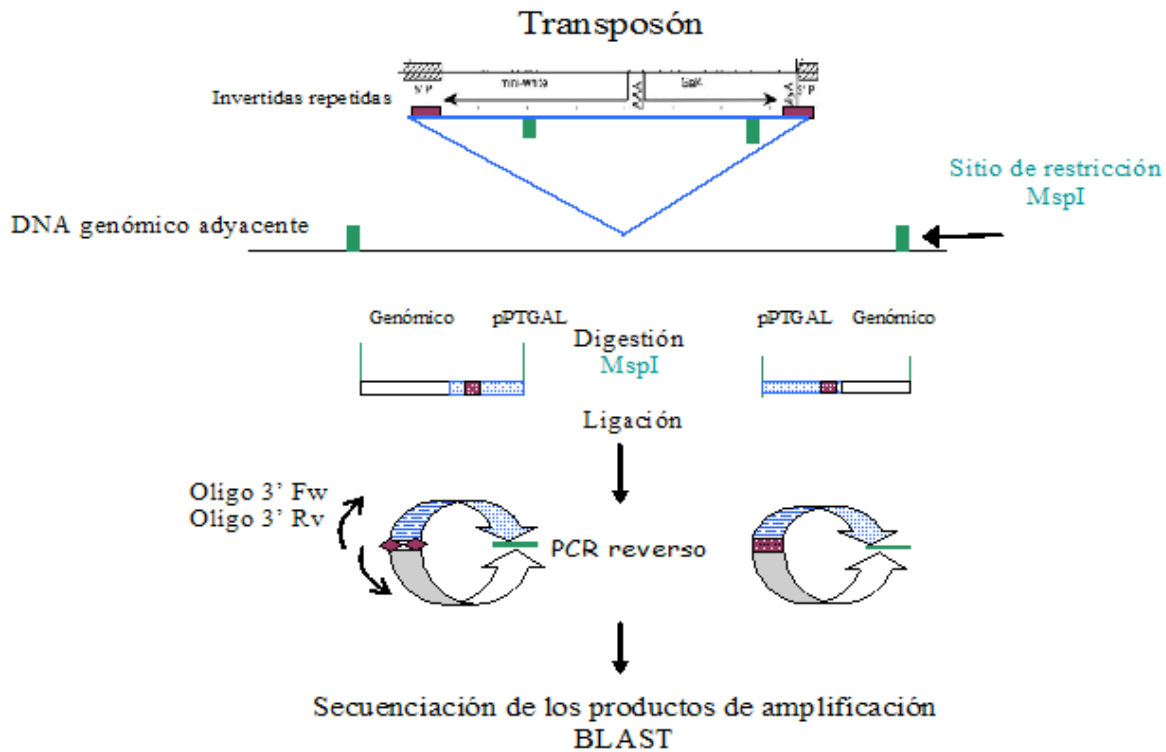


Figura 18.- Esquema de PCR inverso

Resultados:

Caracterización fenotípica de la inserción 3A42:

La línea con la inserción 3A42 homóciga o heteróciga no presentó ningún fenotipo, por lo que concluimos que la inserción *per se* no causa ningún defecto a simple vista. Cuando la crucé con moscas que expresan la TeTxLC bajo el promotor UAS, observe que la progenie con el genotipo TeTxLC/Sp; 3A42/+ presentó un defecto en la forma del fémur en el tercer par de patas, como resultado de la inactivación selectiva de algunas de sus neuronas por la toxina; además de que los individuos no extienden las alas (Fig. 19-21).



Figura 19 A.-Mosca w-/w-;Sp/Cyo control. B.-Mosca 3A42/+ control de la inserción sin toxina. C y D.-Moscas Sp/TeTxLC; 3A42/+ con defectos en el tercer par de patas (flechas) y las alas no extendidas (flechas punteadas).



Figura 20. A.- Ala de mosca WT. B y C.- Ala de mosca TeTxLC/Sp; 3A42/+. D.- Comparación de tamaño y forma de un ala TeTxLC/Sp; 3A42/+ (arriba) contra una WT (abajo).

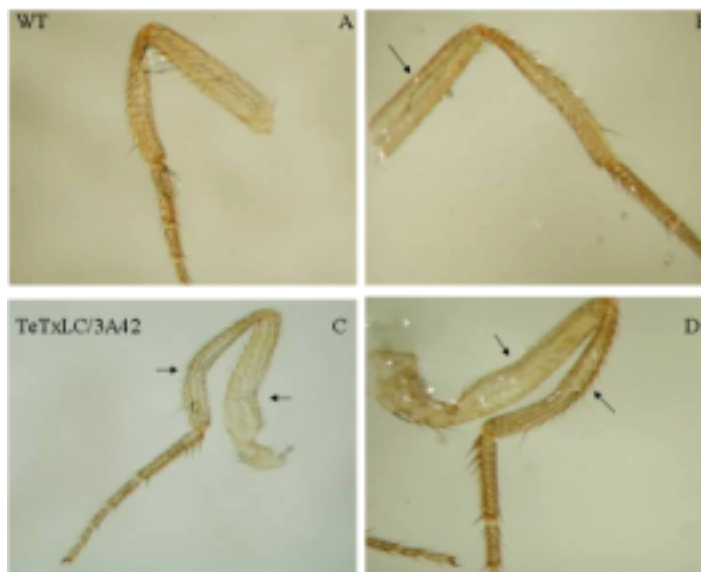


Figura21.- A y B.- tercer par de patas de mosca WT, derecha e izquierda respectivamente, la forma de la tibia normal es normal (flechas). C, D tercer par de patas de mosca TeTxLC/Sp; 3A42/+. Se observa una marcada curvatura en la tibia y el fémur (flechas).

El defecto en la pata se da a nivel del fémur y de la tibia; la pata de la mosca TeTxLC;3A42 presentó el mismo tamaño que la pata de una mosca silvestre, sólo que con una curvatura muy marcada.

Los cromosomas balancers usados en todos los esquemas de cruza y los fenotipos correspondientes a cada un se muestran en la siguiente tabla:

Balancers	
Nombre	Fenotipo
Cyo	Alas curvas
Sp	Pelos bajo los alterios
MKRS	Pelos cortos
Tm2	Alteración en el alterio

Letalidad:

El siguiente objetivo fue determinar si existía letalidad en las moscas TeTxLC; 3A42 con respecto al resto de la población. Para esto realicé 5 experimentos independientes con los siguientes esquemas de cruza y cuantifiqué la progenie total.

Esquema de cruza 1:

TeTxLC / Cyo ; + / +	X	Sp / Cyo ; 3A42/MKRS
----------------------	---	----------------------

Progenie:

TeTxLC / Cyo ; 3A42 / +	TeTxLC / Cyo ; MKRS / +	Sp / Cyo ; 3A42 / +	Cyo / Cyo ; 3A42 / + Letal
TeTxLC / Sp ; 3A42 / +	TeTxLC / Sp ; MKRS / +	Sp / Cyo ; MKRS / +	Cyo / Cyo ; MKRS / + Letal

Aquí esperaba 8 genotipos diferentes en la progenie, dos de ellos letales; y que solo un 33.3% del total de las moscas heredara la inserción y la toxina juntas, presentando como resultado el fenotipo de patas curvas y las alas no extendidas.

Tabla 1.- Letalidad de la inserción 3A42 en presencia de la toxina de tétanos		
Progenie	Número de moscas (Obtenidas/Total)	Porcentaje % Obtenido {Esperado}
TeTxLC/Cyo;3A42/+	14	
TeTxLC/Sp;3A42/+	15	
TOTAL	29 / 364	8% {33.3%}
TeTxLC/Cyo;MKRS/+	103	
TeTxLC/Sp;MKRS/+	85	
Cyo/Sp;3A42/+	67	
Cyo/Sp;MKRS/+	80	
TOTAL	335/364	92% {66.7%}

Esquema de cruce 2:

TeTxLC / TeTxLC + +	X	Sp / Cyo ; 3A42/MKRS
---------------------	---	----------------------

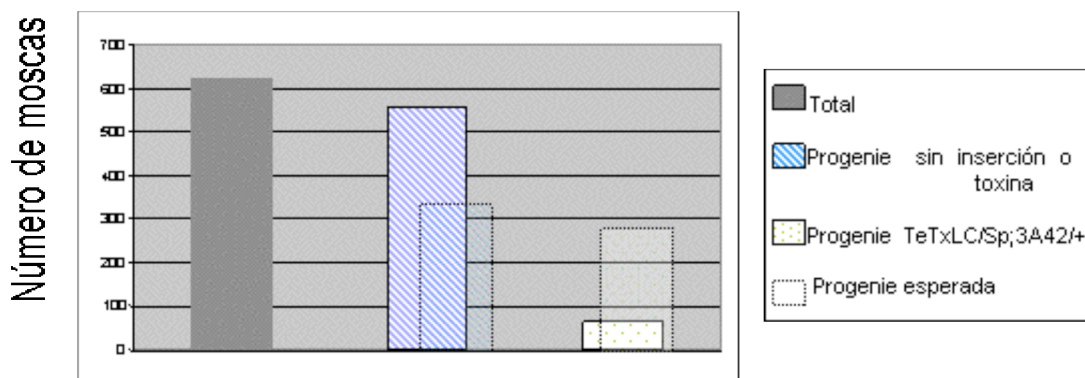
Progenie:

TeTxLC / Cyo ; 3A42 / +	TeTxLC / Cyo ; MKRS / +
TeTxLC / Sp ; 3A42 / +	TeTxLC / Sp ; MKRS / +

Aquí esperaba 4 genotipos diferentes, y que el 50% de la progenie total heredara la inserción y la toxina juntas.

Progenie	Número de moscas (Obtenidas/Total)	Porcentaje % Obtenido (Esperado)
TeTxLC/Cyo;3A42/+ TeTxLC/Sp;3A42/+	19 19	
TOTAL	38/258	14.72% (50%)
TeTxLC/Cyo;MKRS/+ TeTxLC/Sp;MKRS/+	112 108	
TOTAL	220/258	85.27% (50%)

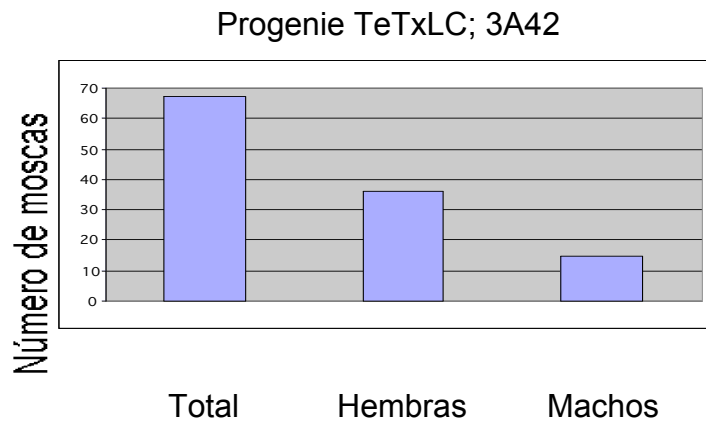
Contrario a lo esperado, solo nació alrededor de un **10%** de la progenie esperada, lo que indica una alta letalidad en las moscas TeTxLC/3A42. Además la letalidad es mayor en los machos que en las hembras, ya que solo llega a nacer un 32% del 50% esperado. La letalidad se presentó en faratos (Gráfica 1).



Gráfica 1.- Cuantificación de la progenie que heredó la toxina o la inserción solos (rayas) y la progenie que heredó ambos elementos juntos TeTxLC/3A42 (puntos).

Como siguiente objetivo determine si existía una diferencia de letalidad entre machos y hembras, para esto conté y separé a la progenie por sexo. Como resultado de este

experimento determiné que los machos TeTxLC; 3A42 presentan una mayor letalidad que las hembras, ya que nace una proporción de 70% hembras contra un 30% de machos; el porcentaje esperado en este experimento es del 50%-50% machos y hembras respectivamente (Grafica 2).



Gráfica 2.- Diferencia entre la cantidad de machos y hembras TeTxLC/3A42 que nacen.

