



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

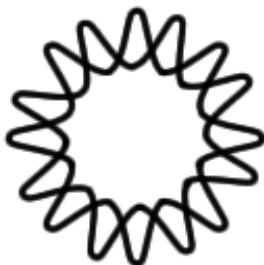
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Establecimiento de la línea de moscas transgénicas
UAS-Shal371D para evaluar el papel de los canales
Shal residentes del cuerpo fungiforme.**

T E S I S
Que para obtener el grado académico de :
Maestro en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t a :
Cortés Mendoza César Javier

Asesor de Tesis :
Dr. Ignacio López González



Cuernavaca, Morelos.
Junio, 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

A mi Mamá, **Cirenia** ...

A mi Hermana, **Erika** ...

Dr. Ignacio López González.

Dr. Enrique Reynaud Garza.

M.B. René Hernández Vargas.

Al Comité Tutorial:

Dr. Alberto Darszon.

Dr. Carlos M. Garay.

Jurado de Examen:

Dra. Martha V. Vázquez Laslop.

Dra. Viviana Valadez Graham.

Dr. Juan José Acevedo Fernández.

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del

Dr. Ignacio López González.

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular.

Instituto de Biotecnología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Cuernavaca, Morelos.

El presente trabajo contó con los apoyos de:

CONACyT donativo No. **84362**.

DGAPA-UNAM donativo No. **IN216507** y No. **IN217110**.

Cortés Mendoza Cesar Javier fue becario **CONACyT** No. **210413**.

Lista de Abreviaturas.

N	Amino
Asp/D	Aspartato
K_v	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
C	Carboxilo
CK	Células de Kenyon
[K⁺]_{ext}	Concentración de K ⁺ externa
[K⁺]_{int}	Concentración de K ⁺ interna
mESPC	Corrientes espontáneas excitatorias miniatura postsinápticas
I_k	Corriente de K ⁺
I_A	Corriente de K ⁺ transitoria o tipo A dependientes de voltaje
I_R	Corriente de K ⁺ rectificadora tardía o sostenida dependiente de voltaje
CF	Cuerpo fungiforme
T1	Dominio de tetramerización
D.	<i>Drosophila</i>
AHP	Fase de hiperpolarización
Hk	Gen <i>Hyperkinetic</i>
Sh	Gen <i>Shaker</i>
Leu/L	Leucina
miRNA	microRNA
ms	Milisegundos
mV	Milivolts
DB	Moscas <i>D. melanogaster</i> doble "balancer"
NRO	Neuronas receptoras olfativas
NIG-FLY	"National Institute of Genetics" de Japón
nt	Nucleótidos
PA	Potencial (es) de acción
LTP	Potenciación de largo plazo
E_m	Potencial de membrana
V_{rest}	Potencial de reposo
RNP	Ribonucleoproteica (co)
RISC	"RNA-induced silencing complex"
RITS	"RNA-induced transcriptional silencing complex"
RNAi	RNA interferente
siRNA	RNA interferente pequeño
dsRNA	RNA de doble cadena
S	Segmento transmembranal
wt	Silvestre (s)
UAS	"Upstream Activation Sequence"
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
K_vα	Subunidad α formadora de poro de los canales K _v
K_vβ	Subunidad auxiliar β de los canales K _v
V_{threst}	Umbral de activación
Val/V	Valina
VDRC	"Vienna <i>D. melanogaster</i> RNAi Center"
V_{50 act}	Voltaje medio de activación
V_{50 Inact}	Voltaje medio de inactivación
X.	<i>Xenopus</i>

Índice General.

Página

Índice General.	V
Índice de Figuras.	VII
Índice de Tablas.	VIII
Índice de Esquemas.	IX
Resumen.	X
1. Introducción.	1
1.1 Los canales de K_V y su participación en la modulación del PA.	1
1.2 Definición de los canales K_V y la descripción de las subfamilias.	2
1.2.1 La participación del dominio T1 para la tetramerización de las $K_{V\alpha}$.	4
1.2.2 La especificidad de los canales K_V por K^+ está dada por el filtro de selectividad.	5
1.2.3 Los mecanismos de inactivación de los canales K_V .	5
1.2.4 Subunidades auxiliares de los canales K_V .	6
1.3 Los K_V y la memoria olfativa en <i>D. melanogaster</i> .	7
1.4 La subfamilia $Shal$, la I_A y la potenciación de largo plazo.	10
1.5 Los receptores NMDA en la consolidación de la memoria en <i>D. melanogaster</i> .	13
1.6 Silenciamiento de genes mediante dsRNA.	15
1.6.1 La etapa de iniciación, generación de los RNA guías.	16
1.6.2 La etapa efectora, la especificidad del silenciamiento de genes.	17
1.7 La subfamilia $Shab$ y el control dinámico de la excitabilidad neuronal.	19
2. Antecedentes.	20
2.1 Generación de la $K_{V\alpha}$ $ShalL371D$ como potencial dominante negativa.	20
3. Hipótesis.	23
4. Objetivos.	24
4.1 Objetivo General.	24
4.2. Objetivos Específicos.	24
5. Metodología.	26
5.1 Expresión heteróloga de las $K_{V\alpha}$ $Shal$ wt y $ShalL371D$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	26
5.1.1 Transcripción <i>in vitro</i> de las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$.	26
5.1.2 Obtención de ovocitos de <i>X. laevis</i> .	26
5.1.3 Expresión de las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$.	27
5.1.4 Registros de las I_A generadas por las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$.	28
5.1.5 Análisis de las propiedades biofísicas de las I_A generadas por las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$.	28
5.1.6 Porcentaje de I_A inhibida por la coexpresión de las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$.	30
5.1.7 Análisis estadístico de los parámetros biofísicos.	30
5.1.8 La probabilidad binomial de la coexpresión de las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$.	30
5.1.8.1 La probabilidad binomial acumulada para la $K_{V\alpha}$ $ShalL371D$.	32
5.2 "Stock" y líneas de <i>D. melanogaster</i> transgénicas.	33
5.3 Mantenimiento, balanceo y cruza de las líneas de <i>D. melanogaster</i> .	35
5.3.1 Genotipificación con cromosomas balanceadores.	35
5.3.2 Balanceo de la línea <i>UAS-Shali</i> .	37
5.3.3 Establecimiento de la línea <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i> .	38
5.3.4 Establecimiento de las líneas con RNAi contra los mRNA de los canales $Shab$.	39
5.3.4.1 Balanceo y establecimiento de la línea <i>UAS-ShabiC2VT1</i> .	42
5.3.4.2 Balanceo y establecimiento de la línea <i>UAS-ShabiC3LT3</i> .	44
5.3.5 Expresión tejido-específica de las secuencias efectoras.	46
5.3.6 Cuantificación de la progenie de la F1 y normalización de los datos de viabilidad.	46
5.3.7 Análisis estadístico de los datos de viabilidad.	47
6. Resultados.	48
6.1 Expresión heteróloga de la $K_{V\alpha}$ dominante negativa $ShalL371D$.	48
6.1.1 Expresión de los canales $Shal$ wt y la caracterización de sus propiedades biofísicas.	48
6.1.2 Determinación de la selectividad por K^+ de los canales $Shal$ wt.	51
6.1.3 Efecto de la coexpresión de las $K_{V\alpha}$ wt y $ShalL371D$ sobre la densidad de la I_A .	52

	Página
6.1.4 Análisis de la activación e inactivación en estado estacionario de las I_A generadas por la coexpresión de las $K_{V\alpha}$ Shal wt y Shall371D.	56
6.2 Evaluación genética de la dominante negativa Shall371D en <i>D. melanogaster</i> .	58
6.2.1 Inducción ubicua de la expresión de la $K_{V\alpha}$ Shall371D en <i>D. melanogaster</i> .	59
6.2.2 Inhibición de los canales Shal en el SN de <i>D. melanogaster</i> .	63
6.2.3 Inhibición de los canales Shal endógenos de los músculos de <i>D. melanogaster</i> .	66
6.3 Establecimiento de la línea <i>UAS-Shall371D¹⁷</i> para evaluar la participación de los canales Shal en procesos cognitivos.	69
7. Discusión.	73
7.1 La falta de subunidades accesorias podría explicar las diferencias observadas en la cinética de la I_A .	73
7.1.1 El ión K^+ como acarreador de carga de la I_A .	74
7.1.2 La $K_{V\alpha}$ Shall371D actúa efectivamente como una nueva dominante negativa.	74
7.1.3 La dominante negativa Shall371D y sus efectos sobre la I_A wt residual	76
7.2 La inhibición de los canales Shal endógenos causa letalidad en <i>D. melanogaster</i> .	76
7.2.1 Inhibición ubicua de los canales Shal endógenos.	76
7.2.2 Inhibición de los canales Shal endógenos en neuronas.	77
7.2.3 Inhibición de los canales Shal endógenos en músculos.	78
7.2.4 La inducción de la expresión de la $K_{V\alpha}$ Shall371D en órganos de <i>D. melanogaster</i> que no expresan canales Shal endógenos.	79
7.3 Establecimiento de una línea experimental para evaluar la formación de la memoria olfativa en <i>D. melanogaster</i> .	79
8. Conclusiones.	82
9. Perspectivas.	83
10. Anexos.	85
10.1 Inducción de la inhibición ubicua de los canales Shal mediante el RNAi Shali.	85
10.2 Inducción de la expresión ubicua de los RNAi contra los mRNA de los canales Shab.	87
10.3 Inducción de la expresión del RNAi Shali en el SN de <i>D. melanogaster</i> .	93
10.4 Inhibición de los mRNA de los canales Shab en el SN de <i>D. melanogaster</i> .	95
10.5 Inducción de la expresión del RNAi Shali en los músculos de <i>D. melanogaster</i> .	97
10.6 Inducción de la expresión del RNAi Shabi en los músculos de <i>D. melanogaster</i> .	99
10.7 Inhibición de los mRNA de los canales Shal residentes del CF de <i>D. melanogaster</i> .	101
11. Referencias.	104

Índice de Figuras.

Figura		Página
1	Componentes y parámetros de un PA.	2
2	Estructura de la $K_{v\alpha}$ formadora de canales K_v .	3
3	I_k generadas por la expresión heteróloga de diferentes canales K_v .	4
4	Vista dorsal de la cabeza de <i>D. melanogaster</i> y de la vía olfativa.	10
5	La internalización de los canales $K_v4.2$ favorece el proceso de LTP.	12
6	Expresión dirigida en <i>D. melanogaster</i> mediante el sistema Gal4-UAS.	14
7	Silenciamiento de genes específicos mediante la formación del complejo RISC.	19
8	Las moscas mutantes Sh^{KS133} no presentan el componente transitorio de las I_k .	21
9	Familia de I_A codificadas por canales Shal expresados en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	49
10	La I_A originada por la expresión del canal Shal wt depende principalmente del ión K^+ como acarreador de carga.	52
11	La $K_{v\alpha}$ ShalL371D actúa como dominante negativa inhibiendo la conducción de iones K^+ a través de los canales Shal wt.	53
12	La $K_{v\alpha}$ ShalL371D modifica la activación de los canales Shal wt.	57
13	La expresión de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D afecta la sensibilidad al voltaje de la inactivación en estado estacionario de los canales Shal wt.	58
14	La expresión generalizada de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D es letal para <i>D. melanogaster</i> .	61
15	La inhibición ubicua de los mRNA de los canales Shal en <i>D. melanogaster</i> causa letalidad de manera similar que la $K_{v\alpha}$ ShalL371D.	62
16	La expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D en el SN de <i>D. melanogaster</i> causa letalidad.	65
17	La dominante negativa ShalL371D causa letalidad cuando se induce su expresión en el SN de <i>D. melanogaster</i> .	66
18	La inhibición de los canales Shal musculares es letal para la mosca.	68
19	La expresión de la dominante negativa ShalL371D y el "knock-down" de la expresión de los mRNA de los canales Shal en músculos causan distintos grados de letalidad en <i>D. melanogaster</i>	69
20	La inhibición de los canales Shal en el CF causa semiletalidad en machos adultos.	71
21	La expresión de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D en el CF de <i>D. melanogaster</i> causa semiletalidad únicamente en machos.	72
22	La inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal causa letalidad.	87
23	La expresión ubicua del RNAi Shabi ¹⁰ contra los mRNA de los canales Shab no afecta la viabilidad de <i>D. melanogaster</i> .	88
24	La expresión ubicua del RNAi C2VT1 contra los mRNA de los canales Shab no afecta la viabilidad de <i>D. melanogaster</i> .	90
25	La expresión ubicua del RNAi C3LT3 contra los mRNA canales Shab no afecta la viabilidad de <i>D. melanogaster</i> .	92
26	La expresión del RNAi contra los mRNA de los canales Shal en el SN de <i>D. melanogaster</i> no afecta la viabilidad de las moscas.	94
27	La inhibición de los mRNA de los canales Shab neuronales no afecta la viabilidad de <i>D. melanogaster</i> .	96
28	Semiletalidad en <i>D. melanogaster</i> inducida por la inhibición de los mRNA de los canales Shal musculares mediante el RNAi Shali.	99
29	La inhibición de los mRNA de los canales Shab del músculo no afecta la viabilidad de <i>D. melanogaster</i> .	101
30	La inhibición de los mRNA de los canales Shal mediante el RNAi Shali en el CF de <i>D. melanogaster</i> causa semiletalidad.	102

Índice de Tablas.