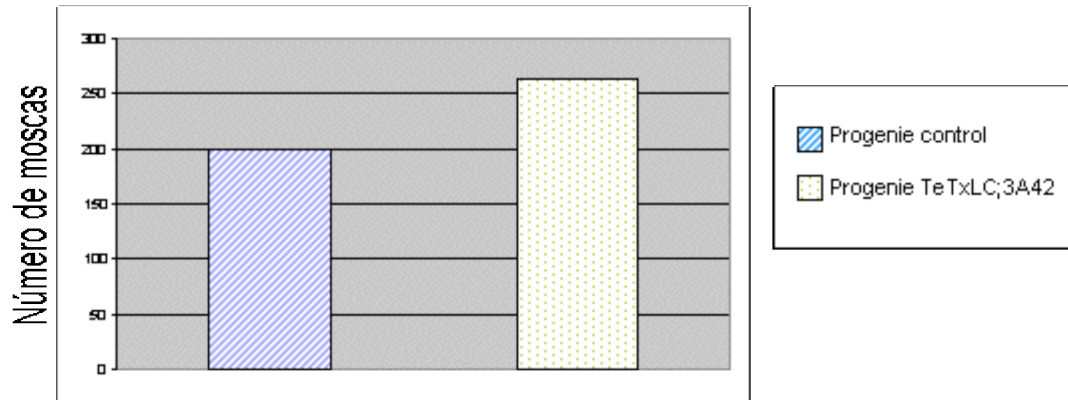
Ensayos de fertilidad:

Ahora la pregunta fue ¿son fértiles son las moscas TeTxLC; 3A42?, y para contestar esto seguí el siguiente esquema de cruzas. Como control utilicé a la línea original $sp/cyo; 3A42/MKRS$ para evaluar su fertilidad. Conté la progenie de 4 cruzas independientes en el caso de las hembras y de 9 cruzas independientes para los machos y usé un número equivalente de controles.

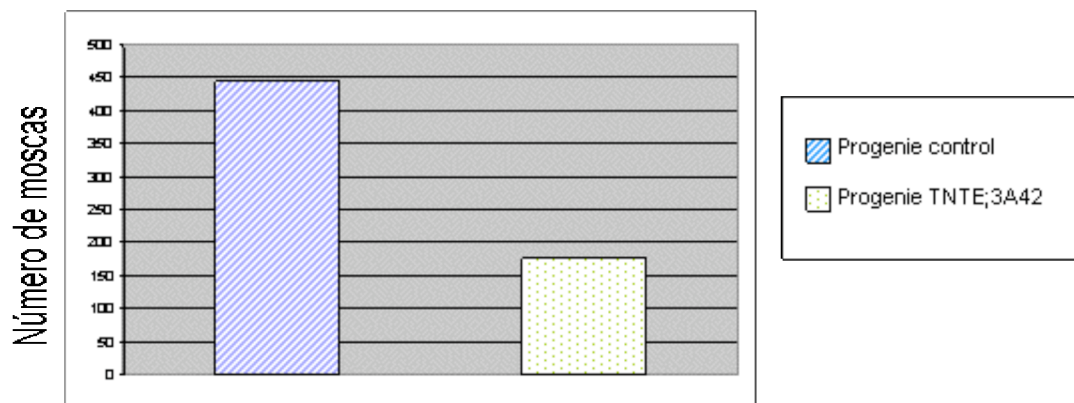
Esquema de craza	Progenie Total	Machos	Hembras
Hembra (1) TeTxLC/Cyo;3A42/+ X Machos (3) White	263	132	131
Control Hembra (1) Sp/Cyo;3A42/MKRS X Machos (3) White	199	107	94
Macho (1) TeTxLC/Cyo;3A42/+ X Hembras (3) White	*176	75	101
Control Macho (1) TeTxLC/Cyo;3A42/+ X Hembras (3) White	444	210	234

* En este caso 5 de los machos no tuvieron progenie alguna.

No hubo una diferencia significativa en el caso de las hembras con respecto a la progenie que tuvieron (Gráfica 3), en cambio, los machos que llevaban la inserción y la toxina tuvieron menos de la mitad de la progenie esperada (Gráfica 4). Además en 5 de las 9 cruzas los machos no tuvieron progenie alguna.



Gráfica 3.-Progenie de hembras silvestres (rayas) y machos TeTxLC/ 3A42 (puntos)



Gráfica 4.-Progenie de machos silvestres (rayas) y machos TeTxLC/ 3A42 (puntos)

Para éste experimento les corté las alas a las hembras para que los machos pudieran alcanzarlas y no afectara en la fertilidad.

GFP

Caracterización de la red neuronal en el SNC:

Los moscas TeTxLC; 3A42 presentaron una diferencia en la letalidad dependiente del sexo, por lo que busqué diferencias entre machos y hembras en el patrón de expresión de GAL4 en el sistema nervioso de larvas, usando como reportero GFP.

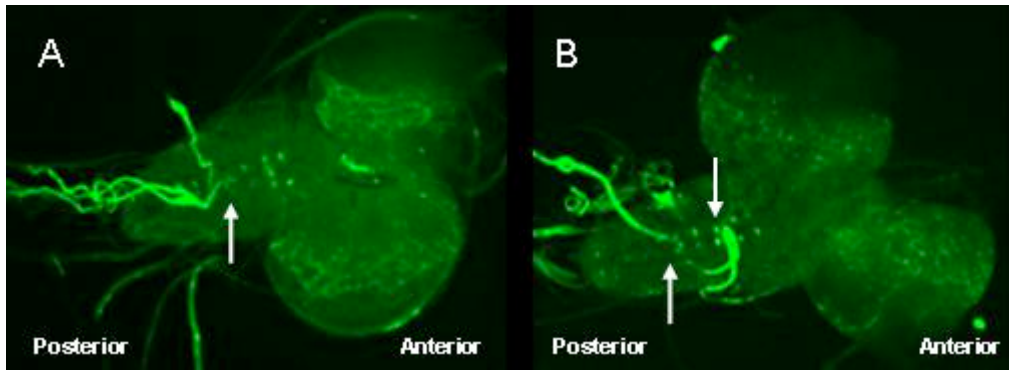


Figura. 22.-Vista dorsal del cerebro completo de larvas de tercer instar GFP; 3A42. A- Cerebro de una larva macho, B-Cerebro de una larva hembra (5X).

En la figura 22 podemos ver que no hay ninguna diferencia a simple vista en el patrón de expresión de la GFP entre machos y hembras en larvas que pudiera explicar la desigualdad en la letalidad y la fertilidad. Se observan 10 pares de neuronas a lo largo de la línea media del GTA y del par 3 y 5 salen grandes proyecciones nerviosas hacia la parte dorsal de la larva (flechas).

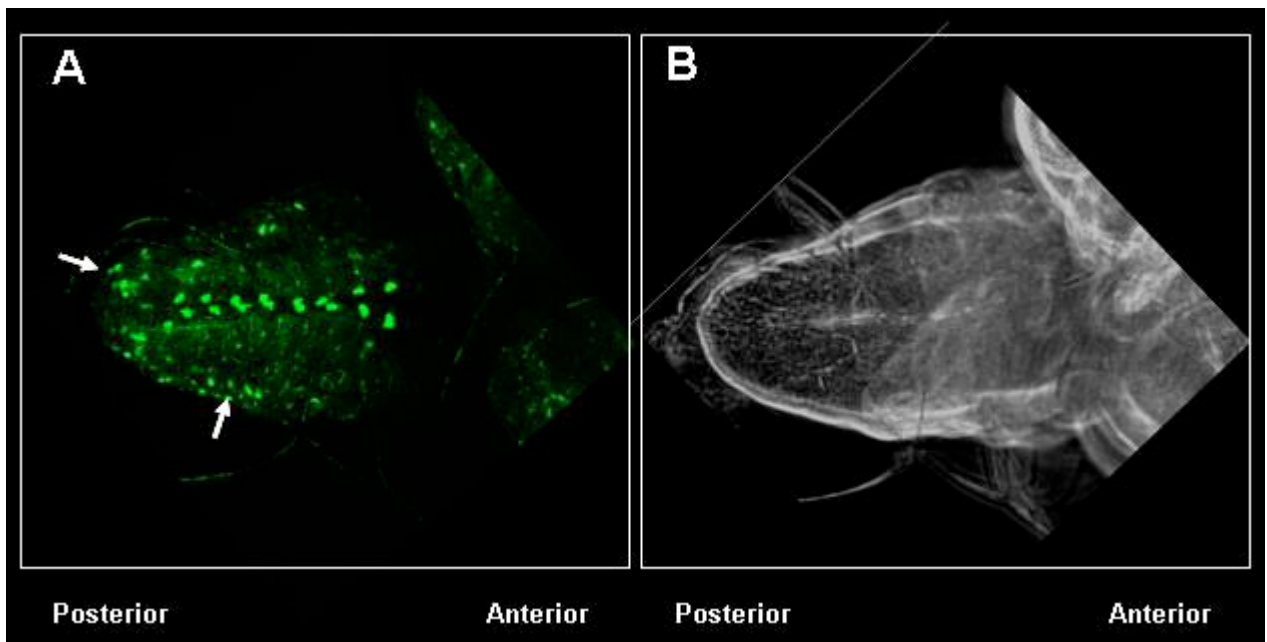


Figura 23.-Vista dorsal del Ganglio Torácico Abdominal de larva de tercer instar GFP; 3A42 (10X) Panel A: Reconstrucción confocal y panel B: imagen en contraste de fases para mostrar la integridad del tejido.

En la figura 23 se observa con mayor aumento el GTA, en el panel A (GFP) resaltan los 10 pares de neuronas a lo largo de la línea media vistos anteriormente, además se aprecian mejor neuronas en la parte mas posterior y neuronas laterales al línea media del GTA (flechas) y en el panel B se muestra el contraste de fases.

Caracterización de la red neuronal en la larva:

Como siguiente objetivo identifique la red neuronal en la larva completa haciendo disecciones tipo “filetes”. Para esto usé larvas de tercer instar MCD8-GFP; 3A42 para seguir el patrón de expresión de la inserción en las proyecciones nerviosas con mayor facilidad (Sullivan *et al.*, 2000).

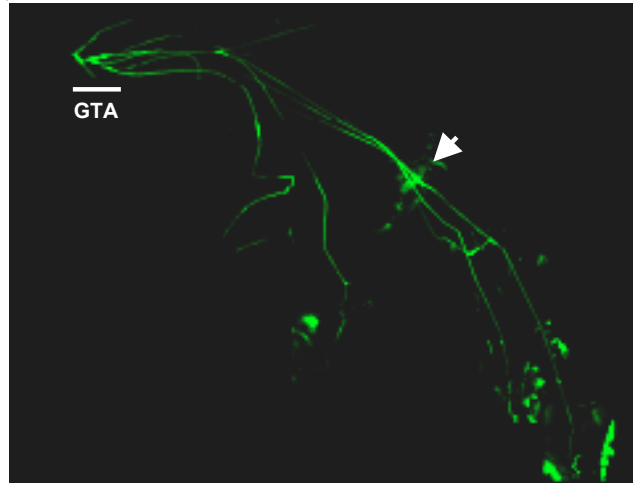


Figura 24.- Reconstrucción de la red neuronal en la línea MCD8-GFP/Cyo;3A42/+ en larva de tercer instar fileteada completa con microscopía confocal (10X), la barra blanca indica la posición del GTA y la flecha indican algunas interneuronas.

En la figura 24 se observan neuronas fuera del GTA que tienen proyecciones hacia la parte posterior, que se conectan con interneuronas, y estas a su vez son las que inervan la parte más posterior de la larva. En la siguiente figura se muestran con mayor acercamiento estas estructuras.

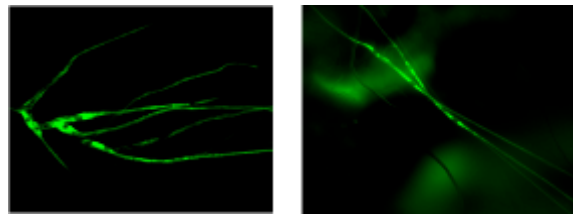


Figura 25. Neuronas periféricas que salen del GTA (20X) en microscopía confocal e interneuronas a lo largo de la parte media de la larva en microscopía de fluorescencia. Línea MCD8-GFP/Cyo; 3A42/+.

En la figura 25 podemos ver con mayor aumento el grupo de neuronas que surgen del GTA y sus proyecciones, también se aprecian las primeras interneuronas con las que se conectan. Larvas de primer instar sin abrir en filete presentan estructuras marcadas por la GFP que se localizan a todo lo largo de la parte dorsal de la larva (Figura 26).

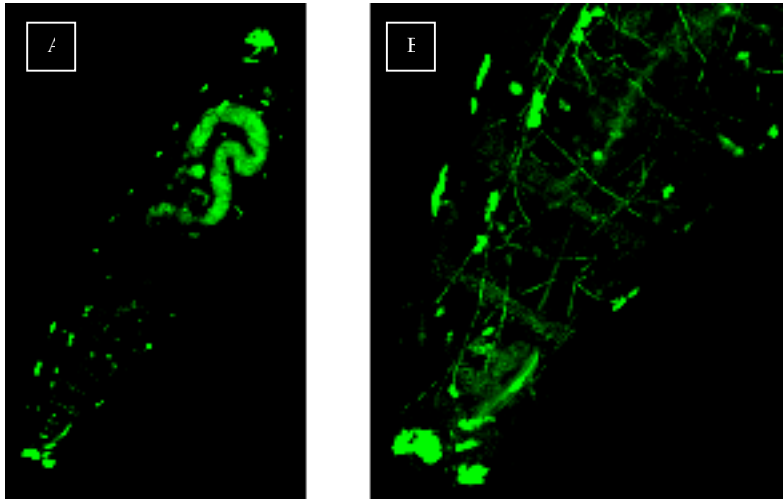


Figura 26.- Larva de Primer instar MCD8-GFP; 3A42 A.- larva completa (5X) B.- (20X)

Tinción de Faloidina Rodaminada:

Para saber si estas estructuras eran de tipo muscular hice tinciones específicas con Faloidina Rodaminada (FR) (Figura 27). La faloidina se une de manera específica a F-actina que se encuentra mayoritariamente en músculo. Para ver la faloidina se acopla al fluoróforo rodamina, que emite en rojo a una longitud de onda de 579nm.

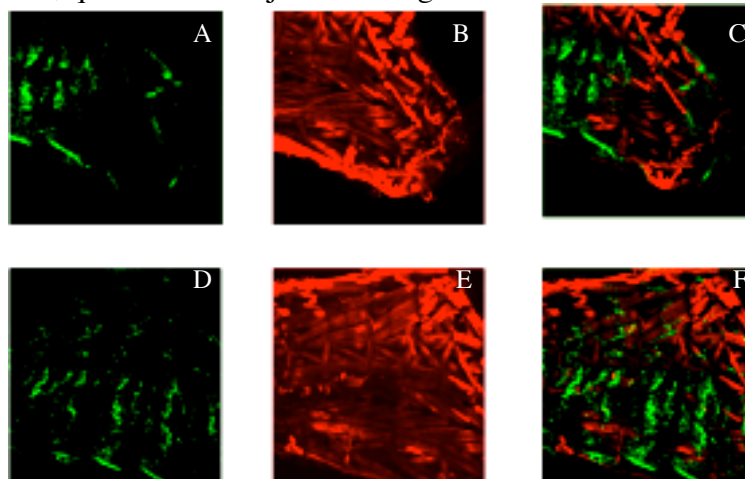


Figura 27- Filetes de Larva de tercer instar GFP; 3A42. A y D- fluorescencia en verde (GFP), B y E-Tinción con Faloidina Rodaminada en rojo, C y F-Traslape de imágenes y de la fluorescencia verde y roja.

Como se puede ver en la figura 27 la GFP (verde) no colocaliza con la FR (rojo), porque se encuentran en planos diferentes de la proyección. Por lo que concluimos que estas estructuras no son tejido muscular.

Para poder ver los discos imaginales en la larva hice tinciones con yoduro de propidio que tiñe el DNA y evidencia los núcleos celulares en color rojo en preparaciones de filetes de larvas MCD8-GFP; 3A42 (Figura 28).

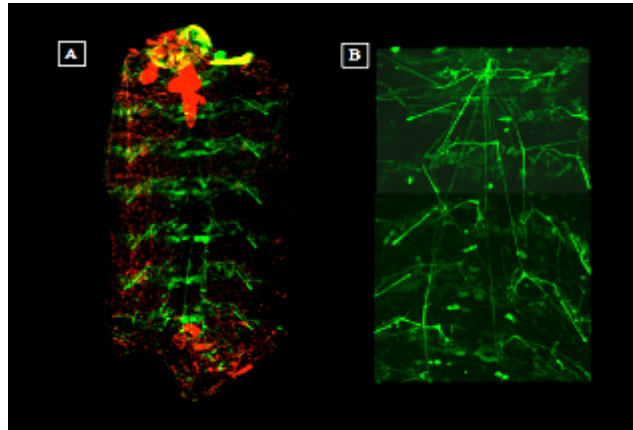


Figura 28.-Circuito completo en filete de larva. A- Larva MCD8-GFP; 3A42 con tinción de yoduro de propidio, en rojo se observan algunos discos imaginales cerca del cerebro y el disco genital en la parte mas posterior de la larva. B-Larva MCD8-GFP; 3A42 si yoduro de propidio para comparar.

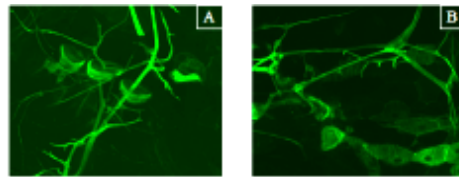


Figura 29.-Vista dorsal de dos innervaciones de las proyecciones nerviosas hacia la epidermis en la parte media de la larva Mcd8-GFP (40X).

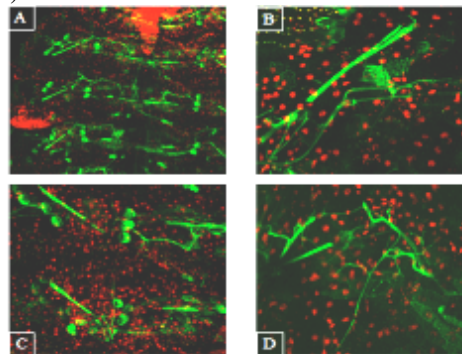


Figura 30.- Vista dorsal de la parte anterior y media de una larva mCD8-GFP/Sp; 3A42/+, tinción con yoduro de propidio. A-GTA en rojo y proyecciones a los nervios laterales en verde (5X) B, C y D- Nervios laterales e innervaciones en verde y células de la epidermis en rojo (20X).

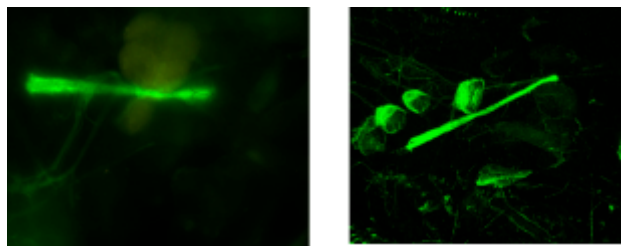


Figura 31.-Sitios de innervación en la parte lateral de la larva por microscopia de fluorescencia y confocal respectivamente (40X).

En los filetes de larva observe la misma estructura lineal en posición diagonal marcada con la MCD8-GFP que se repite simétricamente en 7 segmentos de la larva (Figura 30 panel B y

C). Estas estructuras son inervadas directamente por proyecciones nerviosas provenientes del GTA (Figura 31).

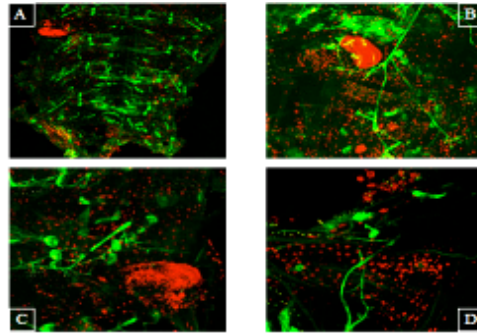


Figura 31.-A-Vista dorsal de la parte posterior de larva MCD8-GFP/Sp; 3A42/+ con tinción de yoduro de propidio (5X). B y C- Proyecciones nerviosas (verde) que inervan al disco imagal genital (rojo). D.- Inervaciones nerviosas (verde) hacia la parte más posterior de la larva (células de la epidermis en rojo) (40X).

En la parte mas posterior de la larva llegan proyecciones que parecen estar inervando al disco imagal genital (Figura 30 panel B y C) y algunas de estas proyecciones están bastante ramificadas (Figura 31 panel D).

Discos Imagales:

Observe la expresión de la GFP en los discos imagales de pata y ala, y para esto usé GFP sola, debido a que la fusión MCD8-GFP marca preferentemente las proyecciones nerviosas y la señal citosólica era más débil.

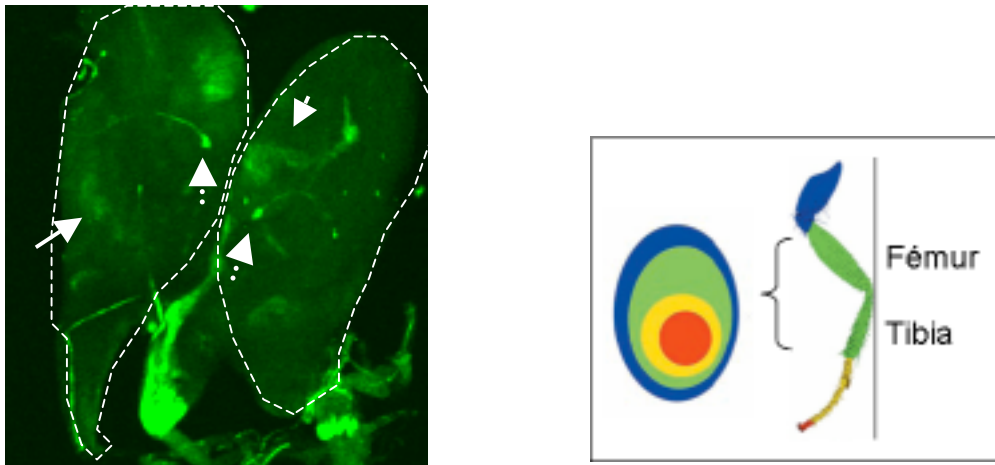


Figura 32.- Disco imagal de pata GFP; 3A42. Representación esquemática del disco imagal y las zonas precursoras de los estructuras de la pata en el adulto.

En la figura 32 se observa la expresión de la GFP en el disco imagal de pata, cerca de la parte media pero no en el centro (flechas) lo que correlaciona con la zona en el esquema del disco imagal que formará las estructuras del fémur y la tibia en la pata adulta. Se observan también algunas células únicas y su proyección (flechas punteadas).

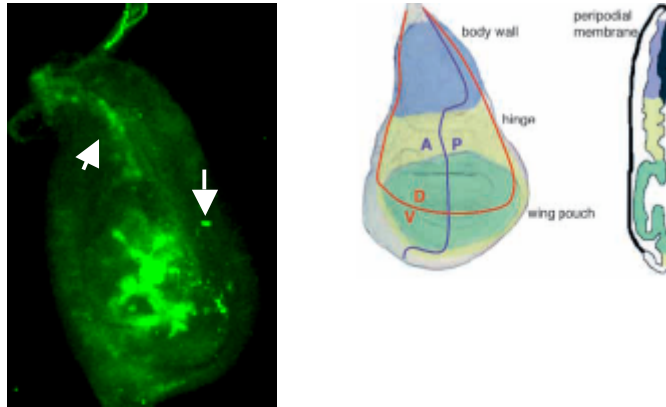


Figura 33.- Disco imagal de ala de larva GFP, 3A42. Esquema de las zonas que darán origen a las diferentes estructuras en el ala adulta.

En la figura 33 observamos la expresión de la GFP en un disco imagal de ala de moscas GFP; 3A42. La mayor parte de la expresión se concentra en el centro y vemos que la proyecciones se dirigen a la base del disco imagal (flechas).

Expresión de GFP en la Pupa:

Otro momento en el desarrollo de la mosca en donde busque la expresión de la GFP en la línea 3A42 fue en la pupa. En la figura 34 observamos que la mayor parte de la expresión de la GFP esta en las antenas (panel B), las alas (panel C) y las patas de la mosca (panel D).

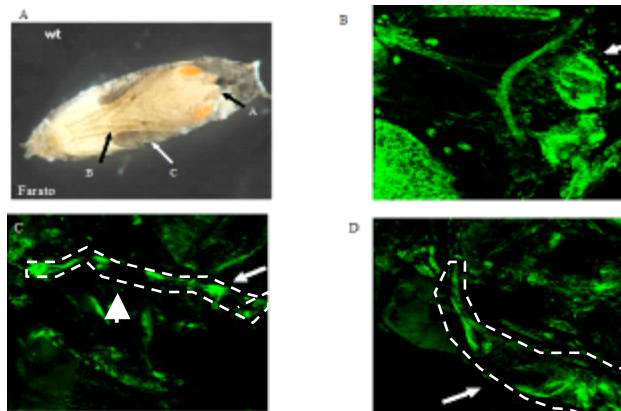


Figura 34.- A Farato WT en donde se señalan las antenas, la pata y el ala con flechas. Farato de mosca GFP; 3A42 mostrando la expresión de la GFP en antena, C-pata y D-ala.

Caracterización de la red neuronal en el adulto:

Como siguiente paso caracterice la red neuronal en la mosca adulta, debido a que es aquí en donde se presenta el fenotipo. La línea con la inserción 3A42 presentó el siguiente patrón de expresión de GAL4 en el sistema nervioso del adulto, visto con la proteína reportera GFP. Atrapamos una red de neuronas en la parte media del ganglio torácico abdominal y en los lóbulos ópticos del cerebro principalmente.