Tabla		Página
1	Secuencia del filtro de selectividad de los canales tipo Shal y Shaker wt y mutantes.	22
2	Configuraciones obtenidas de la coexpresión de dos versiones de la $K_{v\alpha}$ del canal Shal.	31
3	Probabilidad binomial de la incorporación de $K_{v\alpha}$ Shall371D al tetrámero, (), en las diferentes proporciones de mRNA inyectadas de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D.	33
4	Principales tejidos de <i>D. melanogaster</i> en los que se ha detectado la expresión de los canales Shal y a los que los distintos "drivers" utilizados dirigen la expresión de las moléculas de interés.	34
5	Líneas de <i>D. melanogaster</i> transgénicas utilizadas para el desarrollo de este trabajo adquiridas en diferentes colecciones de moscas.	35
6	Análisis de las propiedades biofísicas del fenómeno de activación de las I_A generadas por canales Shal wt expresados en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	50
7	Parámetros electrofisiológicos del proceso de inactivación en estado estacionario de los canales Shal expresados en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	51
8	Porcentaje de la inhibición de la I_A generada por la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D.	55
9	La dominante negativa Shall371D ocasiona letalidad en la clase experimental <i>UAS-Shall371D¹⁷/Act5C-GAL4</i> .	60
10	Viabilidad de la progenie observada al expresar a la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D en el SN de <i>D. melanogaster</i> .	64
11	La inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D en los músculos de <i>D. melanogaster</i> causa letalidad.	67
12	Semiletalidad en machos por la inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D en el CF de <i>D. melanogaster</i> .	70
13	La expresión generalizada del RNAi contra los mRNA de los canales Shal ocasiona un fenotipo de letalidad en <i>D. melanogaster</i> .	86
14	Viabilidad de las clases experimentales con el genotipo <i>UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+</i> con moscas <i>UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; MKRS/+</i> .	89
15	Viabilidad de la progenie resultante de la cruce de moscas <i>UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS</i> con moscas <i>Act5C-GAL4/CyO</i> .	91
16	Viabilidad de la progenie resultante de la cruce de moscas <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i> con moscas <i>Act5C-GAL4/Act5C-GAL4</i> .	93
17	Viabilidad de las moscas que heredan los elementos <i>elav-GAL4</i> y <i>UAS-Shali</i> .	95
18	La viabilidad de <i>D. melanogaster</i> no se ve afectada por la inhibición de los mRNA de los canales Shab neuronales.	97
19	Viabilidad de las clases experimentales y control resultantes de la cruce de moscas <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i> con moscas <i>Mef2-GAL4/Mef-Gal4</i> .	98
20	Viabilidad de la progenie resultante de la cruce para inducir la inhibición de los mRNA de los canales Shab mediante el RNAi Shabi.	100
21	Viabilidad de las clases experimentales de la cruce realizada para inducir la inhibición de los mRNA de los canales Shal en el CF de <i>D. melanogaster</i> .	103

Índice de Esquemas.

Esquema		Página
1	Cruzas realizadas para balancear a la línea transgénica <i>UAS-Shali</i> .	38
2	Cruza realizada para obtener la línea <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i> .	39
3	Cruzas realizadas para el balanceo de la línea <i>UAS-Shabi¹⁰</i> .	41
4	Establecimiento de la línea <i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS</i> .	41
5	Cruzas realizadas para el balanceo de la línea <i>UAS-ShabiC2VT1</i> .	43
6	Cruza realizada para obtener a la línea <i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/MKRS</i> .	44
7	Cruzas realizadas para el balanceo de la línea <i>UAS-ShabiC3LT3</i> .	45
8	Establecimiento de la línea <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i> .	46
9	Clases esperadas de la crua de moscas <i>UAS-ShalL371D¹⁷/CyO</i> con moscas <i>Act5C-GAL4/CyO</i> .	60
10	Clases esperadas de la crua de moscas con genotipo <i>UAS-ShalL371D¹⁷/CyO</i> con moscas <i>elav-GAL4/elav-GAL4</i> .	64
11	Clases esperadas de la crua realizada para inducir la expresión de la $K_{v\alpha}$ <i>ShalL371D</i> en los músculos de <i>D. melanogaster</i> .	67
12	Clases esperadas de la crua realizada para inhibir a los canales <i>Shal</i> en el CF mediante la expresión de la $K_{v\alpha}$ <i>ShalL371D</i> .	70
13	Esquema de la crua realizada para evaluar la expresión ubicua del RNAi contra los mRNA de los canales <i>Shal</i> .	85
14	Esquema de crua de individuos con genotipo <i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2 /MKRS</i> con individuos de la línea <i>Act5C-GAL4/CyO</i> .	88
15	Clases esperadas de la crua de moscas <i>UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS</i> con moscas <i>Act5C-GAL4/CyO</i> .	90
16	Clases esperadas de la crua de moscas con el genotipo <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i> y moscas con genotipo <i>Act5C-GAL4/Act5C-GAL4</i> .	92
17	Cruza de individuos con genotipo <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i> con moscas de genotipo <i>elav-GAL4/elav-GAL4</i> .	94
18	Clases esperadas de la crua de moscas con la inserción de <i>UAS-Shabi¹⁰</i> con moscas de la línea <i>elav-GAL4</i> .	96
19	Clases esperadas de la crua para inducir la inhibición de los canales <i>Shal</i> musculares de la mosca mediante el RNAi <i>Shali</i> .	98
20	Genotipos de las clases resultantes de la crua para inducir la inhibición de los mRNA de los canales <i>Shab</i> musculares de <i>D. melanogaster</i> .	100
21	Clases esperadas de la crua para inducir la expresión del RNAi <i>Shali</i> en el CF de <i>D. melanogaster</i> .	102

Resumen.

En *Drosophila melanogaster* (***D. melanogaster***), las corrientes de K^+ transitoria dependientes de voltaje (**I_A**) son importantes para la plasticidad sináptica del sistema nervioso y están involucradas en procesos de aprendizaje y de memoria olfativa. Una evidencia de la participación de los canales de K^+ dependientes de voltaje (**K_V**) en estos procesos es que las moscas mutantes en el gen *Shaker* son incapaces de aprender y de retener la información. Además del canal *Shaker*, en el cerebro de la mosca se expresan los canales K_V *Shab*, *Shal* y *Shaw*. Sin embargo, se desconoce aún cual podría ser la relevancia fisiológica de estos canales en procesos cognitivos en *D. melanogaster*.

En este trabajo, se generó una versión mutante del canal *Shal*, *ShalL371D*, donde se modificó la secuencia de un aminoácido del filtro de selectividad (Leucina 371 por Aspártico) para generar un canal K_V no funcional. Demostramos que el canal formado por subunidades α (**$K_{V\alpha}$**) *ShalL371D* es incapaz de conducir iones K^+ comparada con los canales silvestres (***wt***). La $K_{V\alpha}$ *ShalL371D* actuó como dominante negativa ya que inhibió la I_A producida por las $K_{V\alpha}$ *wt* al coexpresarlas en ovocitos de *Xenopus laevis*. Así mismo, el canal *ShalL371D* ocasiona que la curva de activación normalizada se desplace a potenciales más positivos comparada con la curva de activación del canal *Shal wt*, y produce un desplazamiento de la curva de inactivación en estado estacionario hacia valores más negativos. Esto nos indica que la presencia de la $K_{V\alpha}$ *ShalL371D* está afectando la sensibilidad al voltaje de los canales *wt*. A pesar de que la expresión de la proteína *ShalL371D* no fue la misma que la de la versión *wt*, logramos determinar que para inhibir la función de los canales *wt* es necesario que al menos una $K_{V\alpha}$ *ShalL371D* se incorpore al tetrámero.

Con base en estos resultados, generamos líneas de moscas transgénicas que presentan la inserción *UAS-ShalL371D* codificantes para la $K_{V\alpha}$ dominante negativa *ShalL371D* bajo la regulación transcripcional del factor Gal4. Mediante ensayos genéticos de viabilidad utilizando el sistema GAL4-UAS determinamos que la expresión generalizada de la $K_{V\alpha}$ *ShalL371D* ó la inhibición de la expresión de los mRNA de los canales *wt* causan letalidad. La expresión pan-neuronal y en los músculos de la $K_{V\alpha}$ *ShalL371D* causa letalidad. La expresión en moscas adultas de *ShalL371D* en el cuerpo fungiforme, estructura neural involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria olfativa, no causó un efecto deletéreo en la viabilidad de *D. melanogaster*.

En conclusión, demostramos que la $K_{V\alpha}$ *ShalL371D* funciona como una $K_{V\alpha}$ dominante negativa tanto en un sistema heterólogo como *in vivo*. Además, generamos herramientas y/o líneas transgénicas que constituyen un modelo para el estudio de la participación de los canales *Shal* en los procesos de aprendizaje y memoria olfativa.

1. Introducción.

1.1 Los canales de K_v y su participación en la modulación del PA.

El sistema nervioso (**SN**) está repleto de numerosos sensores membranales, los cuales perciben los estímulos ambientales tanto físicos como químicos induciendo la producción de señales eléctricas, las cuales se propagan rápidamente a través de los axones del SN. Estas señales eléctricas, propias de la actividad neuronal, se originan como potenciales de acción (**PA**), que son cambios en el potencial de membrana (E_m) causados por el flujo de iones a través de los canales iónicos dependientes de voltaje localizados en la membrana neuronal (Hille, 2001). El comportamiento del PA depende de la expresión y la coordinación de muchos tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, que responden a cambios en el gradiente de voltaje a través de la membrana. Los PA constituyen la unidad fundamental de codificación de la información de las neuronas (**Fig. 1**). La forma del PA es de suma importancia para regular la excitabilidad y señalización neuronal. Los cambios en la señalización eléctrica debidos al establecimiento y la consolidación de la memoria modifican la dinámica neuronal del cerebro, y este proceso se conoce como plasticidad neuronal. Los cambios del comportamiento que acompañan al aprendizaje surgen de numerosas modificaciones en el SN. Entre los canales iónicos dependientes de voltaje que participan en la propagación del PA se encuentran los canales de K^+ dependientes de voltaje (**K_v**), los cuales se activan por la despolarización de la membrana plasmática. El movimiento de iones K^+ hacia el exterior de la célula a través de los canales K_v repolariza el E_m finalizando con el PA, por lo que controlan las señales eléctricas en células excitables (Catterall *et al.*, 2007; Davis, 1996; Davis, 2005; Wang, 2008).

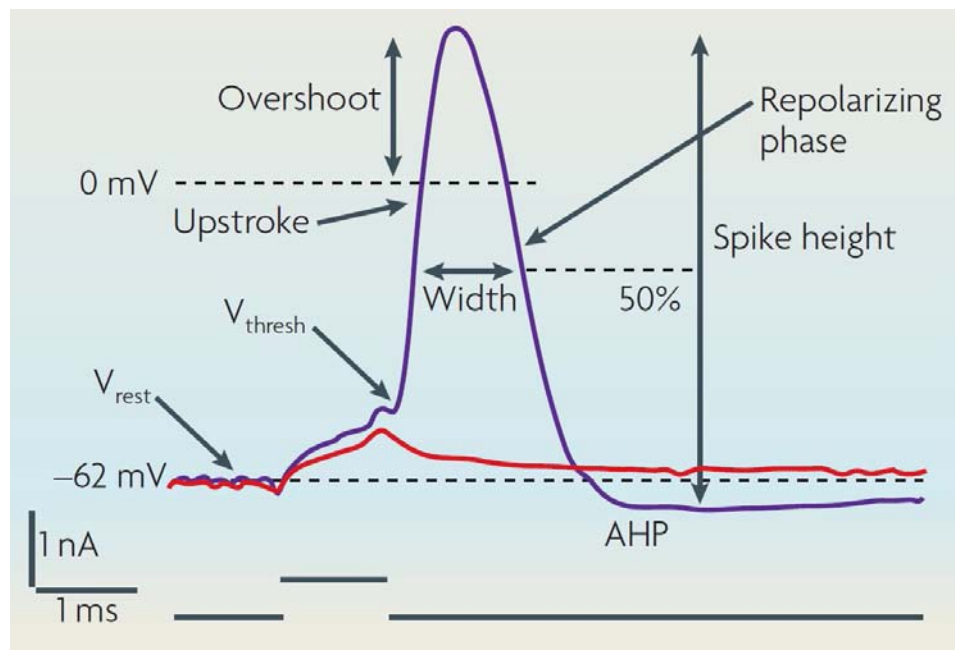


Figura 1. Componentes y parámetros de un PA. En la imagen se muestra un PA registrado de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo de rata, donde se ilustran los parámetros que generalmente se miden. El PA fue elicitado por la inyección de corriente a umbrales despolarizantes (trazo morado) y la respuesta a la inyección de corriente por debajo de estos umbrales se muestra en el trazo rojo. El potencial de reposo (V_{rest}) generalmente se encuentra en los rangos de -85 a -60 mV en este grupo neuronal. El umbral de activación (V_{thresh}) es el voltaje más negativo en el cual la inyección de corriente induce el disparo del PA. La fase despolarizante ("upstroke") del PA habitualmente alcanza el valor máximo a voltajes cercanos de 0 mV. El sobretiro ("overshoot") se define como el pico relativo a 0 mV. El tamaño de la espiga ("Spike height") se define como el pico relativo a cualquier potencial de reposo o el voltaje más negativo alcanzado durante la fase de hiperpolarización (AHP, del inglés "afterhyperpolarization") inmediatamente después de la espiga. El ancho de la espiga ("width") es determinado como el ancho de la mitad de la amplitud de la espiga. La fase de repolarización tiene una velocidad menor que la fase de despolarización. En la parte inferior de la imagen se muestra el pulso aplicado para el registro del PA. Imagen tomada de Bean, 2007.

1.2 Definición de los canales K_v y la descripción de las subfamilias.

Los canales K_v son proteínas membranales, constituidas de cuatro subunidades formadoras de poro denominadas subunidades α ($K_v\alpha$). Cada $K_v\alpha$ está formada por un dominio amino (N)-terminal citoplasmático, un dominio de tetramerización (T1), seis segmentos transmembranales (S1 al S6), un sensor de voltaje (en el S4), el dominio del poro formado por el asa que conecta al S5 y al S6 (Asa P) y un dominio carboxilo (C)-terminal citoplasmático, que en conjunto regulan el flujo de iones K^+ entre la parte interna y externa de la membrana plasmática, en la **Figura 2** se esquematiza a una $K_v\alpha$ (Birnbaum et al., 2004; Covarrubias et al., 2008; Tombola et al., 2006). Las propiedades biofísicas

básicas de los K_v como la activación, la inactivación, la conductividad y la selectividad del ión dependen directamente del coensamble de cuatro $K_{v\alpha}$ idénticas (Jerng *et al.*, 2004; Choe, 2002; Kurata & Fedida, 2006).