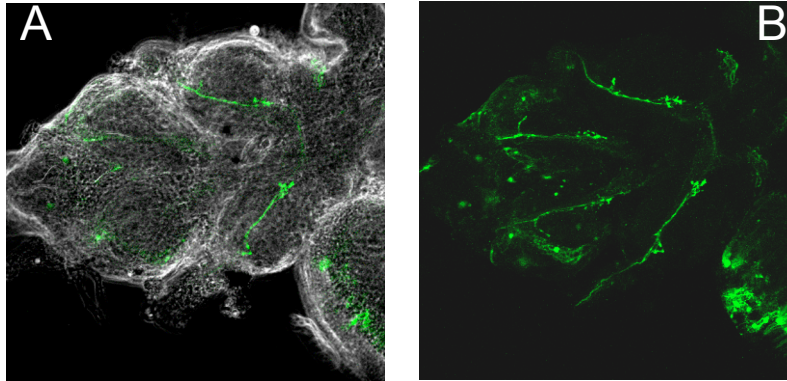


Figura 35.- A.- Ganglio torácico abdominal de mosca adulta GFP/Sp; 3A42/+ contraste de fases. B.- Reconstrucción de confocal.

En la figura 35 se observa la red neuronal en el cerebro de la mosca adulta en el ganglio torácico abdominal, en la línea media posterior del segundo y tercer segmento torácico. Se observan proyecciones nerviosas y algunos cuerpos neuronales en el primer segmento de forma simétrica.

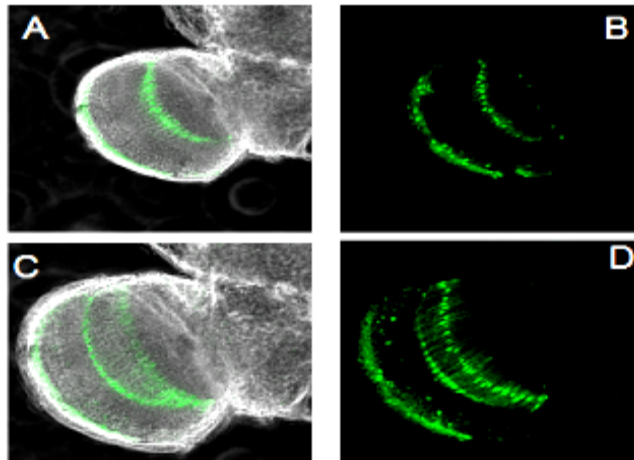


Figura 36.- A y C- Vista dorsal del lóbulo óptico del cerebro de una mosca adulta GFP/Sp; 3A42/+ en contraste de fases y B y D-Reconstrucción confocal mostrando las neuronas y proyecciones en la parte media.

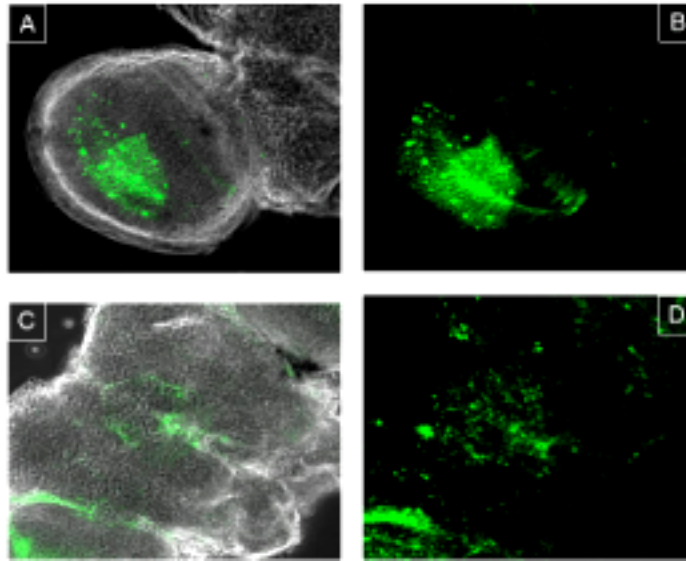


Figura 37-. A- Vista dorsal del lóbulo del cerebro adulto en contraste de fases y B- fluorescencia. C- Parte media del cerebro en contraste de fases y D- Fluorescencia.

En los lóbulos ópticos del cerebro se observan neuronas en la parte media de la médula y la lámina, se observan proyecciones que conectan las dos hileras de neuronas presentes en la médula. Observamos dos hileras de neuronas en la médula y la lámina del lóbulo óptico en la parte más cercana a la retina conectadas entre sí por proyecciones (Figura 36 y figura 37 panel A y B). También se observan neuronas en la parte media del cerebro (Figura 37 panel C y D)

Expresión de GFP en la pata:

En el adulto revise la estructura de la pata en moscas GFP; 3A42 para ver los sitios de expresión de la GFP (Figura 38). Observe proyecciones en verde en la parte media de la coxa y el fémur, mientras que en la tibia las proyecciones se ven cercanas a la parte dorsal de la pata. En el tarso y metatarso no se ve expresión de la GFP. La cutícula se ve en color amarillo debido su autofluorescencia.

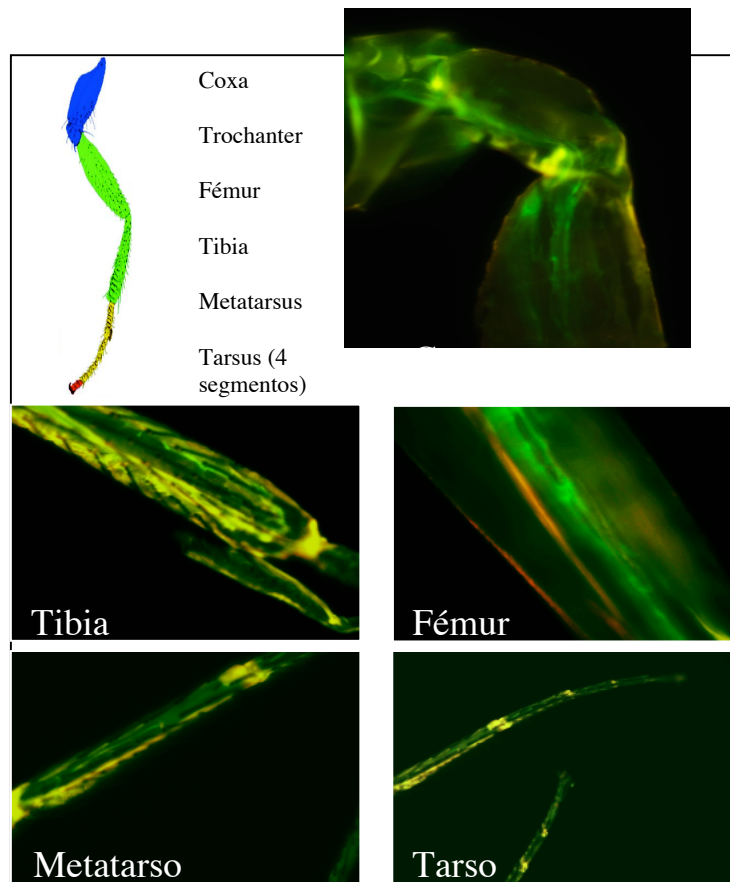


Figura 38.- Esquema de una pata de moscas GFP/3A42, en donde se indica cada uno de los segmentos observados en los siguientes paneles.

Expresión de GFP en el ala:

En alas de moscas GFP; 3A42 se expresa la GFP a lo largo de la vena L1 y en la parte media del ala en una de las venas que la atraviesan verticalmente (Fig. 39).

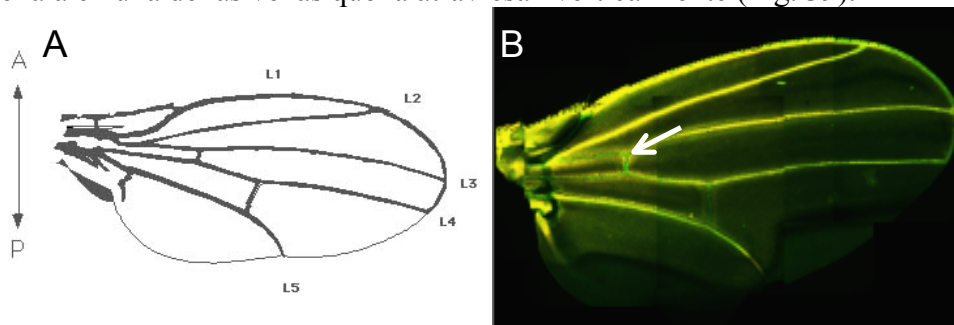


Figura 39.-A- Esquema de un ala completa de moscas con las venas L1-L5. B- ala de moscas GFP/3A42.

Debido a que la cutícula autofluoresce, tome imágenes con mayor acercamiento para distinguir la GFP en verde (Figura 40).

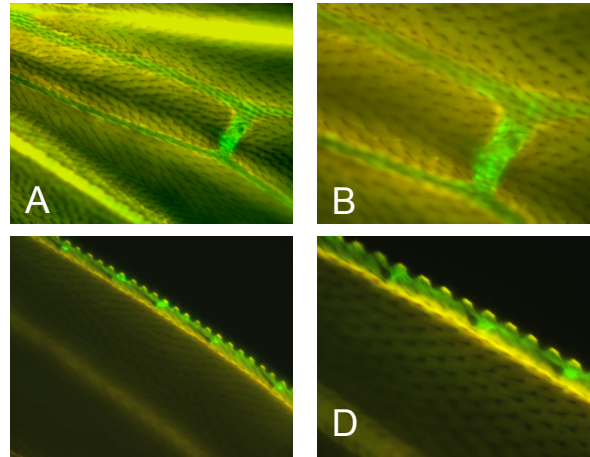


Figura 40.-Vista ventral de ala de mosca GFP; 3A42. A-parte central de ala 10X, B-20X. C- Vena L1 10X, D-20X, se observa una neurona en cada pelo a lo largo de la vena.

Caracterización neuro-química de la red neuronal en la línea 3A42:

Como antecedente en la literatura se han reportado mutantes en *Drosophila* que presentan fenotipos similares a los de nuestra línea 3A42. Moscas en las que se inhibe la liberación neuronal de la hormona *bursicon* son incapaces de extender las alas, presentan un retardo en la pigmentación de la cutícula y el tercer par de patas presenta una curvatura marcada en el fémur (Dewey *et al.*, 2004).

Bursicon:

Bursicon es una hormona peptídica producida por un grupo de neuronas secretoras especializadas, localizadas en el ganglio torácico abdominal, que a su vez, son estimuladas por otro grupo para que liberen esta hormona a la hemolinfa justo antes de que la mosca adulta eclosiona (Luo *et al.*, 2005).

Esta hormona es secretada por 14 neuronas específicas del ganglio torácico abdominal poco antes de la eclosión (Luan *et al.*, 2006), y se une a su receptor *ricket* en el ala permitiendo que ésta se extienda. Mutantes en el receptor presentan el mismo fenotipo que mutantes en *bursicon* (Mendive *et al.*, 2005, Baker and Truman., 2002).

Mapa genético:

Busque en que sitio del genoma de *Drosophila* se encuentra el gen de bursicon y encuentre que éste se localiza cerca del sitio de la inserción del elemento P (Figura 41).

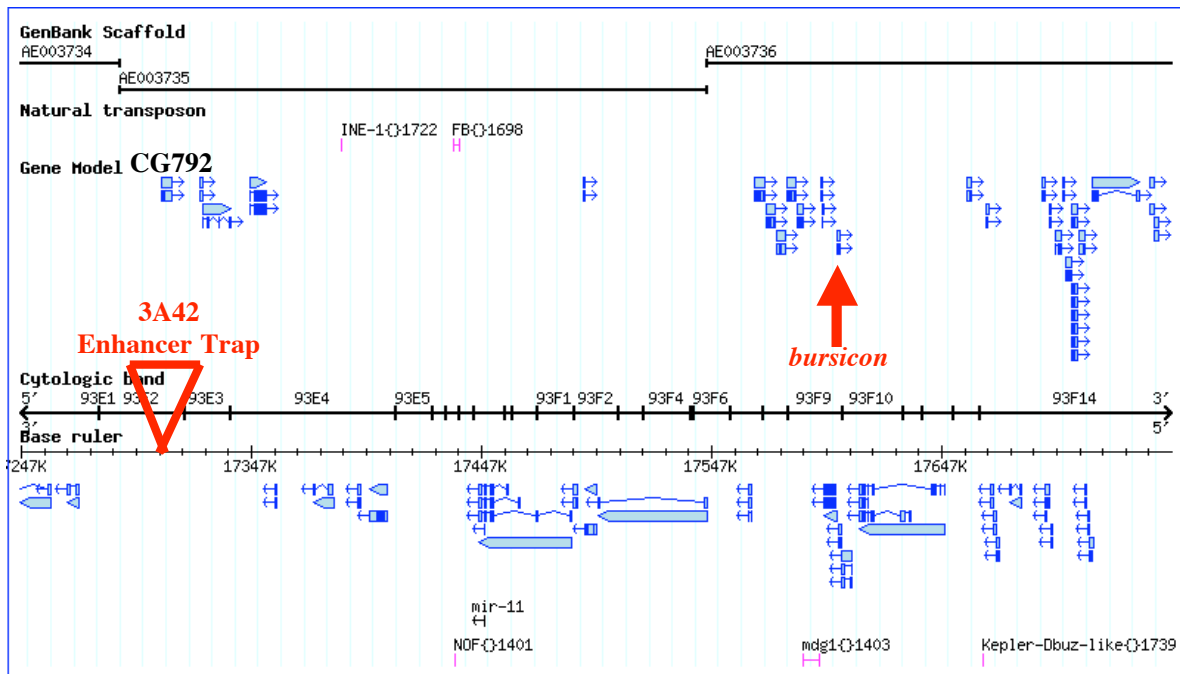


Figura 41.-Mapa genético de la inserción de la línea 3A42 en la base 17308047 y la localización del gen *bursicon* en la base 17595273 del tercer cromosoma

Debido a que un nuestro elemento-P puede atrapar enhancer's cercanos, es posible que las secuencias regulatorias del gen *bursicon* estén atrapadas en nuestra línea 3A42.