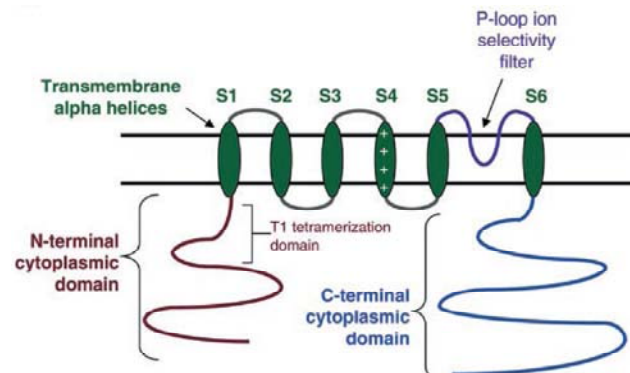


Figura 2. Estructura de la $K_{v\alpha}$ formadora de canales K_v . En la imagen se muestra el esquema de los elementos estructurales presentes en la mayoría de los canales K_v . Cada $K_{v\alpha}$ está formada por seis segmentos transmembranales (S1 al S6) donde en el S4 radica la mayor parte del sensor de voltaje y en el asa que conecta el S5 y el S6 se encuentra el filtro de selectividad, el cual es el encargado de la especificidad que tienen los canales K_v por K^+ . El dominio de reconocimiento entre $K_{v\alpha}$ (T1) se encuentra en la región N-terminal de la proteína. Los dominios N- y C-terminales se encuentran en la parte citoplasmática. Imagen tomada de Birnbaum *et al.*, 2004.

En la superfamilia de los canales K_v hay cuatro subfamilias muy relacionadas: la subfamilia Shaker, la Shab, la Shaw y la subfamilia Shal (**Fig. 3**). El uso de técnicas de genética molecular ha revelado que estas cuatro subfamilias de canales K_v , que originalmente fueron descubiertas en *Drosophila melanogaster* (***D. melanogaster***), están conservadas en ratones y humanos (Jerng *et al.*, 2004; Salkoff *et al.*, 1992). Todos los canales K_v de estas subfamilias son canales tetraméricos y comparten tres dominios bien definidos en la $K_{v\alpha}$: el dominio T1, el sensor de voltaje y el dominio del poro. Mientras que los dominios del sensor del voltaje y el dominio del poro también están conservados en otros K_v , el dominio T1 intracelular está restringido a estas cuatro subfamilias (Covarrubias *et al.*, 2008). Aunque las corrientes de K^+ (I_k) generadas por estas subfamilias comparten características generales como su dependencia de voltaje y la selectividad por el ión K^+ , difieren en sus propiedades cinéticas y en su sensibilidad al voltaje, en la **Figura 3** se esquematiza las familias de I_k generadas por canales de estas cuatro subfamilias (Wei *et al.*, 1990). Los canales K_v tipo Shaker expresados en el sistema heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis* (***X. laevis***) se activan a E_m de bajo umbral, se inactivan y se recuperan rápidamente de la inactivación por lo que se dice que estos canales generan corrientes

de K⁺ transitorias ó tipo A dependientes de voltaje (**I_A**), de una forma similar a lo que se ha observado en el músculo y neuronas de *D. melanogaster*. A través de los canales Shaker los iones K⁺ salen del interior de la célula y generan las I_A que repolarizan a la neurona (Birnbaum et al., 2004; Davis, 1996; Lichtinghagen et al., 1990; Gasque et al., 2006; Salkoff et al., 1992). Trabajos anteriores demostraron que cuando se expresan las subfamilias de canales K_v tipo Shal, Shab y Shaw en el sistema de ovocitos de *X. laevis* se observa una gran diversidad de propiedades biofísicas. El canal Shal, al igual que Shaker, codifica para canales que generan I_A (Gasque et al., 2006; Lichtinghagen et al., 1990; Salkoff et al., 1992). Mientras que, los canales Shab y Shaw codifican para canales K_v denominados rectificadores tardíos dado que se inactivan muy lentamente o la inactivación no es detectable (**Fig. 3**, Salkoff et al., 1992).

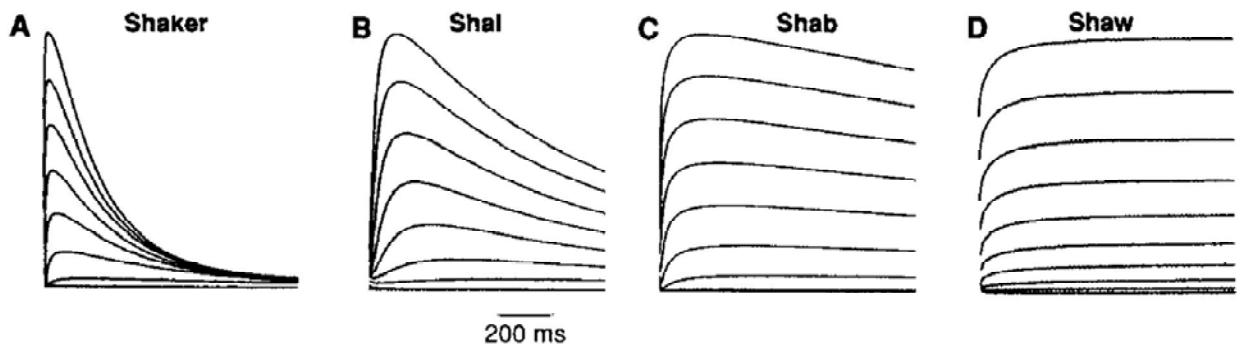


Figura 3. I_k generadas por la expresión heteróloga de diferentes canales K_v. Registros de las I_k en ovocitos de *X. laevis*, inyectados con mRNA codificante para los canales Shaker, Shal, Shab y Shaw (**A a D**), en respuesta a pulsos despolarizantes de un segundo de duración en una rampa de voltaje de -80 mV a +20 mV con incrementos de 10 mV, partiendo de un potencial de mantenimiento de -90 mV. Las corrientes capacitivas fueron borradas para una mayor ilustración. Los canales Shal y Shaker generan I_A, mientras que los canales Shab y Shaw son canales rectificadores tardíos al presentar una inactivación muy lenta comparada con los canales Shal y Shaker. Imagen tomada de Wei et al., 1990.

1.2.1 La participación del dominio T1 para la tetramerización de las K_vα.

Las K_vα sólo multimerizan con miembros de su propia subfamilia. La característica estructural que regula esta asociación es la porción citoplasmática N-terminal denominada dominio T1, la cual está altamente conservada en las K_vα de la misma subfamilia. El dominio T1 consta de aproximadamente 130 aminoácidos (**aa**) que preceden al S1 de cada K_vα. Por evidencia experimental se ha observado que el dominio T1 podría tener un papel en la apertura del canal dado que mutaciones en esta

región originan que las curvas de activación se corran a la izquierda o hacia la derecha, al igual que hace que la inactivación proceda más rápido o más lento dependiendo de la mutación en particular (Birnbaum *et al.*, 2004).

1.2.2 La especificidad de los canales K_v por K^+ está dada por el filtro de selectividad.

El poro de los canales K_v provee una vía permeable que favorece la deshidratación, la difusión y la rehidratación de iones K^+ que se mueven del espacio intracelular al extracelular. El poro contiene elementos estructurales que le confieren la selectividad hacia el ión K^+ así como elementos que pueden activar y regular la conducción del ión K^+ a través del canal. La apertura de los canales K_v permite el flujo de iones a través de la membrana y aunque el flujo es rápido, los canales K_v son altamente específicos en la selección de iones K^+ que pasan a través de ellos y excluyen al Na^+ . El filtro de selectividad de las $K_v\alpha$ se encuentra localizado en el asa P, la cual presenta una secuencia característica en los canales K_v , Thr-Thr-X-Gly-Tyr-Gly-Asp, que constituye el filtro de selectividad propiamente dicho. La geometría de este filtro es la óptima para la coordinación de iones K^+ y se mantiene por interacciones críticas entre la secuencia firma de los canales K_v y otros residuos dentro de la misma proteína. En algunos casos, la disrupción de residuos dentro del filtro de selectividad acelera la inactivación del canal, altera la selectividad del poro, modifica su apertura y en algunas ocasiones puede evitar que el canal conduzca iones K^+ (Jerng *et al.*, 2004; Choe, 2002; Kurata & Fedida, 2006). Este es el caso de la mutante en el gen *Shaker (Sh)* de *D. melanogaster*, Sh^{KS133} , la cual presenta la sustitución de un residuo de valina (**Val/V**) por uno de aspartato (**Asp/D**) en el filtro de selectividad que resulta en la generación de canales Shaker no funcionales, sin que se altere su expresión membranal (Gasque *et al.*, 2006; Lichtinghagen *et al.*, 1990).

1.2.3 Los mecanismos de inactivación de los canales K_v .

Los canales K_v que generan I_A sufren el proceso de inactivación, y hay dos mecanismos principales para la inactivación de estos canales K_v que están bien caracterizados. Uno de los mecanismos es denominado tipo-N, e involucra la participación del dominio N-terminal de la $K_v\alpha$ y su unión a la parte intracelular del poro, ocluyéndolo y evitando el paso de iones K^+ a través del mismo. Este tipo de inactivación ocurre una vez que el canal se ha abierto, tienen una cinética muy rápida y puede ser

eliminado por la deleción o digestión enzimática del dominio N-terminal. Un canal K_v está compuesto de cuatro $K_{v\alpha}$ por lo que puede contener cuatro dominios de inactivación y estos pueden comportarse independientemente pero un sólo dominio de inactivación es suficiente para conferir la inactivación tipo-N (Birnbaum et al., 2004; Kurata & Fedida, 2006).

El segundo tipo de inactivación se conoce como tipo-C e involucra el estrechamiento del poro cerca del filtro de selectividad que resulta en un cambio conformacional en las cuatro $K_{v\alpha}$. Este tipo de inactivación es más lenta que la inactivación tipo-N y puede tener lugar aún en la ausencia del dominio N-terminal pero presentando una cinética más lenta, por lo que se ha sugerido que los dos mecanismos están acoplados (Birnbaum et al., 2004).

1.2.4 Subunidades auxiliares de los canales K_v .

La diversidad funcional de los canales K_v puede aumentar a través de la asociación de $K_{v\alpha}$ con subunidades auxiliares denominada subunidades β ($K_{v\beta}$). Las $K_{v\beta}$ regulan las propiedades biofísicas y los niveles de expresión de las $K_{v\alpha}$. Las $K_{v\beta}$ son proteínas citoplasmáticas y forman estructuras tetraméricas que se asocian en una relación 1:1 con las $K_{v\alpha}$. En mamíferos se han identificado tres genes que codifican para $K_{v\beta}$ ($K_{v\beta1}$, $K_{v\beta2}$ y $K_{v\beta3}$). Entre los papeles funcionales que tienen las $K_{v\beta}$ sobre las $K_{v\alpha}$ se han descrito el incremento en la cinética de la inactivación tipo-N y la modulación de la dependencia al voltaje. Las $K_{v\beta}$ pueden servir como proteínas chaperonas promoviendo y/o estabilizando la expresión de las $K_{v\alpha}$ en la membrana celular, así como su distribución y/o su transporte subcelular (Birnbaum et al., 2004; Kurata & Fedida, 2006; Torres et al., 2007; Wang, 2008).

El estudio genético y fisiológico de mutantes de *D. melanogaster* con comportamientos característicos y defectos electrofisiológicos permitió la identificación de las $K_{v\alpha}$ de los canales K_v por lo que, mutaciones en otros *loci* que mostraron defectos similares permitió la identificación de genes importantes para la función y regulación de los canales de K_v . De esta forma se identificó la $K_{v\beta}$ en la mosca, a través de estudios en individuos mutantes en el gen *Hyperkinetic* (**Hk**). Estos animales presentan un fenotipo similar a los mutantes en *Sh* (Chouninard et al., 1995). La coexpresión heteróloga de Hk y de canales Shaker incrementa la amplitud de la I_A y modifica la dependencia de voltaje.

Los canales Shaker en presencia de *Hk* se activan más rápido y las constantes de inactivación en estado estacionario disminuyen. De igual manera, incrementan el tiempo de recuperación de los canales (Chouninard *et al.*, 1995; Wang & Wu, 1996). Estudios *in vivo* en los músculos de larvas mutantes *Hk* evidenció la reducción de la I_A mientras que la corriente de K^+ rectificadora tardía o sostenida dependiente de voltaje (I_R) permaneció sin alteración. Esta observación indica que hay una reducción en la conductancia unitaria de los canales K_V o en el número de canales K_V funcionales. Con base en datos experimentales se determinó que el tiempo al pico y el decaimiento de la I_A fueron más lentos, y que después de una despolarización prolongada la fracción de canales inactivados es menor en las neuronas y los músculos de mutantes *Hk* que en moscas control (Wang & Wu, 1996; Yao & Wu, 1999).

1.3 Los canales K_V y la memoria olfativa en *D. melanogaster*.

El aprendizaje, el cual también es referido como la formación de la memoria, puede ser definido como la adquisición de información sobre el entorno que produce una alteración en el comportamiento de un organismo. La memoria es el almacenamiento de esta información y la persistencia del cambio conductual en el tiempo. La formación de la memoria depende de la asociación de la información proveniente de uno o varios de los sistemas sensoriales del organismo. Así por ejemplo, la memoria olfativa depende específicamente del circuito neuronal olfativo (Davis, 1996; Davis, 2005).