Inmunohistoquímica:

Para comprobar si algunas de las neuronas atrapadas en la línea 3A42 son las mismas que las que secretan *bursicon*, usé un anticuerpo contra la sub-unidad α -*bursicon*, y encontré que algunas de estas neuronas correlacionan con las neuronas atrapadas por la inserción 3A42, en cerebros de moscas GFP/Sp; 3A42/+ recién nacidas.

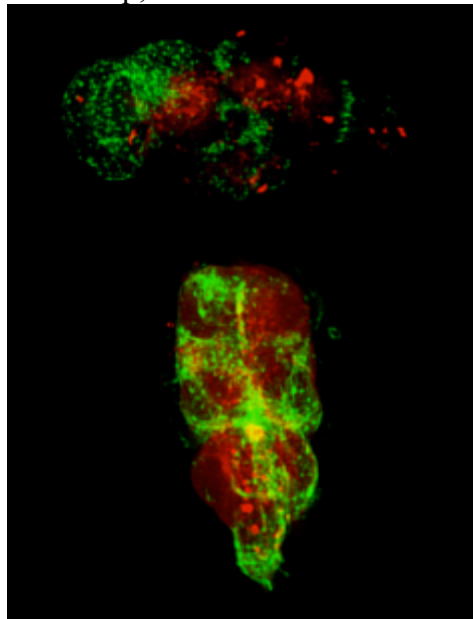


Figura 42.- Inmunohistoquímica contra bursicon (rojo), en un cerebro completo de mosca adulta GFP; 3A42 (neuronas atrapadas en nuestra línea en verde).

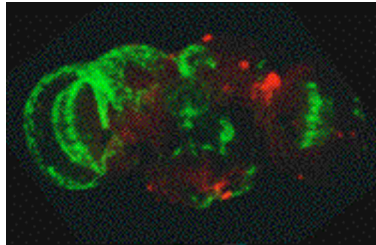


Figura 43.- Inmunohistoquímica contra bursicon (rojo), en un cerebro de mosca adulta GFP; 3A42 (neuronas atrapadas en nuestra línea en verde).

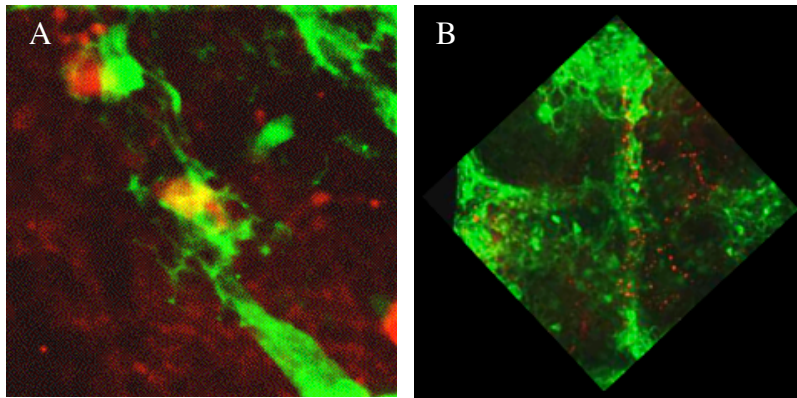


Figura 44.- Ganglio torácico abdominal de moscas adulta GFP, 3A42 40 X. A-Plano único de confocal donde se muestra la coexpresión de la GFP y bursicon en una sola neurona. B-Red de neuronas activadoras de la secreción de bursicon que coexpresan la GFP y bursicon en la parte más anterior del GTA.

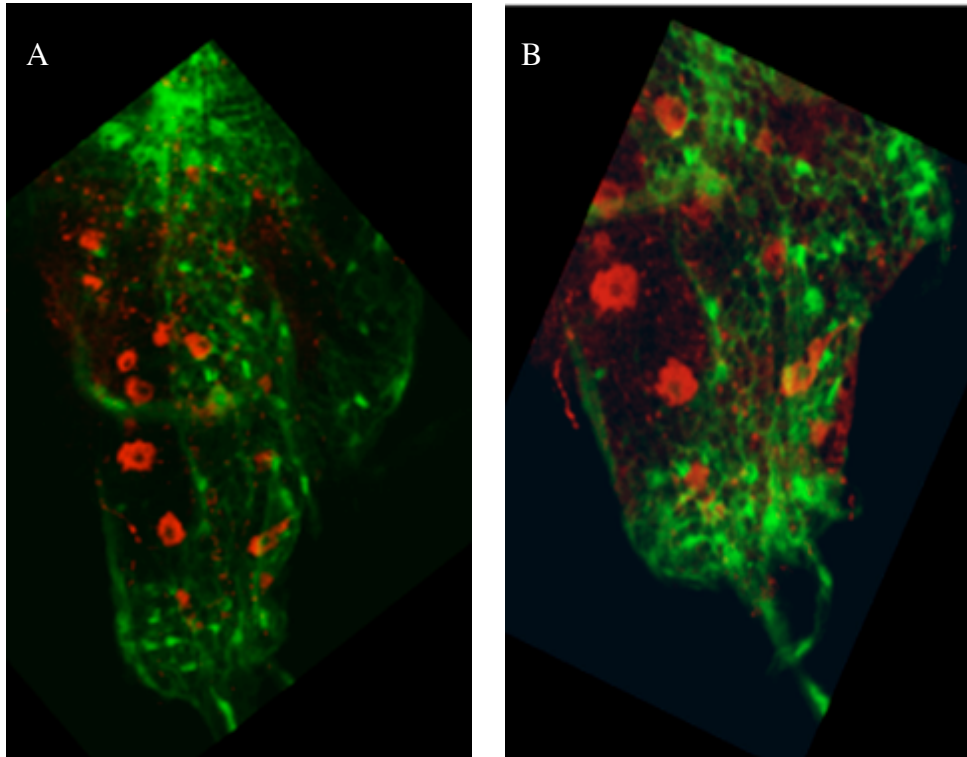


Figura 45.- Parte posterior del ganglio torácico abdominal de moscas adultas GFP, 3A42. A- 20X B- 40 X Donde se muestra el sobrelape de bursicon (rojo) y la GFP (verde).

Actividad de la red neuronal en el desarrollo (GAL80):

Ahora la pregunta es ¿en que momento del desarrollo es necesaria la actividad de esta red neuronal para que las estructuras de la pata y el ala se desarrollen correctamente? Para contestar esto use una línea transgénica de moscas que lleva en un transposón a la proteína GAL80 termosensible.

Esquema de cruce:

Sp / Cyo ; 3A42 / MKRS	X	+ / + ; GAL80/GAL80
------------------------	---	---------------------

Progenie:

Sp / + ; 3A42 / GAL80	Sp / + ; MKRS / GAL80
Cyo / + ; 3A42 / GAL80	Cyo / + ; MKRS / GAL80

Esquema de cruce:

TeTxLC / TeTxLC;MKRS / Tm2	X	Cyo / + ; MKRS / GAL80
----------------------------	---	------------------------

Progenie:

TeTxLC/+;GAL80/Tm2	TeTxLC/+;GAL80/MKRS	TeTxLC/+;MKRS/Tm2	TeTxLC/+;MKRS/MKRS letal
TeTxLC/Cyo;GAL80/Tm2	TeTxLC/Cyo;GAL80/MKRS	TeTxLC/Cyo;MKRS/Tm2	TeTxLC/Cyo;MKRS/MKRS letal

Esquema de cruce:

TeTxLC/Cyo;GAL80/Tm2	X	Sp / Cyo ; 3A42 / MKRS
----------------------	---	------------------------

Progenie:

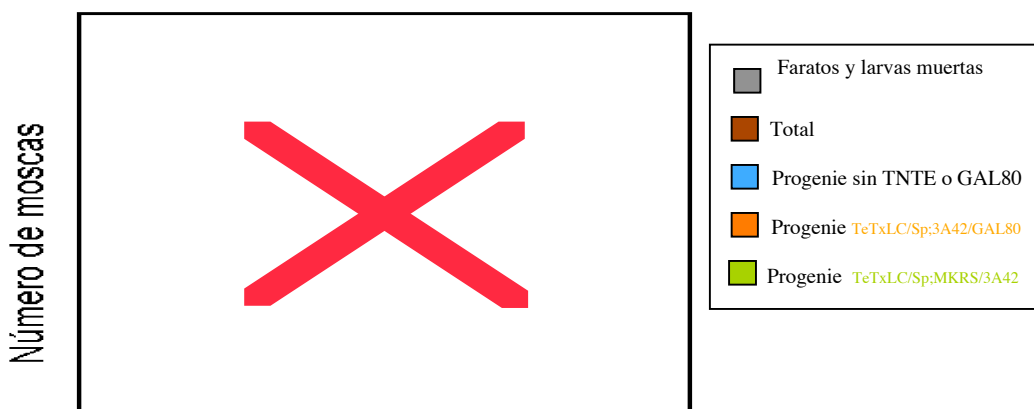
TeTxLC/Cyo; 3A42/GAL80	TeTxLC/Cyo;MKRS/GAL80	TeTxLC/Cyo;MKRS/3A42	TeTxLC/Cyo;MKRS/MKRS Letal
TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80	TeTxLC/Sp;MKRS/GAL80	TeTxLC/Sp;MKRS/3A42	TeTxLC/Sp;MKRS/MKRS Letal
Cyo/Sp;3A42/GAL80	Cyo/Sp;MKRS/GAL80	Cyo/Sp;MKRS/3A42	Cyo/Sp;MKRS/MKRS Letal

La primera cruce la mantuve a la temperatura permisible de 25°C, y cuando nació la progenie la cambie a 18°C durante tres días antes de llevar a cabo la segunda cruce. De forma importante en la segunda cruce solo usé hembras con el genotipo TeTxLC/Cyo;GAL80/Tm2 para que GAL80 estuviera siempre presente por herencia materna, y reprimiera la expresión de la toxina desde el principio.

Resultados GAL80:

* Moscas que crecieron toda su vida a la temperatura no permisiva de 30°C, N= 6 cruces independientes:

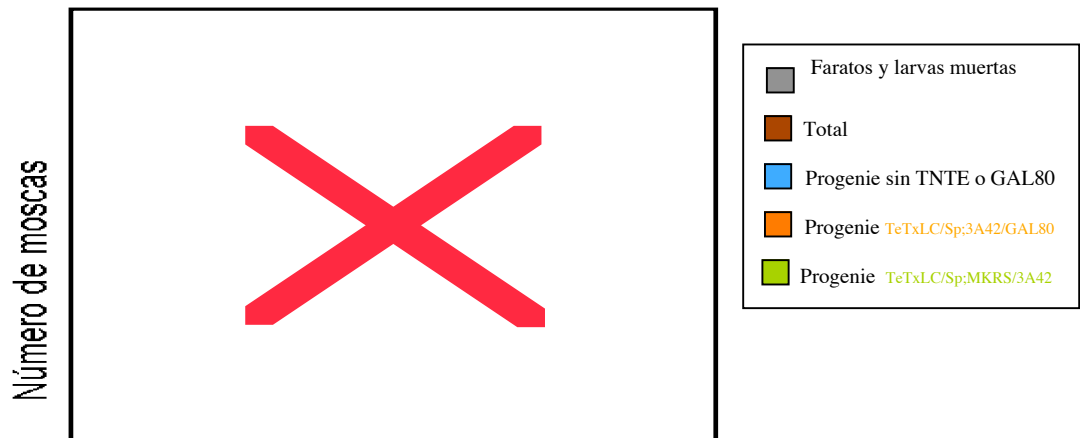
Adultos	Adultos	Faratos	Larvas muertas
TeTxLC/Cyo; 3A42/GAL80 TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80	TeTxLC/Cyo;MKRS/GAL80 TeTxLC/Sp;MKRS/GAL80 Cyo/Sp;MKRS/GAL80 Cyo/Sp;MKRS/3A42 Cyo/Sp;3A42/GAL80		
13	126	172	2



A esta temperatura hubo mucha letalidad, cerca de un 50% de la progenie no pudo eclosionar, quedando en diferentes momentos del desarrollo como faratos y casi no hubo letalidad en larvas. Las moscas TNTE/Sp;3A42/GAL80 no extendieron las alas y presentaron la curvatura en el fémur y en la tibia. Como control en todos los experimentos GAL80 conte a las progenie TeTxLC/3A42 (en verde) para corroborar que la toxina estuviera inactivando a las neuronas marcadas por la inserción 3A42.

* Moscas que crecieron a 18°C y en larva de tercer instar se cambiaron a la temperatura no permisiva de 30°C, N=6 cruces independientes:

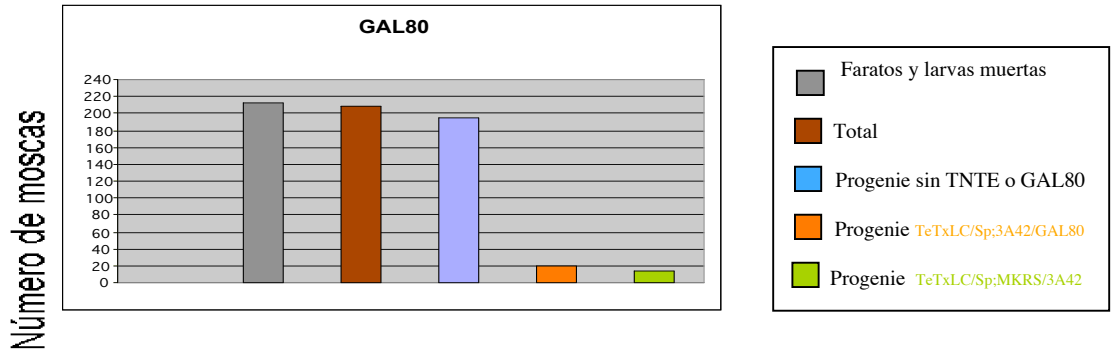
Tabla 5.- Moscas GAL80/3A42 crecidas hasta larva de tercer instar a 18 °C y después a 30°C			
Adultos	Adultos	Faratos	Larvas muertas
TeTxLC/Cyo; 3A42/GAL80 TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80	TeTxLC/Cyo;MKRS/GAL80 TeTxLC/Sp;MKRS/GAL80 Cyo/Sp;MKRS/GAL80 Cyo/Sp;MKRS/3A42 Cyo/Sp;3A42/GAL80		
25	201	210	6



A esta temperatura también hubo letalidad, en este momento del desarrollo, pero a diferencia de la anterior, había más larvas muertas y faratos sin poder eclosionar. Las moscas TNTE/Sp; 3A42/GAL80 si extendieron las alas y presentaban una pequeña curvatura en el fémur pero no en la tibia.

* Moscas que crecieron a 18°C y en pupas a punto de eclosionar (8 días) se cambiaron a la temperatura no permisiva de 30°C, N= 6 cruza independientes:

Tabla 6.- Moscas GAL80/3A42 crecidas hasta pupas a punto de eclosionar (8 días) a 18 °C y después a 30°C			
Adultos	Adultos	Faratos	Larvas muertas
TeTxLC/Cyo; 3A42/GAL80 TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80	TeTxLC/Cyo;MKRS/GAL80 TeTxLC/Sp;MKRS/GAL80 Cyo/Sp;MKRS/GAL80 Cyo/Sp;MKRS/3A42 Cyo/Sp;3A42/GAL80		
19	209	213	0

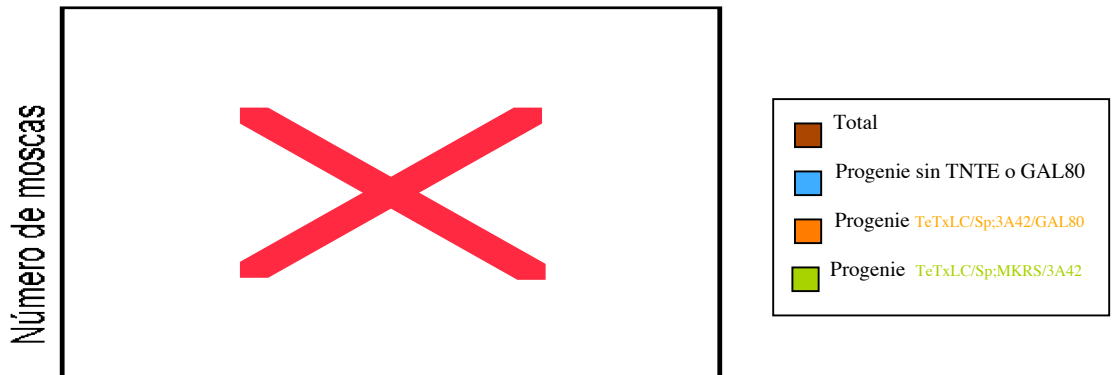


Esta temperatura en este momento del desarrollo también causó letalidad; poco menos del 50% de la población se queda como farato sin poder eclosionar. Estas moscas TNTE/Sp; 3A42/GAL80 extienden las alas de una manera anormal, con algunos defectos en el despliegue total del ala y algunas presentan un ligero defecto en la forma del fémur, pero no de la tibia.

* Moscas a 18°C toda su vida N= 6 cruzas independientes:

Tabla 7.- Moscas GAL80/3A42 que crecieron toda su vida a 18 °C

Adultos	Adultos	Faratos	Larvas muertas
<i>TeTxLC/Cyo; 3A42/GAL80</i> <i>TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80</i>	<i>TeTxLC/Cyo;MKRS/GAL80</i> <i>TeTxLC/Sp;MKRS/GAL80</i> <i>Cyo/Sp;MKRS/GAL80</i> <i>Cyo/Sp;MKRS/3A42</i> <i>Cyo/Sp;3A42/GAL80</i>	0	0
36	288	0	0



A 18°C no hubo letalidad en faratos ni en larvas, además las moscas no presentaron ninguna atrofia en la pata y extienden correctamente sus alas, también presentan una movilidad normal.

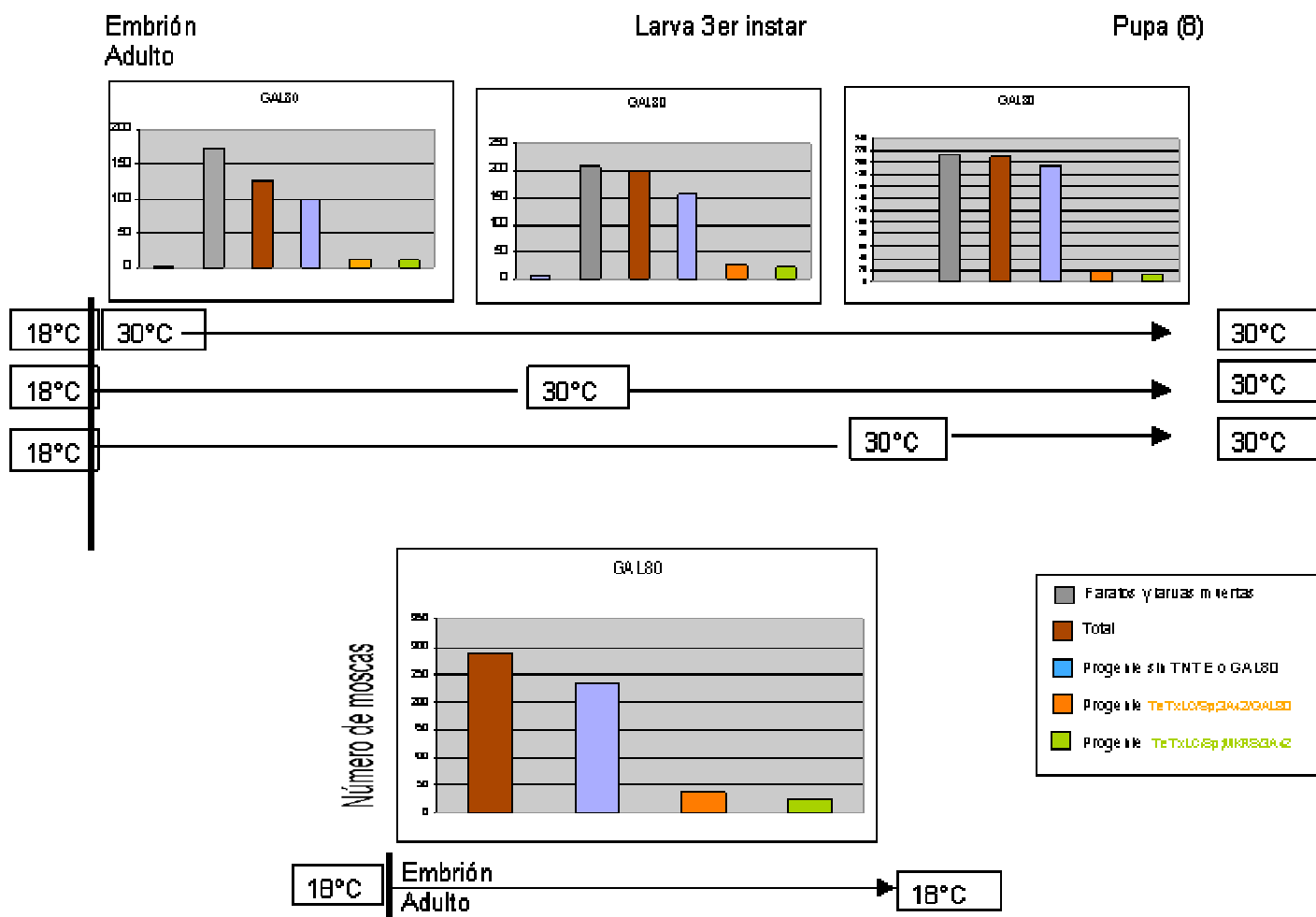


Figura 43.- Resumen de la actividad de la red neuronal durante el desarrollo, inactivando a la proteína GAL80 (18°C-30°C) para modular la transcripción de la toxina de tétanos en la línea 3A42.

Para determinar si éstas moscas eran fértiles seguí el siguiente esquema de cruza con machos white para evaluarlo.

Esquema de cruz:

Hembra (1) TNTE/Sp;3A42/GAL80	X	Machos (3) White
----------------------------------	---	---------------------

Tabla 8.- Fertilidad de las hembras TeTxLC;3A42/GAL80			
Esquema de cruce	Progenie Total	Machos	Hembras
Hembra (1) TNTE/Sp;3A42/GAL80 × Machos (3) White	70	33	37
Control Hembra (1) Sp/Cyo:3A42/MKRS × Machos (3) White	74	38	36

No hubo ningún defecto aparente en la fertilidad en moscas TeTxLC;3A42/GAL80 que crecieron toda su vida a 18°C con respecto a moscas Cyo/Sp;3A42/MKRS.

Para contestar si la actividad de la red es necesaria únicamente en el desarrollo y cual sería su papel en un individuo totalmente desarrollado usé moscas TNTE/Sp; 3A42/GAL80 que estuvieron a 18°C toda su vida y que al eclosionar se cambiaron a la temperatura no permisiva de 30°C. Estas moscas no dejaron en ningún momento de mover las alas y las patas normalmente y no presentaron ninguna atrofia en su movilidad.

Discusión:

La red neuronal que atrapamos con la inserción de un elemento-P en la línea 3A42 está involucrada en el desarrollo de la pata y la extensión del ala en *Drosophila*. Al inactivarla durante el desarrollo podemos observar gradualmente su papel en la correcta formación de la pata y la extensión del ala.

Caracterización fenotípica:

Al inactivar la red con la TeTxLC en la línea 3A42 no se observa un fenotipo aparente en la larva, pero sí en el adulto. Las moscas TeTxLC;3A42 presentaron una curvatura pronunciada en la tibia y el fémur del tercer par de patas. A pesar del defecto no hay una diferencia de tamaño con respecto a la pata de una mosca silvestre, lo que indica que no hay atrofia en la extremidad.

La inserción 3A42 atrapó algunas neuronas en el disco imagal de pata. Cuando se inactivaron con la toxina de tétanos se afectó la formación de la futura pata

El otro defecto en estas moscas es que no fueron capaces de extender sus alas después de la eclosión.

También presentaron un defecto motor evidente; ya que eran capaces de mantener el equilibrio al caminar y caían de espaldas; y no eran capaces de reincorporarse con la misma velocidad de una mosca silvestre.

Letalidad:

Al cruzar a la línea 3A42 con la toxina observamos que del total de la progenie, solo nació un 10% de un 42% esperado con el genotipo TeTxLC; 3A42. La letalidad de las moscas TeTxLC; 3A42 quizá se debe a que no son capaces de salir de la pupa debido al defecto en las patas, ya que siempre se observan individuos muertos atrapados en la pupa a punto de eclosionar. En las moscas TeTxLC;3A42 existe una mayor letalidad en los machos que en las hembras ya que nace una proporción de 70% hembras y 30% de machos cuando el esperado es 50 % respectivamente.