Se sabe que los canales iónicos dependientes de voltaje son importantes para la plasticidad del cerebro de *D. melanogaster*. Las mutaciones que alteran el aprendizaje y la retención de la información en la mosca se asocian con una función alterada de los canales iónicos dependientes de voltaje que se expresan en el cuerpo fungiforme (**CF**, Gasque *et al.*, 2006). Por más de treinta años se ha utilizado a *D. melanogaster* para estudiar la formación de la memoria olfativa, dado que ofrece un sistema biológico donde los eventos bioquímicos y fisiológicos fundamentales en el aprendizaje pueden ser relacionados con cambios en el comportamiento con relativa facilidad (Davis, 1996). Utilizando a la mosca de la fruta se han identificado muchos genes implicados en el aprendizaje olfativo y se han aislado a los homólogos de estos genes en especies de mamíferos donde se han estudiado sus posibles papeles en procesos cognitivos. Lo

anterior demuestra que los mecanismos moleculares de la memoria y los genes involucrados en los procesos de conducta animal están conservados en diferentes especies (Davis, 2005; Liu & Davis, 2006). La continuidad en los estudios sobre la formación de la memoria en *D. melanogaster* ayudará, con una alta probabilidad, a comprender los mecanismos biológicos de como se forma la memoria en los humanos y permitirá el desarrollo de terapias y tratamientos médicos para enfermedades neurológicas o psiquiátricas que interrumpen los procesos de aprendizaje y de formación de la memoria (Davis, 2005; Roman & Davis, 2001).

En *D. melanogaster*, el CF es un centro neural con un papel central en el aprendizaje y en la memoria olfativa. El CF es una estructura prominente bilateral simétrica del cerebro central de *D. melanogaster*. El CF está formado por alrededor de 2500 neuronas en cada hemisferio, las cuales son llamadas células de Kenyon (**CK**). Las CK reciben la información olfativa por lo que se les denomina neuronas olfativas de tercer orden. Las células intrínsecas del CF proyectan sus neuritas centralmente hacia el cáliz, la cual es una región de arborizaciones dendríticas que presenta invaciones de diferentes neuronas de distintas regiones del cerebro. Los axones de las CK se proyectan de la parte posterior a la anterior del cerebro como una estructura empaquetada densamente, denominada pedúnculo, donde se divide frontalmente y se proyecta verticalmente en los lóbulos dorsales α y α' , en los lóbulos medios β y β' y en los lóbulos γ . Basados en las proyecciones axonales hay al menos tres clases de neuronas en el CF, las neuronas α/β que proyectan sus axones y bifurcan en la base del pedúnculo y continúan tanto al lóbulo α como al lóbulo β . Las neuronas α'/β' las cuales ramifican en sus respectivos lóbulos, mientras que las neuronas γ se extienden en los lóbulos γ . Las neuronas que salen del CF se proyectan hacia varias regiones del cerebro central de *D. melanogaster*. El sistema olfativo de *D. melanogaster*, y en particular el CF, puede ser manipulado genéticamente durante su desarrollo. Con base en estudios donde el CF sufre disrupción genética y farmacológica se ha llegado a la conclusión que el aprendizaje para la discriminación de olores requiere del CF sugiriendo que esta estructura es un sitio clave para el aprendizaje y el procesamiento de la memoria olfativa. Las CK expresan preferencialmente un conjunto de genes cuyas mutaciones causan deficiencia en el aprendizaje y en la memoria olfativa, evidenciando así, la importancia de estas estructuras en estos procesos biológicos (Gasque *et al.*, 2006; Heisenberg, 2003; Keene & Waddell, 2007; Roman & Davis, 2001; Wu *et al.*, 2007).

De manera general, la memoria olfativa sigue la ruta descrita a continuación, los odorantes son percibidos por proteínas receptoras olfativas que son expresados en las neuronas receptoras olfativas (**NRO**) que residen en las cerdas sensoriales de la antena y de las papilas maxilares (**Fig. 4**). Las NRO proyectan sus axones a lo largo del nervio antenal al lóbulo antenal, el cual consiste de 43 glomérulos. En el lóbulo antenal, los axones de las neuronas receptoras olfativas hacen sinapsis con las dendritas de dos clases de neuronas de los glomérulos: neuronas colinérgicas proyectivas del lóbulo antenal y con interneuronas GABAérgicas inhibitorias locales. Las neuronas proyectivas reciben la información olfativa del lóbulo antenal y la transmiten a los cálices del CF y al cuerno lateral a través del tracto anteno-cerebral interno, en la **Figura 4** se muestran las estructuras más importantes que participan en la vía olfativa de *D. melanogaster* (Davis, 2005; Heisenberg, 2003; Keene & Waddell, 2007; McGuire et al., 2005).

La primera evidencia experimental de la participación de los canales iónicos dependientes de voltaje en el aprendizaje y la memoria olfativa en *D. melanogaster* se origina del análisis de moscas mutantes en el gen *Shaker* (*Sh*) quienes son incapaces de aprender y de retener la información. En estudios inmunohistoquímicos se observó que los canales *Shaker* se expresan en el neuropilo del CF de *D. melanogaster* lo que sugiere un papel importante en la fisiología de estas estructuras (Birnbaum et al., 2004; Davis, 1996; Gasque et al., 2006). Como se mencionó anteriormente, los canales *Shaker* son importantes en la repolarización de la membrana y la falta de ellos altera la excitabilidad, la liberación del neurotransmisor y la plasticidad sináptica. Debido a esto, la deficiencia en el aprendizaje de moscas mutantes *Shaker* puede deberse a una menor plasticidad sináptica como consecuencia del mal funcionamiento de este canal K_v . Además de *Shaker*, se ha encontrado la presencia de los mRNA para las $K_v\alpha$ de *Shab*, *Shal* y *Shaw* en el CF (Gasque et al., 2005). Sin embargo, se desconoce aún cual podría ser la relevancia fisiológica de estos canales en los procesos de memoria y aprendizaje en *D. melanogaster*.

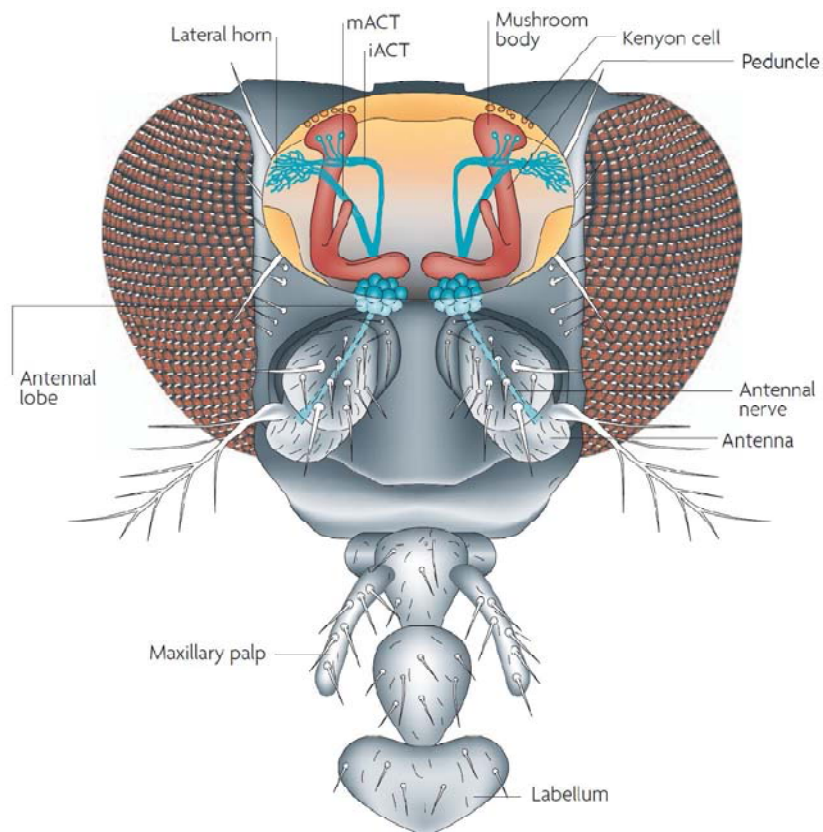


Figura 4. Vista dorsal de la cabeza de *D. melanogaster* y de la vía olfativa. En la imagen se muestra los principales elementos de la vía olfativa. Los olores son percibidos por las NRO, las cuales se encuentran en la antena (“antenna”). Las NRO proyectan sus axones a lo largo del nervio antenal (“antennal nerve”) hasta los glomérulos del lóbulo antenal (“antennal lobe”, estructura en color azul). De esta región del cerebro de *D. melanogaster*, la información viaja a través del tracto anteno-cerebral para hacer contacto con los cuerpos neuronales de las células CK que se encuentran en el CF (“mushroom body”, estructura en color rojo). El CF es una estructura bilateral que se localiza en la parte central del cerebro de la mosca. Imagen tomada de Keene & Waddell, 2007.

1.4 La subfamilia Shal, la I_A y la potenciación de largo plazo.

Por antecedentes se sabe que la expresión de los genes de los canales K_v tipo *Shaker* y *Shal* de *D. melanogaster* en sistemas heterólogos generan I_A y recientemente se describió que los canales *Shal* son los principales contribuyentes de las I_A somáticas en el CF (Gasque *et al.*, 2005; Gasque *et al.*, 2006). Los canales *Shal* participan en las I_A caracterizadas en los compartimentos somatodendríticos de las neuronas, donde el papel fisiológico de estas corrientes dependen de sus umbrales de activación, del rápido desarrollo de su inactivación, de su estado de inactivación en reposo y de su rápida recuperación de la inactivación a E_m hiperpolarizantes. De esta forma, las I_A influyen en la

amplitud y en la duración del PA. La evidencia experimental apunta a que las I_A somatodendríticas son generadas por los canales Shal, que en mamíferos comprende tres distintos genes $Kv4.1$, $Kv4.2$ y $Kv4.3$, formando la familia $Kv4$. La expresión de las proteínas codificadas por los genes $Kv4$ es muy abundante en el cerebro, ya que estas proteínas regulan la excitabilidad de la membrana neuronal (Birnbaum *et al.*, 2004; Jerng *et al.*, 2004).

Se sabe que el mecanismo por el que se almacena la información en el proceso de aprendizaje consiste en un incremento en la fuerza de las conexiones excitatorias entre las neuronas. A este proceso celular que contribuye a la formación de la memoria en el sistema nervioso central (**SNC**) se le conoce como potenciación de largo plazo (**LTP**, por sus siglas en inglés). Se sabe que la fuerza de la sinapsis se incrementa cuando se correlaciona temporalmente la actividad presináptica producida tanto por la liberación de glutamato, el neurotransmisor excitatorio predominante en el SNC, y una despolarización lo suficientemente fuerte del E_m de la célula postsináptica. Esta despolarización de la membrana postsináptica induce el desbloqueo del receptor NMDA (un subtipo de receptor heterotetramérico de glutamato) causado por iones Mg^{2+} favoreciendo así al aumento de la fuerza sináptica en el SNC. Esto refleja la importancia del receptor NMDA en la plasticidad sináptica de las neuronas (Birnbaum *et al.*, 2004; Thompson, 2007). En un estudio reciente se describe una nueva forma de plasticidad neuronal dependiente del receptor NMDA, sugiriendo que este proceso contribuye a la potenciación sináptica. En este trabajo, observaron que la estimulación del receptor NMDA induce la internalización del canal Shal de vertebrados $Kv4.2$. La redistribución de del canal $Kv4.2$ requiere la activación del receptor NMDA y de un influjo de iones Ca^{2+} . Además, se determinó que la endocitosis del canal $Kv4.2$ también puede contribuir con el mantenimiento de una despolarización mayor en la membrana postsináptica resultando en un incremento de las corrientes sinápticas (**Fig. 5**). El mismo resultado puede obtenerse al usar una dominante negativa para $Kv4.2$ ($Kv4.2^{W327F}$) que se expresa en las neuronas sujeto de estudio (Kim *et al.*, 2007).

La inducción química del proceso de LTP también resulta en la internalización de los canales $Kv4.2$ y como consecuencia hay una reducción de las I_A . La regulación de la expresión de los canales Shal que generan I_A en la superficie membranal contribuyen adicionalmente a la plasticidad sináptica y se sabe que las I_A regulan la amplitud de las corrientes espontáneas excitatorias miniatura postsinápticas (**mESPC**, por sus siglas en

inglés). El decremento de la expresión de los canales Kv4.2 tanto por la endocitosis del canal o por la expresión de la proteína Kv4.2^{W362F} aumenta la amplitud promedio y la carga de las mESPC (Fig. 5). La endocitosis del canal Kv4.2 depende de su actividad además de un mecanismo dependiente del receptor NMDA y de Ca²⁺. De esta manera, el establecimiento del proceso de LTP requiere para su inducción: del receptor NMDA, de un incremento de Ca²⁺ intracelular y de la internalización de los canales Kv4.2. Esto provoca el aumento de la amplitud de las mESPC contribuyendo así al proceso de LTP (Fig. 5). Todo esto en conjunto, pone en evidencia la importancia de los canales Kv en el aprendizaje y la memoria (Kim et al., 2007; Thompson, 2007).