Fertilidad:

Con respecto a la fertilidad encontré que en las hembras TeTxLC; 3A42 no hay un decremento en la fertilidad con respecto a moscas control. Sin embargo, sí encontré una marcada disminución en la fertilidad de los machos TeTxLC; 3A42. Además de forma notable, menos de la mitad de los machos tuvieron progenie; y la otra mitad que sí tuvo progenie, nació un 60 % menos del esperado.

Debido a que algunas de las neuronas atrapadas en esta línea inervan el disco genital en la larva, es posible que se esté afectando el desarrollo de las estructuras reproductivas en el macho adulto, causando la infertilidad en algunos de éstos individuos.

Visualización de la red neuronal con la GFP:

En larva observé una red neuronal discreta con 10 pares de neuronas en la línea media del GTA, algunas neuronas en la parte más posterior y en la parte lateral del GTA, y una red más compleja en los lóbulos del cerebro. No encontré diferencias significativas en el patrón de expresión de la GFP entre machos y hembras, por lo que en este momento del desarrollo no es posible determinar la causa de la infertilidad y la letalidad en los machos adultos.

La red neuronal atrapada en la línea 3A42 se remodela durante la metamorfosis para dar el patrón definitivo en el adulto. En la mosca adulta el patrón de expresión de la GFP es similar entre machos y hembras. Se pueden ver neuronas en la médula y lámina del lóbulo óptico, que están conectadas entre sí. También observé neuronas en la parte más externa del lóbulo del cerebro y neuronas en el ganglio torácico abdominal, en especial en los segmentos T2 y T3.

También encontré expresión de la GFP en el fémur, la tibia, el metatarso y los segmentos del tarso del tercer par de patas.

Por otra parte, en el ala se distingue una neurona debajo de cada pelo a lo largo de la vena L1 que expresa la GFP. Existe también una inervación en la parte media del ala y la GFP solo se expresa en la parte ventral y no en la dorsal.

Identidad química de las neuronas involucradas en la red 3A42:

Usando anticuerpos contra la subunidad β -bursicon, identifiqué a la mayoría de las neuronas que estimulan directamente al grupo de 14 neuronas que secretan la hormona bursicon, localizadas en la parte más anterior del ganglio torácico abdominal.

Además se observa que 4 de las 14 neuronas secretoras de esta hormona, fueron atrapadas en nuestra línea. A pesar de no ver la expresión de la GFP en todas las neuronas secretoras de la hormona, el inactivar estas cuatro, es suficiente para reproducir un fenotipo igual al de mutantes nulas en bursicon o en su receptor ricket.

El sitio de la inserción del elemento-P se encuentra a 280 kilobases aproximadamente del gen *bursicon*, lo que permite sugerir que en la línea 3A42 se atrapó parcialmente las secuencias regulatorias de este gen.

Actividad de la red neuronal durante el desarrollo (GAL80):

Para todos los experimentos GAL80 utilicé el siguiente esquema de cruce: TeTxLC/Cyo; GAL80/MKRS X Sp/Cyo; 3A42.

Siguiendo el esquema de cruce anterior, obtuve progenie que permití crecer a la temperatura no permisiva de 30°C, la cual tuvo una letalidad del 57.7%, y particularmente las moscas TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80 no extendieron sus alas y presentaron el defecto típico en las patas.

A esta temperatura GAL80 no es funcionalmente activa, por lo que puede compararse con tener moscas con la inserción y la toxina sin GAL80. Por esta razón, la progenie que heredó los tres elementos no fue capaz de extender sus alas y presentó la curvatura en las patas. El

incremento en la letalidad es debido, en parte, a la temperatura, pues el mismo porcentaje de moscas control de ésta línea mueren a 30° C, además cuando reduje el tiempo de exposición a 30° C, disminuyo el porcentaje de letalidad consecuentemente.

Usando el mismo esquema de cruza, obtuve progenie que creció a 18°C hasta larva de tercer instar y después la cambie a 30°C, presentando una letalidad del 51%, específicamente algunas de las moscas TeTxLC/Sp;3A42/GAL80 extendieron sus alas, pero no completamente y presentaron un defecto mucho menos marcado en las patas.

En éste caso, permitimos una actividad neuronal normal con GAL80, hasta el estadio de larva de tercer instar, y en ese momento apagamos la red neuronal al transferir las moscas a la temperatura no permisiva de 30° C. Esto causó que la mayoría de las moscas adultas extendieran sus alas, aunque no de forma normal, y que presentaran un defecto mucho menor en la pata y únicamente en el fémur.

El que no se rescate completamente el fenotipo se debe posiblemente a que la inserción no atrapó a todas las neuronas bursicon positivas y, durante el desarrollo el proceso de secreción de bursicon se pueda compensar de alguna manera.

En el mismo esquema de cruza, permití a la progenie crecer a 18°C hasta pupas de 8 días (1 día antes de eclosionar) y en ese momento las pase a la temperatura no permisiva de 30°C, aquí las moscas presentaron una letalidad del 46.5%, y en particular las moscas TeTxLC/Sp; 3A42/GAL80 extendieron sus alas parcialmente y presentaron un defecto muy ligero en el fémur, y la tibia era completamente normal.

En esta cruza, la actividad de la red neuronal se mantuvo activa durante todo el desarrollo de la mosca, y poco antes de eclosionar la inactivamos. Esto tiene como consecuencia que las alas se extiendan de forma casi normal, y que la pata presente solo una muy pequeña curva en la parte más dorsal del fémur.

Mientras mas tiempo permanece activa la red neuronal durante el desarrollo, menos marcado es el defecto en la pata, lo cual indica que se trata de un problema ontológico.

Finalmente con el mismo esquema de cruza, obtuve progenie que creció toda su vida a 18°C y como consecuencia, no hubo letalidad ni en larvas ni en faratos, y no presentaron ningún defecto en las alas ni en las patas.

Esto indica que la proteína GAL80, al evitar la transcripción de la TeTxLC, permite que las neuronas de la red 3A42 lleven a cabo sus funciones químicas normalmente durante el desarrollo de la mosca, lo que conduce, entre otras cosas, a una liberación normal de bursicon, permitiendo así la completa extensión del ala y de la pata.

Los datos sugieren que se trata de un defecto en la secreción de la hormona bursicon, que es responsable de la extensión de la pata y el ala en la mosca, ya que al inactivar la red en diferentes momentos del desarrollo observamos gradualmente la aparición de estos defectos. Es necesaria la actividad del grupo de neuronas atrapado en la línea 3A42, al

menos durante el desarrollo larvario, para que la estructura de la pata se forme correctamente y pueda extender sus alas completamente.

En el adulto, el inactivar ésta red neuronal con la toxina de tétanos no causa ningún fenotipo aparente.

Esto indica que la actividad de la red neuronal 3A42 es necesaria únicamente durante el desarrollo, ya que inactivarla después de eclosionar no causa ningún defecto en el adulto. Esto correlaciona con la idea de que estamos afectando en algún nivel, la secreción de bursicon, la cual es una hormona importante solo para los eventos de pupación y eclosión en la mosca.

Conclusiones:

-Identifique un conjunto de neuronas importantes para la extensión del ala y la pata en *Drosophila melanogaster* en la línea 3A42.

-Al inactivar ésta red neuronal con la toxina de tétanos en moscas que llevan la inserción, causa un defecto en la forma del tercer par de patas (fémur y tibia) y en la extensión de las alas.

-La inactivación de ésta red con la toxina causa una letalidad del 75 % y probablemente se deba a los defectos en las patas y problemas motrices favoreciendo que las moscas queden atrapadas en la pupa.

-Concluimos que las hembras TeTxLC; 3A42 son igual de fértiles que las moscas de la línea 3A42 sin toxina; sin embargo la fertilidad en los machos TeTxLC; 3A42 se ve disminuida, en la mayoría de los individuos a la mitad, mientras que en otros machos es nula.

-Los machos TeTxLC; 3A42 viven en promedio 10 días, mucho menos que un macho normal que vive aproximadamente 50 días; las hembras viven normalmente.

-Identifiqué a la red neuronal completa y sus proyecciones nerviosas con la GFP en filetes de larvas de tercer instar; éstas inervan al disco genital y están presentes en los discos imagales de ala y pata.

-Identifiqué las características morfológicas de la red neuronal en cerebros adultos, pupas y las estructuras adultas del ala y la pata con la GFP.

-La inserción posiblemente atrapó secuencias regulatorias del gen bursicon, ya que algunas neuronas bursicon positivas coexpresan el gen reportero GFP.

-Los datos de GAL80 sugieren fuertemente que es necesaria la actividad de esta red neuronal a lo largo del desarrollo, ya que posiblemente se atrapó a la mayoría de las neuronas que estimulan al grupo de 14 células neuronales especializadas en la secreción de bursicon, y como consecuencia el ala y la pata no se extienden en estas moscas.

Perspectivas:

Inyectar hemolinfa de moscas silvestres (que lleve la hormona bursicon) en el ala de moscas TeTxLC; 3A42 recién nacidas y observar si esto rescata el fenotipo del ala.

Inyectar hemolinfa en larvas de tercer instar y ver si se rescata el fenotipo de la pata.

Inyectar el anticuerpo contra bursicon en moscas 3A42 y ver si éstas son incapaces de extender el ala de forma similar a moscas TeTxLC; 3A42.

Buscar los sitios de inervación de la genitalia en machos TeTxLC/GFP; 3A42/+ y ver si existe alguna anomalía lo que este causando la infertilidad de estas moscas.

Medir los niveles de bursicon en la hemolinfa de moscas recién nacidas TeTxLC;3A42.

Materiales y Métodos:

Medios de cultivo:

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

Esquemas de cruzas:

Se cruzó a línea 3A42 con la línea de moscas que expresa la cadena ligera de la Toxina de tétanos (TeTxLC) bajo el promotor UAS. Con esto observamos el fenotipo causado por la inserción, y lo seguiremos a lo largo del tiempo.

Esquema de cruzas	Progenie seleccionada	Fenotipo
Sp/Cyo: 3A42/MKRS X	TeTxLC/TeTxLC ; +/- y TeTxLC/Sp ; 3A42/+	Defectos en pata y ala

Para la caracterización celular usamos a la proteína verde fluorescente (GFP) como proteína reportera (Yeh et al., 1995. Chalfie M. et al. 1994.). Esto con el fin de seguir el red neuronal a nivel histológico con microscopia confocal y de fluorescencia (Sun Banhua. et al., 1999). Además se utilizó la fusión de la GFP: mCD8-GFP que marca principalmente membranas (Lee and Luo. 1999).

Esquema de cruzas GFP:

Esquema de cruzas	Progenie seleccionada	Fenotipo
Sp / Cyo ; 3A42 / Tm2 X UAS-GFP/UAS-GFP ; +/-	GFP/Sp ; 3A42/+	Fluorescentes (Toda la célula)
Sp / Cyo ; 3A42 / Tm2 X MCD8-GFP/MCD8-GFP ; +/-	MCD8-GFP/Sp ; 3A42/+	Fluorescentes (Membranas de neuronas)

Esquema de cruzas GAL80 a 18°C:

Esquema de cruzas	Progenie seleccionada	Fenotipo	
		18°C	30°C
Sp / Cyo ; 3A42/ MKRS X GAL80 / GAL80; +/-	Cyo +/- ; GAL80 /MKRS	Normales	
TeTxLC/TeTxLC ; MKRS/Tm2 X Cyo +/- ; GAL80 /MKRS	TeTxLC / Cyo ; GAL80 / Tm2	Normales	
TeTxLC / Cyo ; GAL80 / Tm2 X Sp/Cyo 3A42/Tm2	TeTxLC / Cyo ; 3A42/GAL80	Normales	Patás Chuecas

Se disectó el sistema nervioso central de larva y de adulto (ganglio torácico abdominal y lóbulos del cerebro) y se realizaron preparaciones temporales para microscopia. Las larvas y los adultos se separan por sexo para su análisis posterior y se preparan de la siguiente manera:

Protocolos de disección:

Larvas:

Se separaron por sexo y se lavaron 2 veces en PBS 1X
 Se disectó el ganglio torácico abdominal y los lóbulos del cerebro.
 Se fijó durante 20 min. en formaldehído al 4% en buffer fosfato.
 Se lavó Buffer de Fosfatos durante 20 min.
 Se colocó en un portaobjetos con citifluor como agente de montaje
 Las muestras se observaron al microscopio antes de 36 horas.

Filetes de Larvas

Se separaron por sexo y se lavaron 2 veces en PBS 1X
 Se fijó a la larva por la cabeza y la cola con fibra de vidrio a una placa de silicón.