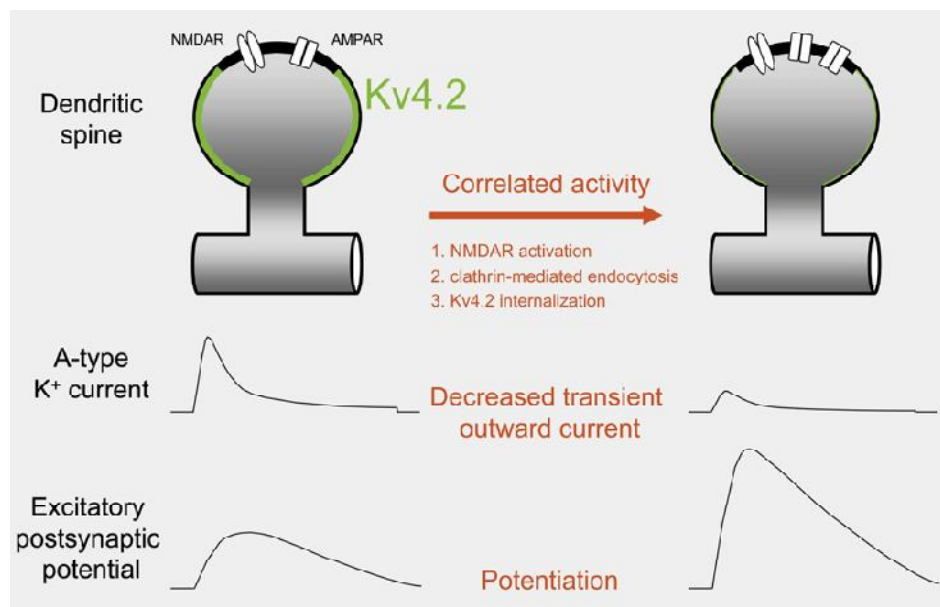


Figura 5. La internalización de los canales Kv4.2 favorece el proceso de LTP. Cuando una neurona CA1 del hipocampo recibe un estímulo excitatorio, los primeros receptores en responder son los receptores AMPA, los cuales originan la despolarización de la neurona, por una entrada de iones Na⁺, lo que induce el desbloqueo de los receptores NMDA por Mg²⁺, favoreciendo que estos respondan a la unión de su agonista. La activación de los receptores NMDA induce una entrada de iones Ca²⁺ a la neurona CA1. En las dendritas de las neuronas piramidales en reposo, se ha observado que una de las corrientes iónicas más importantes presente son las I_A. Con base en la evidencia experimental se sabe que canales Kv4.2 son los responsables de generar la mayoría de las I_A en las dendritas. En respuesta a la activación del receptor NMDA la densidad de canales Kv4.2 en la membrana plasmática disminuye, mediante endocitosis mediada por vesículas de clatrina. Por consiguiente, se observa la reducción de la amplitud de las I_A y un aumento en la amplitud de las mESPC, dado que hay una relación inversa entre estos dos parámetros. En estas condiciones el E_m es más negativo comparado con el E_m en reposo lo que favorece el incremento de la fuerza sináptica. Imagen tomada de Thompson, 2007.

1.5 Los receptores NMDA en la consolidación de la memoria en *D. melanogaster*.

En varios estudios, se utiliza el sistema de dos componentes de levadura Gal4-UAS para lograr la expresión tejido-específica de proteínas en *D. melanogaster* (Bilen & Bonini, 2005; Brand & Perrimon, 1993; Muqit & Feany, 2002; Ribera et al., 1996; Rodríguez-Valentín et al., 2006). El sistema Gal4-UAS permite la generación rápida de líneas de moscas en las cuales la expresión ectópica de un gen de interés puede ser dirigida a diferentes tipos de tejidos y grupos celulares. El sistema separa al gen de interés de su activador transcripcional en dos líneas de moscas transgénicas distintas. En una línea el gen de interés permanece en silencio por ausencia de su activador, en la segunda línea, la proteína activadora está presente pero no tiene un gen blanco al cual activar. Esto asegura la viabilidad de las líneas parentales. Sólo cuando se cruzan las dos líneas, el gen blanco se activa en la progenie y se pueden estudiar las consecuencias fenotípicas de dicha expresión (**Fig. 6**; Brand & Perrimon, 1993; Duffy, 2002; McGuire et al., 2004; Perrimon, 1998; Rodríguez-Valentín et al., 2006; van Roessel & Brand, 2000). La expresión tejido-específica del factor transcripcional Gal4 activa la transcripción, en moscas, del transgen de interés a través de la unión de Gal4 a sus sitios blancos, las secuencias "Upstream Activation Sequence" (**UAS**). En este sistema, el transgen de interés se colocó abajo de varias repeticiones de la secuencia UAS. Cuando las moscas transgénicas que portan el transgen se cruzan con moscas que expresan Gal4 con un patrón tejido-específico, se activa la transcripción y la proteína en estudio se sintetiza sólo en el tejido donde se expresa Gal4 (Brand & Perrimon, 1993; Bilen & Bonini, 2005; Duffy, 2002; McGuire et al., 2004; Muqit & Feany, 2002; Rodríguez-Valentín et al., 2006; van Roessel & Brand, 2000).

La posibilidad de dirigir la expresión de proteínas en un tejido específico de *D. melanogaster* utilizando el sistema Gal4-UAS ha permitido evaluar la participación de varias moléculas en el proceso de memoria y aprendizaje. Por ejemplo, el aprendizaje olfativo pavloviano en *D. melanogaster* permite evaluar una forma elemental de estos procesos en una manera simple y accesible en el cerebro de la mosca. Como se mencionó anteriormente, se sabe que en mamíferos esta forma de plasticidad neuronal requiere la intervención de receptores NMDA funcionales. Con base en estos datos se determinó que en el genoma de *D. melanogaster* se encuentran dos genes homólogos de los receptores tipo NMDA de vertebrados (*dNR1* y *dNR2*), los cuales codifican para las subunidades funcionales del receptor NMDA y con características similares a las propiedades observadas en los receptores NMDA antes descritos (Wu et al., 2007; Xia et

al., 2005). Tanto dNR1 como dNR2 se expresan ampliamente en el cerebro de *D. melanogaster* incluyendo el CF y el cuerpo elipsoide. El cuerpo elipsoide es una subestructura del complejo central, que comprende tres subestructuras más: el cuerpo en forma de abanico, el nódulo, y el puente protocerebral. El complejo central es otra estructura neural importante del cerebro de *D. melanogaster* y se ubica entre el pedúnculo del CF y está rodeado lateralmente por los dos tractos anteno-glomerulares (Wu et al., 2007).

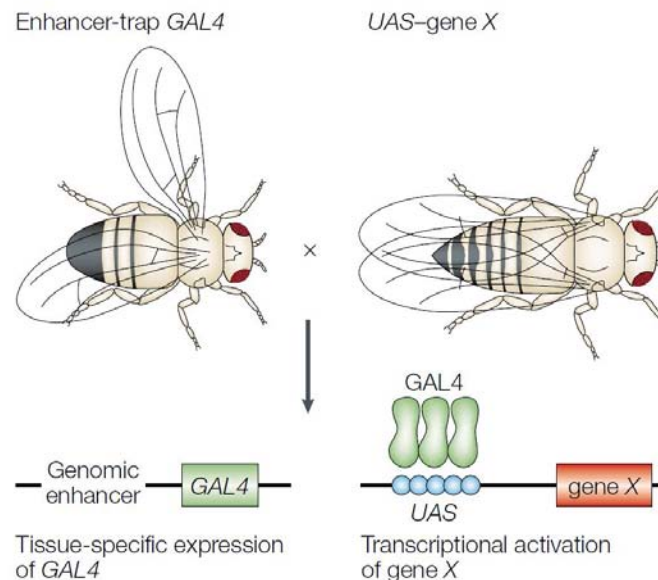


Figura 6. Expresión dirigida en *D. melanogaster* mediante el sistema Gal4-UAS. El factor transcripcional Gal4 endógeno de levadura es utilizado para regular la expresión génica en *D. melanogaster*. Por una parte, están las moscas transgénicas que tienen la secuencia codificante para Gal4 insertada en su genoma bajo la regulación de promotores o “enhancers” genómicos tejidos-específicos. Por otra parte, están las moscas que presentan las secuencias UAS insertadas río arriba del gen o de la secuencia efectora de interés. Por lo tanto cuando estas moscas se cruzan, la progenie resultante va a expresar el gen o la secuencia de interés en el patrón de expresión de Gal4. Imagen tomada de St Johnston, 2002.

El papel de los receptores NMDA en los procesos de aprendizaje y memoria en *D. melanogaster* se caracterizó utilizando moscas transgénicas con mutaciones hipomorfas de dNR1o con un RNA interferente (**RNAi**) específico contra dNR1 o dNR2, bajo en control transcripcional del sistema Gal4-UAS. De esta forma se abatió la expresión de los receptores tipo NMDA tanto en el CF como en el cuerpo elipsoide. Estas líneas de moscas transgénicas fueron sujetos de prueba de condicionamiento olfativo y se determinó que la disminución de la expresión de los receptores NMDA interrumpe el aprendizaje olfativo

asociativo y la consolidación de la memoria de largo plazo. Este efecto puede revertirse por la expresión del transgen silvestre (**wt**) de dNR1 utilizando el sistema Gal4-UAS. Por lo que, concluyeron que los receptores NMDA se requieren para la consolidación de la memoria de largo plazo y que la expresión en el CF es importante para la fase de la memoria de mediano plazo, dejando claro que la transferencia de información de un centro neural a otro es importante para el progreso de la consolidación de la memoria en *D. melanogaster* (Wu et al., 2007; Xia et al., 2005).

Estos datos en conjunto apoyan que la memoria se adquiere en el CF y de ahí se transfiere al cuerpo elipsoide para su almacenamiento durante la consolidación de la memoria. Se sabe que la formación de la memoria en moscas procede a través de varias fases temporales e involucra cascadas de señalización, mientras que para el almacenamiento de la memoria olfativa se ha propuesto que se lleva a cabo en varias regiones cerebrales de *D. melanogaster*. Con base en lo anterior, se propone el siguiente modelo donde: i) la adquisición de la información involucra una asociación inicial de un odorante con un estímulo condicionado en el lóbulo antenal, ii) la memoria de corto plazo reside en el CF, iii) la memoria de mediano plazo se adquiere en el CF, específicamente en las neuronas dorsales pareadas medias así como de neuronas dopaminérgicas que inervan al CF, iv) la consolidación de la memoria de largo plazo involucra la transferencia de la información al cuerpo elipsoide así como de la participación de ciertos glomérulos del lóbulo antenal y v) por último, la evocación de la memoria de largo plazo involucra la participación del CF y del cuerpo elipsoide (Liu & Davis, 2006; Wu et al., 2007). Por lo que, utilizando el sistema bipartito de Gal4-UAS para expresar proteínas dominantes negativas o un RNAi contra los canales K_v nos permitirá evaluar el papel de estos canales en el SN de *D. melanogaster*.

1.6 Silenciamiento de genes mediante dsRNA.

El silenciamiento de genes mediante RNAi es un proceso iniciado por moléculas de RNA de doble cadena (**dsRNA**) y es utilizado por las células eucariontes para modular la expresión génica a nivel pre- o pos-transcripcional. Después de los reportes donde se describe el uso de los siRNA para el silenciamiento de genes su uso se ha convertido en un procedimiento estándar en los laboratorios para estudiar la función de genes específicos. Los genes eucariontes pueden ser silenciados por la transfección de cadenas cortas de

dsRNA de alrededor de 21 a 23 nucleótidos (**nt**) secuencia-específicas. Estos RNA pequeños interferentes (**siRNA**) exógenos ejercen su función a través de la unión con el mRNA blanco para inducir la degradación del mismo (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007).

La especificidad del RNAi es abastecida por los RNA guías, que son moléculas de 19 a 26 nt. Los RNA endógenos pequeños no codificantes (19-25 nt) son conocidos como microRNA (**miRNA**), los cuales tienen un papel importante en una amplia gama de funciones. A diferencia de los siRNA, los miRNA generalmente no inducen la degradación del mRNA blanco, más bien, se les ha implicado con la supresión de la traducción de los mRNA. Con base en estas observaciones, los RNA pequeños tienen al menos dos mecanismos para iniciar el silenciamiento, de genes específicos, mediada por los dos principales tipos de RNA pequeños, los cuales difieren en origen y en función, los siRNA y los miRNA (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007).

La interferencia mediada por RNA puede ser inducida por varias fuentes de moléculas de RNA, incluyendo virus con genoma de RNA, transposones, siRNA y miRNA. Por estudios genéticos y bioquímicos el mecanismo de acción de los RNA pequeños es dividida en dos etapas: la iniciación y la efectora. La etapa de iniciación involucra la generación de los siRNA y de los miRNA a partir de una molécula más grande de dsRNA y de un pre-miRNA, respectivamente. En la etapa efectora se requiere que una cadena del dsRNA del si/miRNA se transfiera a un complejo ribonucleoproteico (**RNP**) para llevar a cabo el silenciamiento de genes a través de: la degradación del mRNA dependiente de homología, la represión de la traducción o el silenciamiento transcripcional (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007).

1.6.1 La etapa de iniciación, generación de los RNAs guías.

La molécula de dsRNA que genera a los siRNA puede tener varios orígenes, puede ser generada por una RNA polimerasa dependiente de RNA, por la transcripción bidireccional de genes o por elementos transponibles. Los siRNA son producto del corte de una molécula larga de dsRNA en pequeños fragmentos de 21 a 23 nt por la RNasa Dicer-2. Las dos cadenas del siRNA presentan secuencias con configuración sentido o antisentido con respecto al mRNA blanco. La cadena antisentido del siRNA (también llamada cadena guía) es el templado para la maquinaria interferente que media el silenciamiento de genes secuencia-específico. Los siRNA guían a la maquinaria molecular

implicada en el silenciamiento para que lleve a cabo la degradación de RNA mensajeros específicos, también se les ha asociado con modificaciones en la cromatina (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007).