Se cortó a la larva por la mitad y se removieron los órganos internos para dejar expuesto el sistema nervioso central y la musculatura.
Se fijó con fibra de vidrio en cuatro puntos, extendiendo a la larva todo lo posible.
Se fija durante 20 min. en formaldehído al 4% en PBS.
Se lavo PBS durante 20 min.

Adultos:

Se separaron por sexo
Se colocaron en un vidrio de reloj con PBS1X
Se disectó el ganglio torácico abdominal y los lóbulos del cerebro.
Se fijó durante 20 min en formaldehído al 4% en buffer fosfato.
Se lavó Buffer de Fosfatos durante 20 min.
Se colocó en un portaobjetos con citifluor como agente de montaje
Las muestras se observaron al microscopio antes de 36 horas.

Preparaciones con Faloidina Rodaminada (FR):

Se bloquearon las muestras con PBS Glicina 0.1M durante 5 min.
Se permeabilizaron con PBS Triton X-100 al 0.1% durante 1 min.
Se tiñeron en PBS FR (1:100) durante 30 min.
Se lavaron en PBS 3 veces durante 10 min.
Se colocaron los filetes en un portaobjetos con citifluor como agente de montaje

Tinción con Yoduro de Propidio:

Se trataron las muestras con RNAsa (10mg/ml) durante 2 horas.
Lavar la muestra 3 veces durante 5 min.
Incubar con Yoduro de Propidio/PBS (1:1000) durante 1 hora.
Lavar la muestra 3 veces durante 5 min.
Montar en un portaobjetos con citifluor.

Extracción de DNA genómico:

Triturar de 50-100 moscas en 2 ml de Douncing Buffer con un pistilo suavemente.
Filtrar el homogenizado a través de un poco de fibra de poliéster en una jeringa de 3ml.
Recolectar el filtrado en un eppendorf y centrifugar 1 min.
Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100µl de douncing buffer.
Agregar 300µl de Lisis buffer y mezclar suavemente.
Agregar 400µl de fenol, mezclar suavemente y centrifugar.
Agregar 400µl de fenol+400µl cloroformo mezclar y centrifugar (3X)
Agregar 400µl de cloroformo, mezclar y centrifugar
Precipitar con butanol si es un volumen grande
Precipitar con 1:10 volúmenes de Ac. de Na. 3M p.H. 5.2 + 2 volúmenes de Etanol 100% + 1 µl de glicógeno
Lavar con etanol 70% (2 veces)
Dejar secar 20 min temperatura ambiente y resuspender en 150 µl de H₂O.

Inmunocitoquímica:

Disecar el tejido en PBS
Fijar por 20 min en 4% paraformaldehído en buffer de fosfato 0.1M pH 7.4
Lavar 3 veces en buffer de fosfato por 15 min
Lavar 3 veces en TNT
Bloquear en TNT con 4% de suero de chivo por 4 horas.
Agregar anticuerpo en solución bloqueadora e incubar toda la noche a 4 °C
Lavar 6 veces en TNT con suero por 15 min
Incubar con el anticuerpo secundario por 2 horas a 25°C

Lavar 6 veces en TNT con suero por 15 min
Montar en portaobjetos con citifluor

Soluciones Stock:

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

PBS:

8 gr NaCl
.0.2 gr KCl
1.44 gr Na₂HPO₄
0.24 gr Kh₂PO₄
Ajustar pH a 7.4
Aforar a 1 litro
Autoclavear

TNT:

0.1M Tris-HCl 10ml Tris 1 M
0.3M NaCl 6ml NaCl 5M
0.5% Triton X100 0.5 ml Triton X100
Aforar a 100 ml

Buffer fosfato:

0.1 M Na₂ HPO₄
pH 7.4 (titular con HCl)
Filtrar (filtro de 0.22 micras)
Aforar a 100 ml

Oligos utilizados para hacer el PCR reverso:

Amp 5' Fw CAATCGCCGTGAAGACCCAGTG.
Amp 5' Rv CTCCAGTCACAGCTTTGCAGC.
Amp 3' Fw CAATCATATCGCTGTCTCACTC.
Amp 3' Rv CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT.

Se purificó la banda obtenida mediante un kit de Gene Clean marca Qiagen. Ésta se mando a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con los siguientes oligos:

Sec 5' FW GCCCAGAAAGTATGTGTCAC.
Sec 5' Rv CACAACCTTTCCTCTCAACAA.
Sec 3' Fw GACACTCAGAATACTATTC.
Sec 3' Rv CGTGGGGTTTGAATT AACTC.

Programa de PCR reverso:

94 * 3 min.
94 * 30 seg. ←
58 * 1 min. — 25 ciclos
72 * 1.5 min. —
72 * 10 min.
4 *

Se hizo un BLAST con los resultados de la secuencia obtenida.

<http://flybase.net/blast/>

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

ZincFw AATTCGAATGTGTGGAGGGCA.
Zinc Rv CTAATGCGTTTCAGACTC.

Referencias:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. (1997)

Bailey CH, Kandel ER, Si K.

The persistence of long-term memory; a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth.

Neuron. 2004 Sep 30;44(1):49-57

Baker JD, McNabb SL, Truman JW.

The hormonal coordination of behavior and physiology at adult ecdysis in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* 1999 Nov;202(Pt 21):3037-48.

Baker JD, Truman JW.

Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *J Exp Biol.* 2002 Sep;205(Pt 17):2555-65

Bate M.

The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development.* 1990 Nov;110(3):791-804.

Bate, Michael and Martínez Arias, Alfonso.

The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1993)

Bate CM, Martínez-Arias A.

The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* 1991;112:755–761.

Borycz, J.A. Borycz, A. Kubo, A. Kostyleva, R and Meinertzhagen, I.A.

Histamine Compartments of the *Drosophila* Brain With an Estimate of the Quantum Content at the Photoreceptor Synapse *J Neurophysiol* 93: 1611–1619, 2005;

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002)

Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition, New York: Garland Publishing. pp 1097.

Bossing T, Udolph G, Doe CO, Technau GM.

The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol.* 1996 Oct 10;179(1):41-64.

Brand AH, Perrimon N.

Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun;118(2):401-15.

Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G.M., and Doe, C. Q. (1995). New neuroblast markers and the origin of e aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech. Dev.* 53, 393–402

Brook WJ, Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM.

Organizing spatial pattern in limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:161-80. Review.

Butner KA, Kirschner MW.

Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol.* 1991 Nov;115(3):717-30.

Chalfie M.

Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol.* 1995 Oct;62(4):651-6. Review.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC.

Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* (1994) Feb 11;263(5148):802-5.

Cohen, S. M. (1993)

Imaginal disc development. In *Drosophila Development*, A. Martinez-Arias and M. Bate, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press), pp. 747-841.

Cohen, S. M. (1996)

Controlling growth of the wing: vestigial integrates signals from the compartments boundaries. *Bio Essays.* 18, 855-858

Demerec, M.

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

Dewey EM, McNabb SL, Ewer J, Kuo GR, Takanishi CL, Truman JW, Honegger HW.

Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Curr Biol.* 2004 Jul 13;14(13):1208-13.

Doe, C. Q. (1992).

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

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

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

Ewer J.

Behavioral actions of neuropeptides in invertebrates: insights from *Drosophila*. *Horm Behav.* 2005 Nov;48(4):418-29. Epub 2005 Jul 5. Review

Fernandes J, Bate M, Vijayraghavan K.

Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development.* 1991 Sep;113(1):67-77.

Fernandez MS, Dennis JE, Drushel RF, Carrino DA, Kimata K, Yamagata M, Caplan AI.

The dynamics of compartmentalization of embryonic muscle by extracellular matrix molecules. *Dev Biol.* 1991 Sep;147(1):46-61

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

GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature.* 1988 Apr 28;332(6167):853-6.

Frye, Mark. A. and Dickinson Michael. H.

A signature of salience in the *Drosophila* brain. *Nature Neuroscience.* 2003 June 6 Vol (6) 544-546

Galindo MI, Bishop SA, Greig S, Couso JP.

Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science.* 2002 Jul 12;297(5579):256-9.

Giniger E, Varnum SM, Ptashne M.

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

Hartensen Volker

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

Hertweck, H.

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

Hiraizumi, Y.

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

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

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

Hua JY, Smith SJ.

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

Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G.

Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. Cell. 1998 Jan 23;92(2):205-15.

Klambt C, Goodman CS.

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

Lai-Fook J.

The structure of developing muscle insertions in insects. J Morphol. 1967 Dec;123(4):503-27

Laughon A, Gesteland RF.

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

Lee T, Luo L.

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

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

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

Luan H, Lemon WC, Peabody NC, Pohl JB, Zelensky PK, Wang D, Nitabach MN, Holmes TC, White BH.

Functional dissection of a neuronal network required for cuticle tanning and wing expansion in Drosophila. J Neurosci. Jan 11;26(2):573-84 (2006)

Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger HW, Hsueh AJ.

Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):2820-5. Epub 2005 Feb 9.

Manoli DS, Foss M, Vilella A, Taylor BJ, Hall JC, Baker BS.

Male-specific fruitless specifies the neural substrates of Drosophila courtship behaviour. Nature. 2005 Jul 21;436(7049):395-400 (2005).

Melcher K, Xu He.

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

Mendive FM, Van Loy T, Claeysen S, Poels J, Williamson M, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJ, Vassart G, Vanden Broeck J.

Drosophila molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. FEBS Lett. 2005 Apr 11;579(10):2171-6.

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

In vivo dynamics of axon pathfinding in the Drosophila CNS. A time lapse study of an identified motoneuron. J Neurobiol. 1998 Dec;37(4):607-21

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

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

O'Kane Cahir J. Ghering Walter J.

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

Park JH, Schroeder AJ, Helfrich-Forster C, Jackson FR, Ewer J

Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of Drosophila causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. Development. 2003 Jun;130(12):2645-56.

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

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

Postlethwait JH, Schneiderman HA.

Induction of metamorphosis by ecdysone analogues. Drosophila imaginal discs cultured in vivo. Biol Bull. 1970 Feb;138(1):47-55

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

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

Ptasne M.

How eucaryotic transcriptional activators work. Nature 335:683-689 (1988)

Rodriguez-Valentin R, Lopez-Gonzalez I, Jorquera R, Labarca P, Zurita M, Reynaud E.

Oviduct contraction in Drosophila is modulated by a neural network that is both, octopaminergic and glutamatergic. J Cell Physiol. 2006 Oct;209(1):183-98.

Romani S, Campuzano S, Macagno ER, Modolell J.

Expression of achaete and scute genes in Drosophila imaginal discs and their function in sensory organ development. Genes Dev. 1989 Jul;3(7):997-1007.

Ryner LC, Goodwin SF, Castrillon DH, Anand A, Vilella A, Baker BS, Hall JC, Taylor BJ, Wasserman SA.

Control of male sexual behavior and sexual orientation in Drosophila by the fruitless gene. Cell. 1996 Dec 13;87(6):1079-89.

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

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

Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS.

Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline. Neuron. 1993 Mar;10(3):409-26.

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

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

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

The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm.

Dev Biol. 1997 Sep 15;189(2):186-204.

Sharma Yashoda, Cheung Una, Larsen EllenW, Eberl DanielF.

pPTGAL, a Convenient Gal4 P-Element Vector for Testing Expression of Enhancer Fragments in *Drosophila*.

Genesis 34:115-118(2002)

Soler C, Daczewska M, Da Ponte JP, Dastugue B, Jagla K.

Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development.* 2004 Dec;131(24):6041-51. Epub 2004 Nov 10

Sun Banghua, Xu Peizhang, Salvaeterra Paul M.

Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 10438-10443, August 1999

Sullivan William, Ashburner Michael, Hawley Scott R.

Drosophila Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000 N.Y.

Suster Maximiliano L, Seugnet, Laurent, Bate, Michael, Sokolowski, Maria B.

Refining GAL4-Driven Transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 Enhancer-Trap.

Genesis 39:240-245 (2004)

Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ.

Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron.* 1995 Feb;14(2):341-51

Taylor BJ, Truman JW.

Commitment of abdominal neuroblasts in *Drosophila* to a male or female fate is dependent on genes of the sex-determining hierarchy. *Development.* 1992 Mar;114(3):625-42.

Truman JW, Bate M.

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

Tsubota Stuart and Dang-Vu Huong

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

Verderio C, Coco S, Bacci A, Rossetto O, De Camilli P, Montecucco C, Matteoli M.

Tetanus toxin blocks the exocytosis of synaptic vesicles clustered at synapses but not of synaptic vesicles in isolated axons.

Witte, I. Kreienkamp, H.J. Gewecke, M and Roeder, T.

Putative histamine-gated chloride channel subunits of the insect visual system and thoracic ganglion. *Journal of Neurochemistry.* 2002, 83, 504-514

Yeh Edward, Gustafson Kerstin, Boulianne Gabrielle.

Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 92, pp 7036-7040, July 1995