La biogénesis de los miRNA inicia en el núcleo, a partir de la transcripción de regiones intergénicas por la RNA polimerasa II. Estos transcritos (denominadas pri-miRNAs) contienen secuencias repetidas invertidas complementarias, las cuales pueden plegarse sobre sí mismas y formar estructuras secundarias de tallo-asa de dsRNA. Estas estructuras sufren un proceso de maduración que involucra la participación de dos RNAsas para dar lugar a los miRNA. El pri-miRNA es procesado por el complejo de la RNasa Drosha-Pasha para generar un producto de alrededor de 70 nt denominado pre-miRNA. Para el ensamble del complejo **RISC** ("RNA-Induced silencing complex") el pre-miRNA tiene que ser transportado al citoplasma para ser procesado por Dicer-1 en miRNA maduros de alrededor de 22 nt. Posteriormente, los miRNA son acoplados al complejo RISC. Los miRNA regulan la represión de la traducción por la unión con secuencias parcialmente complementarias en la región 3' no traducida del mRNA blanco, pero también pueden inducir la degradación del mRNA cuando hay una complementariedad perfecta entre las dos moléculas de RNA (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007).

1.6.2 La etapa efectora, la especificidad del silenciamiento de genes.

En *D. melanogaster*, Dicer-1 y Dicer-2 están involucradas en el corte del pre-miRNA y en la generación de los siRNA, respectivamente. Se ha descrito que la proteína Dicer-2 se asocia con R2D2, y este complejo se asocia con el siRNA de doble cadena (dúplex). La asociación del dúplex del si/miRNA con la proteína Dicer y R2D2 forma una partícula RNP, precursora del complejo RISC activo. Los complejos RNP funcionales contienen sólo la cadena guía del si/miRNA, los cuales son reclutados al complejo efector RISC o a la forma nuclear de RISC, el complejo **RITS** ("RNA-Induced transcriptional silencing complex"). Los complejos RISC que incorporan la cadena guía de los siRNA se designan complejos siRISC mientras que los complejos efectores que contienen miRNA se denominan miRISC (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007).

Cada complejo RISC contiene a un miembro de la familia de proteínas Argonauta (**Ago**), la proteína Ago se une al RNA presente en el complejo RISC (**Fig. 7**). La cadena antisentido presente en el RISC guía a la proteína Ago para catalizar el corte del mRNA

blanco. También las proteínas FXR ("Fragile X Mental Retardation") y VIG ("Vasa Intronic Gene protein") se han identificado como componentes de RISC. Es de hacer notar que los complejos RISC que contienen a la proteína FXR también contienen a las proteínas ribosomales L5 y L11, así como al RNA ribosomal 5S y a la RNA helicasa p68 (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007). Recientemente, se describió la participación de la endorribonucleasa C3PO en la activación de RISC, mediante la remoción de la cadena sentido del siRNA, también denominada cadena pasajera. (Liu et al., 2009). Los complejos RISC y RITS son complejos efectores regidos por la homología de secuencias dadas por las interacciones entre pares de bases de la cadena guía del siRNA con el mRNA blanco. Por lo tanto, el complejo siRISC une al mRNA blanco mediante los sitios complementarios en la cadena guía para llevar a cabo el silenciamiento por el corte del mRNA, cuando hay complementariedad perfecta mRNA es cortado y degradado (Jaronczyk et al., 2005; Rana, 2007). En el caso del complejo miRISC, un componente funcional es la proteína represora de la traducción RCK, también llamada p54. Por lo que, el miRNA en el miRISC provee la especificidad dependiente de secuencia y RCK/p54 es la molécula efectora encargada del almacenaje o procesamiento del mRNA blanco (Rana, 2007).

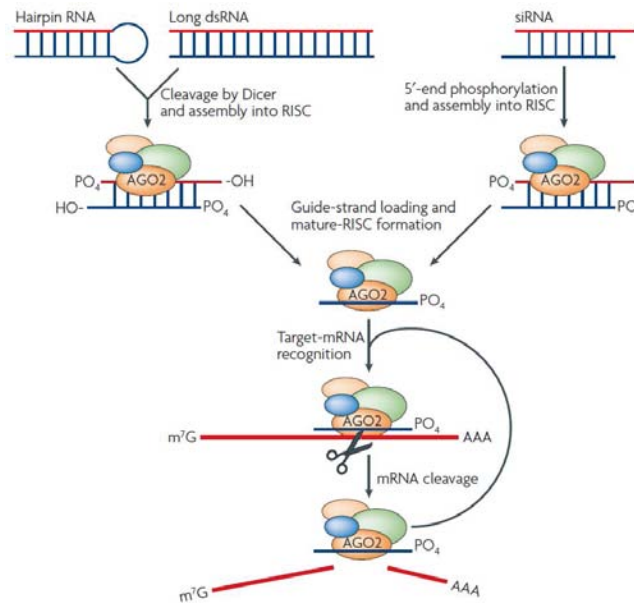


Figura 7. Silenciamiento de genes específicos mediante la formación del complejo RISC. En *D. melanogaster*, sustratos de dsRNA ("hairpin RNA" y "long dsRNA") son procesados por el heterodímero de Dicer-2 y R2D2 en siRNA de alrededor de 21 nt con grupos fosfatos en los extremos 3' y 5'. Se pueden introducir dúplex de siRNA (19-23 nt) y posteriormente éstos son fosforilados por cinasas celulares. Estos dsRNA pequeños se acoplan a complejos RISC que contienen a la proteína Ago, Dicer-2 y otros factores celulares, a manera de ejemplificar, sólo se indica a la proteína Ago. El complejo RISC activo contiene la cadena guía del siRNA, en consecuencia, la activación del complejo siRISC implica la búsqueda del mRNA blanco y utilizando la cadena antisentido para el procesamiento (corte y degradación) del mRNA. El complejo siRISC es reciclado para iniciar nuevos eventos de procesamiento. Imagen tomada de Rana, 2007.

1.7 La subfamilia Shab y el control dinámico de la excitabilidad neuronal.

Aunque la subfamilia de canales Shab es homóloga a la subfamilia de canales Shaker, se sabe muy poco del papel fisiológico de estos canales K_v y de sus homólogos en vertebrados denominados K_{v2}. Como se mencionó anteriormente, el registro electrofisiológico de los canales Shab tanto en neuronas de embrión de *D. melanogaster* como en sistemas heterólogos de expresión se observaron I_R por lo que se denominan canales K_v rectificadores tardíos (Peng & Wu, 2007; Salkoff et al., 1992; Tsonuda & Salkoff, 1995). Más aún, las moscas con mutaciones puntuales en el gen *Shab* presentan una reducción de las I_R en las neuronas, lo que demuestra que el gen *Shab* codifica efectivamente para la I_R. Además, la expresión de proteínas dominantes negativas contra los canales K_{v2} reduce la I_R en cultivos de neuronas. Sin embargo, aún es incierto el papel de los canales Shab y K_{v2} en el control de la excitabilidad sináptica, aunque se ha observado que las I_R generadas por canales Shab tienen una participación importante

en el control del nivel de transmisión durante la actividad neuronal de alta frecuencia (Peng & Wu, 2007; Ueda & Wu, 2006).

La regulación dinámica de la excitabilidad intrínseca de las neuronas confiere plasticidad a las funciones neuronales. Se sabe que los canales Kv2.1 se expresan en gran parte del SNC de los mamíferos donde constituyen el principal generador de las I_R somatodendríticas, además, en varios reportes se ha observado que los canales Kv2.1 regulan la excitabilidad y los influjos de Ca^{2+} en neuronas piramidales durante periodos de disparos de PA de alta frecuencia por lo que las I_R constituyen un mecanismo importante para la regulación de la excitabilidad somatodendríticas de las neuronas. Con estas observaciones se sugiere que el canal Kv2.1 regula la excitabilidad neuronal sin contribuir en la repolarización de la membrana durante el PA debido a que tiene un alto umbral de activación y una cinética de activación lenta (Misonou *et al.*, 2005). Por otra parte, en varios estudios se ha observado que un incremento en la actividad neuronal excitatoria conduce a modificaciones en el estado de fosforilación de los canales Kv2.1, lo que genera un aumento gradual de su actividad al disminuir su umbral de activación y acelera las cinéticas de activación del canal. Esta fosforilación favorece el agrupamiento de los canales Kv2.1 en la superficie membranal tanto *in vivo* como *in vitro* modificando dramáticamente las I_R . La función de los canales Kv2.1 esta dinámicamente regulada por la actividad neuronal y esta modulación en los cambios graduales en la activación de Kv2.1 permiten suprimir homeostáticamente la excitabilidad neuronal, especialmente en periodos de disparos de PA de alta frecuencia, lo que impacta en la excitabilidad y plasticidad neuronal intrínseca, además de que, puede tener un papel neuroprotector en condiciones de hiperexcitabilidad (Misonou *et al.*, 2005; Mohapatra & Trimmer, 2007).

2. Antecedentes.

Una $K_{V\alpha}$ dominante negativa debe cumplir dos criterios: i) no generar un canal funcional cuando forma homotetrámeros, ii) el fenotipo de dominancia negativa se debe observar cuando al menos una $K_{V\alpha}$ mutante se coensambla con $K_{V\alpha}$ wt formándose heterotetrámeros no funcionales. En trabajos previos, se ha observado que la expresión de versiones truncadas o con deleciones en la región del poro de los canales K_V tiene efectos de dominancia negativa. El análisis molecular de la mutante Sh^{KS133} de *D. melanogaster* permitió identificar que el cambio de un residuo de Val/V por un residuo de Asp/D dentro de la secuencia del filtro de selectividad del canal Shaker genera una proteína no funcional y actúa como una $K_{V\alpha}$ dominante negativa cuando se coexpresa con $K_{V\alpha}$ wt (**Fig. 8**). Por lo que, la sustitución de un aa en el filtro de selectividad de un canal K_V de otra subfamilia es una estrategia para generar una $K_{V\alpha}$ dominante negativa (Gasque et al., 2006; Lichtinghagen et al., 1990; Ribera et al., 1996).

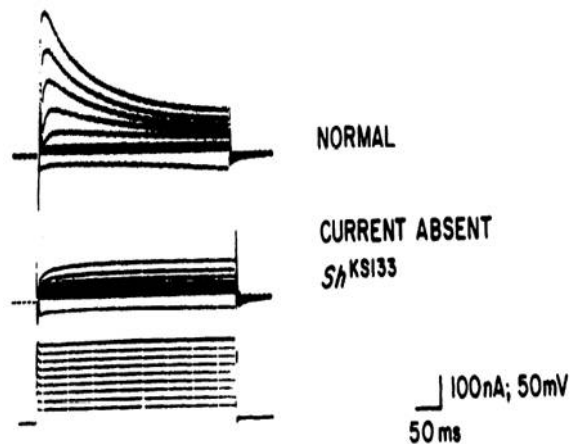


Figura 8. Las moscas mutantes Sh^{KS133} no presentan el componente transitorio de las I_K . En la parte superior de la imagen se muestra la familia de I_K registradas en el músculo de moscas wt utilizando el protocolo de pulsos despolarizantes que se muestra en la parte inferior de la imagen. En la parte media de la imagen se muestra la familia de I_K registradas en una mosca con la mutación Sh^{KS133} , donde se observa que hay una eliminación completa de las I_A . Imagen tomada de Salkoff & Tanouye, 1986.

2.1 Generación de la $K_{V\alpha}$ Shall371D como potencial dominante negativa.

Se ha demostrado que la capacidad de expresar una $K_{V\alpha}$ dominante negativa de una forma directa es una herramienta molecular útil para investigar el papel fisiológico de los canales K_V nativos (Gasque et al., 2006; Lichtinghagen et al., 1990; Ribera et al., 1996).

En el laboratorio, el Dr. Enrique Reynaud Garza y Sofía González Salinas trabajaron en conjunto para la construcción molecular de una versión mutante para la $K_{v\alpha}$ del canal Shal utilizando como referencia a la mutante Sh^{KS133} (Gasque et al., 2005; Litchtinghagen et al., 1990). La proteína mutante generada en el laboratorio, denominada Shall371D, presenta la sustitución de la leucina (**Leu/L**) 398 por un Asp/D en el filtro de selectividad del canal Shal, en la posición equivalente a la sustitución presente en las moscas mutantes Sh^{KS133} (Gasque et al., 2005; Litchtinghagen et al., 1990). En la **Tabla 1** se muestra la secuencia de aa del filtro de selectividad de los canales Shal y Shaker, y la sustituciones presentes en las versiones mutantes.

Tabla 1

Secuencia del filtro de selectividad de los canales tipo Shal y Shaker wt y mutantes.

Canal de K_v wt	Tamaño (aa)	Filtro de Selectividad	Versión Mutante	Posición Cambiada	Cambio de aa
Shaker	571	₃₉₆ TTVGYGD ₄₀₂	Sh^{KS133} *	398	Val a Asp
Shal	490	₃₆₉ TTLGYGD ₃₇₅	Shall371D	371	Leu a Asp

* Gasque et al., 2005; Litchtinghagen et al., 1990.

En el presente trabajo pretendemos expresar a la $K_{v\alpha}$ Shall371D, que potencialmente pueda ser utilizada como dominante negativa para apagar específicamente a los canales Shal nativos en el CF de la mosca adulta viva. Lo anterior se lograría al usar promotores tejido-específicos que permitieran la transcripción restringida de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa a un conjunto definido de células utilizando el sistema Gal4-UAS.

3. Hipótesis.

El cambio de la Leu/L de la posición 371 por un Asp/D en la secuencia del filtro de selectividad del canal Shal resultará en la pérdida de conducción de iones K^+ , del canal formado con estas $Kv\alpha$, por lo tanto, esta versión mutante (ShalL371D) podría funcionar como una molécula dominante negativa cuando se coexpresa con las $Kv\alpha$ wt. Lo que permitirá evaluar el papel de los canales Shal residentes del CF en los procesos de aprendizaje y memoria olfativa en *D. melanogaster*.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo General.

Establecer al menos una línea transgénica de *D. melanogaster* portadora de la inserción *UAS-ShalL371D* que codifica para una $K_{v\alpha}$ dominante negativa para los canales Shal.

4.2 Objetivos Específicos.

4.2.1 Demostrar que la $K_{v\alpha}$ ShalL371D tiene potencial como dominante negativa en un sistema de expresión heterólogo.

- Caracterizar la expresión heteróloga de los canales Shal wt.
- Expresar heterológamente la $K_{v\alpha}$ ShalL371D, para evaluar si la mutación L371D produce un canal incapaz de conducir K^+ .
- Examinar electrofisiológicamente si la $K_{v\alpha}$ ShalL371D tiene potencial como dominante negativa para los canales Shal wt.

4.2.2 Establecer, al menos, una línea transgénica que porte la inserción codificante para la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D (*UAS-ShalL371D*).

4.2.3 Evaluar la viabilidad de moscas transgénicas que expresen ectópicamente la versión ShalL371D a través de cruzas entre individuos de la línea transgénica *UAS-ShalL371D* con moscas que presentan inserciones tejido-específicas del factor Gal4 ("drivers").

- Evaluar la viabilidad de la progenie con el genotipo *UAS-ShalL371D/Act5C-GAL4* a través de cruzas de individuos de la línea *UAS-ShalL371D* con moscas que presentan la inserción *Act5C-GAL4*.
- Evaluar la viabilidad de la progenie con los genotipos *elav-GAL4/X* ó *Y; UAS-ShalL371D/+* a través de cruzas de individuos de la línea *UAS-ShalL371D* con moscas que presentan la inserción *elav-GAL4*.
- Evaluar la viabilidad de la progenie con el genotipo *UAS-ShalL371D/Mef2-GAL4* a través de cruzas de individuos de la línea *UAS-ShalL371D* con moscas que presentan la inserción *Mef2-GAL4*.

4.2.4 Evaluar la viabilidad de la progenie con el genotipo *UAS-Shal371D/7A2-GAL4* a través de cruces de individuos de la línea *UAS-Shal371D* con moscas que presentan la inserción *7A2-GAL4*, como una forma indirecta de evaluar la inhibición de los canales Shal en el CF de *D. melanogaster*.

5. Metodología.

5.1 Expresión heteróloga de las $K_{v\alpha}$ Shal wt y Shall371D en ovocitos de *X. laevis*.

5.1.1 Transcripción *in vitro* de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D.

Para la transcripción *in vitro* de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D del canal Shal se utilizó el sistema mMESSAGE MACHINE® (Ambion, Inc.) y se realizó de acuerdo al protocolo recomendado por este sistema. En resumen, agregamos un μg de DNA templado linearizado de cada una de las $K_{v\alpha}$ (wt y Shall371D) a la solución de reacción que contenía 10 μl de solución NTP/CAP (en mM): ATP 15, CTP 15, UTP 15, GTP 3 y un análogo de 7-metilguanosina 12; 2 μl de solución amortiguadora 10X, 2 μl de solución enzimática de RNA polimerasa y se llevó la reacción a un volumen final de 20 μl con agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 37° C por dos h. Posteriormente, se le añadió un μl de DNasa, para propiciar la degradación del material genético de partida, 30 μl de agua libre de nucleasas y 30 μl de LiCl 7.5 M para inducir la precipitación de los mRNA, agitamos suavemente e incubamos a -20° C por 24 h. Transcurrida la incubación, centrifugamos la mezcla por 15 min a 14,000 rpm para eliminar los nucleótidos no incorporados en la reacción de transcripción. Se retiró el sobrenadante y lavamos la pastilla en dos ocasiones con un ml de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm. Se retiró el etanol y resuspendimos a los mRNA en 30 μl de agua libre de nucleasas. Se cuantificó el mRNA por espectrofotometría y se mantuvo a -70° C.

5.1.2 Obtención de ovocitos de *X. laevis*.

La extracción de los ovocitos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Espinosa *et al.*, 1999. Brevemente, extrajimos los ovocitos de sapos *X. laevis* previamente anestesiadas por inmersión de los organismos en una solución de tricaina (ácido 3-etil-ester-aminobenzóico) al 0.15%. Removimos quirúrgicamente a los ovocitos en estadios V y VI de los lóbulos del ovario. Incubamos a los ovocitos por una h en medio ND96 libre de Ca^{+2} (96 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 , 5 mM de HEPES y 2 mM de ácido pirúvico a pH 7.6) adicionado con 3.6×10^{-4} mg/ml de colagenasa para eliminar a las células foliculares y la membrana que rodea a cada ovocito. Posteriormente, lavamos los ovocitos un mínimo de tres veces con medio ND96 libre de Ca^{2+} . Una vez que los ovocitos se disgregaron, los colocamos en solución ND96 con 1.8 mM de CaCl_2 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de

gentamicina, y se mantuvieron a 18° C por 24 h antes de ser microinyectados con mRNA de las $K_{v\alpha}$.

5.1.3 Expresión de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D.

Después de 24 h de recuperación, microinyectamos a los ovocitos de *X. laevis* con un Microinyector Nanojet II de Drummond Scientific Company. Para la expresión independiente de los canales Shal wt y Shall371D se inyectaron aproximadamente 20 ng de RNA mensajero en cada ovocito. Para las condiciones experimentales de coexpresión de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D microinyectamos ovocitos con diferentes mezclas de los mRNA para las $K_{v\alpha}$, las proporciones inyectadas fueron 3:1, 1:1, 1:3 del canal wt contra el Shall371D. Para estos experimentos se mantuvo constante la concentración inyectada del mRNA wt, y sólo se varió la concentración del mRNA del canal Shall371D. Para predecir la fracción de canales () de una clase particular () de tetrámeros formados, para cada una de las diferentes proporciones inyectadas se utilizó la función de una distribución binomial (**Ecuación 1**), que asume que: 1) cada canal funcional está compuesto por cuatro $K_{v\alpha}$; 2) la concentración de mRNA inyectado es linealmente proporcional a la concentración de proteína resultante; 3) la magnitud de la I_A registrada depende de la concentración del mRNA inyectado; 4) las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D se ensamblan igualmente como canales homo o heterotetrámicos; 5) la incorporación de al menos una $K_{v\alpha}$ Shall371D en un heterotetrámero es suficiente para formar un canal no funcional.

$$P(n) = \frac{n!}{(n-k)!k!} \quad \text{Ecuación 1.}$$

De esta forma, P_1 y P_2 son las probabilidades de inserción en un tetrámero para una $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D, respectivamente. La letra n corresponde al número de eventos independientes que se analizan, en el caso de un canal K_v , $n=4$. Por último, k representa la configuración del tetrámero a analizar con, al menos, k $K_{v\alpha}$ Shall371D insertadas para cada condición experimental. Considerando lo anterior, la I_A total registrada en los ovocitos de *X. laevis* es la suma de la I_A producida por cada tetrámero que no incorporó a alguna $K_{v\alpha}$ Shall371D, es decir, representa el porcentaje de canales wt presentes en el total de la población de canales Shal wt que se expresan en cada condición experimental. Por otra parte, el porcentaje de canales no funcionales y que no

contribuyen a la I_A registrada en cada condición experimental, sería directamente proporcional a la probabilidad binomial acumulada, correspondiente a todos los canales con al menos una $K_{V\alpha}$ Shall371D, obtenida del análisis de distribución binomial (Mathur et al., 1999; MacKinnon, 1991; Ribera et al., 1996).

Una vez que los ovocitos fueron microinyectados los incubamos a 18° C hasta el momento de registrar las I_A macroscópicas por fijación de voltaje con dos electrodos. Como condición control se utilizaron ovocitos microinyectados con el mismo volumen de agua que los ovocitos de las condiciones experimentales.

5.1.4 Registros de las I_A generadas por las $K_{V\alpha}$ wt y Shall371D.

Para el registro de las I_A macroscópicas mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos se utilizaron ovocitos con un mínimo de 24 h y hasta un máximo de 72 h post-inyección a temperatura ambiente (25-30° C). Se utilizó un amplificador de fijación de voltaje (GeneClamp 500; Axon Instruments) con un convertidor analógico/digital de 16-bit (Digidata 1322A; Axon Instruments). Para el registro electrofisiológico, colocamos a los ovocitos en una cámara de registro de 500 μ l y registramos las I_A de células completas en una solución externa (ND96 con 1.8 mM de $CaCl_2$, 50 mg/ml de gentamicina y NMDG) de manera similar al protocolo descrito por Espinosa et al., 1999. Los electrodos de voltaje y corriente contenían una solución interna de KCl 3 M o 150 μ M, 10 mM EGTA y 10 mM HEPES a pH 7.4 con una resistencia de 0.5–1 M Ω . Los pulsos de voltaje se aplicaron cada 3 s a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV. Los registros se muestrearon a una frecuencia de 10 kHz y se filtraron a 2 Khz, con un filtro pasa-bajos tipo Bessel, y se almacenaron en la computadora para su análisis posterior. La adquisición de datos y el análisis se llevaron a cabo utilizando el software pClamp 9, de Axon Instruments. Se restaron las corrientes de fuga y capacitivas usando un protocolo de P/4. Con fines ilustrativos, borramos las espigas capacitivas residuales de los registros mostrados.

5.1.5 Análisis de las propiedades biofísicas de las I_A generadas por las $K_{V\alpha}$ wt y Shall371D.

Para evaluar la correcta expresión de los canales Shal wt se analizaron varios parámetros biofísicos relacionados con la activación e inactivación en estado estacionario de la I_A para compararlos con datos previamente reportados en la literatura.

Para caracterizar el fenómeno de activación de las I_A generadas por los canales Shal wt expresados en ovocitos de *X. laevis*, analizamos la corriente al pico a +20 mV, el umbral de activación, el tiempo para alcanzar el 95% del máximo de la corriente a 0 mV, el voltaje medio de activación a +50 mV y la pendiente de la curva de activación normalizada (constante de Boltzmann, **Ecuación 2**). Para el caso del proceso de la inactivación en estado estacionario de los canales wt se analizó el voltaje medio de inactivación a +50 mV, la pendiente de la curva de inactivación en estado estacionario (Constante de Boltzmann) y la constante de inactivación rápida (τ_{FAST}) a +50 mV. Los parámetros biofísicos antes mencionados se determinaron a partir del ajuste de las curvas de activación e inactivación en estado estacionario utilizando la ecuación de Boltzmann. De donde V_{test} es el potencial de prueba aplicado, $V_{1/2}$ es el potencial al cual se alcanza la mitad de la amplitud máxima, y k es la pendiente que corresponde a la constante de Boltzmann, que se relaciona al cambio en e-veces del rango del potencial cercano a la (López-González et al., 2001).

$$= \frac{I_{max} \exp\left(\frac{V - V_{1/2}}{k}\right)}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{1/2}}{k}\right)} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Para comprobar si la I_A originada por la expresión de los canales wt en el sistema heterólogo de ovocitos de *X. laevis* depende principalmente del ión K^+ como acarreador de carga, calculamos el potencial de inversión teórico a las dos concentraciones de K^+ utilizadas en las soluciones internas ($[K^+]_{int} = 3 \text{ M}$ o $150 \mu\text{M}$), manteniendo constante la concentración de K^+ externa ($[K^+]_{ext} = 2 \text{ mM}$). Comparamos el potencial de reposo registrado en las dos $[K^+]_{int}$ arriba mencionadas con el potencial de inversión teórico, el cual lo determinamos utilizando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$\text{Potencial de inversión teórico} = \frac{[Na^+]_{int} P_{Na} + [K^+]_{int} P_{K} + [Cl^-]_{ext} P_{Cl}}{[Na^+]_{ext} P_{Na} + [K^+]_{ext} P_{K} + [Cl^-]_{int} P_{Cl}}$$

De donde $[Na^+]_{int}$ y $[Na^+]_{ext}$ son las concentraciones de Na^+ intra y extracelular, respectivamente, de manera similar para el Cl^- . P_{Na} es la permeabilidad de Na^+ (1.6×10^{-8}), P_{K} la permeabilidad de K^+ , la cual es 1.6×10^{-6} y P_{Cl} es la permeabilidad del Cl^- (2.24×10^{-6}).

5.1.6 Porcentaje de I_A inhibida por la coexpresión de las K_{vα} wt y Shall371D.

Para determinar el porcentaje de la I_A inhibida por la presencia de la K_{vα} Shall371D en las diferentes proporciones ensayadas experimentalmente, utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de I}_A \text{ inhibida} = 1 - \frac{I_{A(\text{coexpresión})}}{I_{A(\text{wt})}}$$

De donde: $I_{A(\text{coexpresión})}$ representa el máximo de la densidad de la I_A alcanzada a +50 mV en cada condición experimental e $I_{A(\text{wt})}$ representa el máximo de la densidad de la I_A generada únicamente por la expresión de los canales wt a +50 mV. El análisis detallado de los parámetros biofísicos, como la activación y la inactivación en estado estacionario y la conductancia de la I_A resultante de la coexpresión de las K_{vα} wt y Shall371D nos permitió determinar si la K_{vα} Shall371D actuó como una dominante negativa contra los canales Shal wt y explicar el mecanismo molecular responsable del fenotipo dominante negativo.

5.1.7 Análisis estadístico de los parámetros biofísicos.






A menos que se mencione de otra forma, los datos (símbolos y las gráficas) se presentan como el promedio ± el error estándar de la media (E.E.M.). El número (n) de experimentos se indica en los pies de Figura. La diferencia estadística entre dos promedios se determinó por la prueba T de Student. Los promedios se consideraron estadísticamente diferentes cuando se obtuvo una $p < 0.05$.

5.1.8 La probabilidad binomial de la coexpresión de las K_{vα} wt y Shall371D.

Dado que un canal K_v funcional está formado por la asociación de cuatro K_{vα}, las cinco posibles configuraciones que se pueden obtener al coexpresar dos versiones de la K_{vα} de un canal K_v aparecen en la **Tabla 2**.

Configuraciones obtenidas de la coexpresión de dos versiones de la $K_{v\alpha}$ del canal Shal.

Tabla 2

	Homotetrámero wt	Heterotetrámeros			Homotetrámero o mutante
Diagrama de los tetrámeros formados.					
No. de $K_{v\alpha}$ Shall371D presentes en el tetrámero.	0	1	2	3	4

Vale la pena hacer notar que la probabilidad binomial, de acuerdo a la distribución binomial (**Ecuación 1**) para cada una de las cinco configuraciones posibles, depende de la probabilidad específica de incorporación al tetrámero (para formar un canal funcional) para cada configuración del canal iónico; es decir, está directamente relacionada con la proporción del mRNA inyectado para las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D. Así, por ejemplo, cuando inyectamos la proporción 3:1 de canales wt y Shall371D, la probabilidad específica de incorporación al tetrámero fue de $\frac{3}{4}$ ($p=0.75$) para Shal wt y $\frac{1}{4}$ ($p=0.25$) para Shall371D. Para el análisis de la probabilidad binomial, consideramos que durante el experimento de coexpresión con la proporción 3:1, los valores de probabilidad específica de incorporación al tetrámero son constantes. Condición necesaria para este tipo de análisis (Mathur *et al.*, 1999; MacKinnon, 1991; Ribera *et al.*, 1996). Donde $P(k)$ es la probabilidad binomial de la incorporación de k dominantes negativos al tetrámero ($n=4$), k es el número de $K_{v\alpha}$ necesarias para formar un tetrámero o canal, y p es la probabilidad de éxito de incorporación de, al menos, una dominante negativa determinado por la proporción de $K_{v\alpha}$ Shall371D inyectada (en este caso, $p=0.25$). Desarrollando las ecuaciones para el ejemplo descrito tenemos que:

Probabilidad binomial para cero $K_{v\alpha}$ Shall371D (canal wt):




$$P(0) = \frac{4!}{(4-0)! 0!} (0.75)^4 (0.25)^0 = 0.3164$$

Probabilidad binomial para una $K_{v\alpha}$ Shall371D:




$$P(1) = \frac{4!}{(4-1)! 1!} (0.75)^3 (0.25)^1 = 0.4219$$

Probabilidad binomial para dos $K_{V\alpha}$ Shall371D:




$$\binom{2}{k} = \frac{2!}{(2-k)!k!} \left(\frac{1}{2} \right)^k \left(\frac{1}{2} \right)^{2-k} = .$$

Probabilidad binomial para tres $K_{V\alpha}$ Shall371D:



$$\binom{3}{k} = \frac{3!}{(3-k)!k!} \left(\frac{1}{3} \right)^k \left(\frac{2}{3} \right)^{3-k} = .$$

Probabilidad binomial para cuatro $K_{V\alpha}$ Shall371D:



$$\binom{4}{k} = \frac{4!}{(4-k)!k!} \left(\frac{1}{4} \right)^k \left(\frac{3}{4} \right)^{4-k} = .$$

En el presente trabajo utilizamos el programa “binomial calculator” (Lane, D. M.). Esta misma metodología se utilizó para calcular las probabilidades binomiales correspondientes a los experimentos en los que se coexpresó a las $K_{V\alpha}$ wt y Shall371D en las proporciones 1:1 y 1:3, en la **Tabla 3** se muestra los valores calculados para estas proporciones.

5.1.8.1 La probabilidad binomial acumulada para la $K_{V\alpha}$ Shall371D.

La probabilidad acumulada en una distribución binomial corresponde a la suma de probabilidades binomiales de las condiciones experimentales de interés. En nuestro caso, la probabilidad binomial acumulada corresponde a la suma de las probabilidades binomiales obtenidas para cada una de las distintas configuraciones de los canales que incorporaron de una a cuatro $K_{V\alpha}$ Shall371D. De esta forma, la probabilidad binomial acumulada debería correlacionar con el porcentaje de I_A inhibida en cada condición experimental ensayada pues correspondería al porcentaje de los canales I_A expresados en el ovocito de *X. laevis* que incorporaron de una a cuatro $K_{V\alpha}$ Shall371D. En el ejemplo desarrollado en el párrafo anterior, la probabilidad binomial acumulada de la incorporación de una a cuatro $K_{V\alpha}$ Shall371D sería igual a 0.683, en la **Tabla 3** se muestra el valor de las probabilidades binomiales para las proporciones realizadas en esta parte del trabajo.

Tabla 3 Probabilidad binomial de la incorporación de $K_{v\alpha}$ ShalL371D al tetrámero, $()_i$, en las diferentes proporciones de mRNA inyectados de las $K_{v\alpha}$ wt y ShalL371D.

Proporción Shal wt : ShalL371D	3 : 1	1 : 1	1 : 3
Probabilidad específica de incorporación al tetrámero $()_i$.	0.75 : 0.25	0.5 : 0.5	0.25 : 0.75
$()_i = 0$	0.32	0.063	0.003
$()_i = 1$	0.42	0.25	0.05
$()_i = 2$	0.21	0.375	0.21
$()_i = 3$	0.05	0.25	0.42
$()_i = 4$	0.003	0.063	0.32
Probabilidad binomial acumulada de la incorporación de una a cuatro $K_{v\alpha}$ ShalL371D al tetrámero.	0.683	0.938	0.997

5.2 "Stocks" y líneas de *D. melanogaster* transgénicas.

En el laboratorio, el Dr. Enrique Reynaud Garza y Sofía González Salinas, realizaron las construcciones moleculares del transgen *UAS-ShalL371D* para generar moscas transgénicas que eventualmente expresen a la $K_{v\alpha}$ ShalL371D, bajo el control del factor transcripcional Gal4. Así mismo, se generaron moscas transgénicas con la inserción *UAS-Shabi¹⁰* codificante para un RNAi contra los mRNA de los canales Shab.

Como un primer acercamiento para la evaluación de la línea *UAS-ShalL371D* *in vivo*, investigamos en las bases de datos el patrón de expresión de los canales Shal en *D. melanogaster*. En el atlas de la expresión génica de la mosca se reporta que los canales Shal se expresan de manera abundante en el cerebro, en el corazón, en el ojo, en el ganglio torácico abdominal, en la glándula salival de adulto y en el tracto gastrointestinal de adulto y de larva (Chintapalli et al., 2007; ver **Tabla 4**). Por lo tanto, para el desarrollo de este trabajo, se seleccionaron líneas "drivers" que dirigieran la expresión del activador de la transcripción GAL4 a tejidos en donde se ha reportado la expresión de los canales Shal. De esta forma elegimos los "drivers" *Act5C-GAL4*, *elav-GAL4* y *Mef2-GAL4*, que dirigen la expresión: a todo el organismo, al SN y a miocitos *D. melanogaster*,

respectivamente (ver **Tabla 4**). Las líneas “drivers” se obtuvieron del *D. melanogaster* Stock Center en Bloomington, Indiana, USA.

La línea *UAS-Shali* se obtuvo del National Institute of Genetics de Japón (**NIG-Fly**). Las líneas de moscas con la inserción codificante para la proteína Dicer-2 (*UAS-dcr2*) en el cromosoma II y III, y las líneas *UAS-ShabiC2VT1* y *UAS-ShabiC3LT3* se obtuvieron del Vienna *D. melanogaster* Research Center (**VDRC**) de Austria. Para mayor información sobre estas líneas ver la **Tabla 5**. La línea *7A2-GAL4* se obtuvo en un trabajo previo en nuestro laboratorio realizado por el Dr. Enrique Reynaud Garza (Gasque et al., 2005). Las líneas de moscas transgénicas utilizadas para el desarrollo de este trabajo se mantuvieron a 18° C o a 25° C y se alimentaron con comida a base de maíz. La comida de las moscas está compuesta de 9 g de agar, 48.75 g de dextrosa, 21g de levadura y 21 g de sacarosa, 60 g de comida de maíz (“cornmeal”) para un litro; a esto se le agregan 4 ml de ácido propiónico como antimicótico.

Tabla 4

Principales tejidos de *D. melanogaster* en los que se ha detectado la expresión de los canales Shal y a los que los distintos “drivers” utilizados dirigen la expresión de las moléculas de interés.

Tejido	Canales Shal	“Drivers”			
		<i>Act5C</i>	<i>Elav</i>	<i>7A2</i>	<i>Mef2</i>
Cabeza	ND	Alta	ND	ND	Nula
Cerebro	Alta	Baja	Alta	Alta	Nula
Corazón	Alta	Alta	Alta	ND	Alta
Ojo	Alta	Baja	Alta	ND	Baja
Ganglio torácico abdominal	Alta	Baja	Alta	ND	Baja
Tracto gastrointestinal adulto	Alta	Alta	Baja	ND	Alta
Tracto gastrointestinal larva	Alta	Alta	ND	ND	Alta

Chintapalli et al., 2007. No Detectado (ND).

Tabla 5 Líneas de *D. melanogaster* transgénicas utilizadas para el desarrollo de este trabajo, adquiridas en diferentes colecciones de moscas.

Línea	Procedencia	Datos de acceso	C.*	Secuencia Efectora
Act5C-GAL4	Bloomington Stock Center	Num. Stock: 4414	II	Gen <i>Gal4</i> de levadura bajo el promotor del gen <i>Act5C</i> de <i>D. melanogaster</i> .
elav-GAL4	Bloomington Stock Center	Num. Stock: 458	X	Gen <i>Gal4</i> de levadura bajo el promotor del gen <i>elav</i> de <i>D. melanogaster</i> .
Mef2-GAL4	Bloomington Stock Center	Num. Stock: 27390	II	Gen <i>Gal4</i> de levadura bajo el promotor del gen <i>Mef2</i> de <i>D. melanogaster</i> .
UAS-Shali	NIG-Fly	Num. Stock: 9262R-1 CG: 9262	III	Secuencia codificante para un RNAi contra el mRNA del gen <i>Shal</i> .
UAS-ShabiC2VT1	VDRC	Transformant ID: 46887 Construct ID: 17190 CG: 1066	II	Secuencia codificante para un RNAi contra el mRNA del gen <i>Shab</i> .
UAS-ShabiC3LT3	VDRC	Transformant ID: 46889 Construct ID: 17190 CG: 1066	III	Secuencia codificante para un RNAi contra el mRNA del gen <i>Shab</i> .
UAS-dcr2	VDRC	Num. Stock: 60008	II	Gen <i>dcr2</i> río abajo de secuencias <i>UAS</i> de levadura.
UAS-dcr2	VDCR	Num. Stock: 60009	III	Gen <i>dcr2</i> río abajo de secuencias <i>UAS</i> de levadura.

* Cromosoma.

5.3 Mantenimiento, balanceo y cruza de las líneas *D. melanogaster*.

5.3.1 Genotipificación con cromosomas balanceadores.

Parte del trabajo experimental se llevo a cabo con *D. melanogaster* por lo que hay que definir algunos conceptos básicos de la genética de las moscas y del uso de los cromosomas balanceadores. *D. melanogaster* tiene cuatro pares de cromosomas, los cromosomas sexuales (X y Y) y los cromosomas somáticos (II y III), por lo que la anotación de un genotipo específico puede ser reducida a unas cuantas reglas.

- El genotipo de un cromosoma específico se escribe sólo si presenta una mutación o alguna otra clase de variación genética, de lo contrario, se considera como fenotipo wt. En el caso de que el alelo de un cromosoma sea wt se denota por el símbolo "+".
- Los genotipos de diferentes cromosomas se separan por punto y coma (;). Ejemplo: 1^{er} cromosoma (sexual); 2^{do} cromosoma; 3^{er} cromosoma.
- Las diferencias entre los alelos de los pares cromosomales se indican por diagonales (/) denotando que es un genotipo heterocigoto, la falta de diagonal indica que el cromosoma es homocigoto. Ejemplo: 1^{er} cromosoma (sexual)/2^{do} cromosoma sexual; Alelo 1 del 2^{do} cromosoma / Alelo 2 del 2^{do} cromosoma; etc. (Greenspan, 1997).

Para evitar la recombinación entre los cromosomas homólogos y favorecer la estabilidad y el mantenimiento de las inserciones de nuestros genes de interés se utilizan cromosomas balanceadores. Los cromosomas balanceadores son cromosomas que tienen rearrreglos cromosómicos, tales como inversiones o traslocaciones, que impiden la recombinación con el cromosoma homólogo wt. Además, los cromosomas balanceadores presentan genes con mutaciones dominantes que codifican para marcadores fenotípicos fácilmente reconocibles, por lo que se puede rastrear fácilmente a la progenie que los hereda. Además los cromosomas balanceadores poseen mutaciones homocigas letales por lo que los individuos que los poseen necesariamente sobreviven sólo como heterocigos. En el laboratorio contamos con una línea de moscas que presenta dos cromosomas balanceadores, denominada doble "balancer" (**DB**), los cuales son los siguientes:

- *In(2LR)O*, Cy coloquialmente *Curly of Oster (CyO)*: es uno de los cromosomas balanceadores del cromosoma II, el cual evita que haya recombinación en este cromosoma, posee una mutación dominante llamada *Curly (Cy)* que determina la presencia de alas rizadas mientras que el fenotipo wt son alas planas.
- *Sternopleural (Sp)*: mutación dominante en el gen *Sp*, en el cromosoma II, que aumenta el número de quetas en la región esternopleural.
- *MKRS*: cromosoma con pocas inversiones que suprime el entrecruzamiento en el tercer cromosoma está asociado a una mutación en el gen *Sb*, que genera individuos con quetas cortas y gruesas, las quetas wt son largas y delgadas.

- *TM2*: cromosoma balanceador que elimina la recombinación en el cromosoma III, está asociado a una mutación en el gen *Ubx*, ocasionando cambios en la morfología del halterio de la mosca de alargado y liso (wt) a redondo y con la presencia de quetas (el número puede variar) en la parte anterior del halterio (Greenspan, 1997; Lindsley & Zimm, 1992).

La inserción del transgen *UAS-ShalL371D* en el cromosoma II se mantiene utilizando como balanceador el cromosoma *CyO* por lo que el genotipo de estas moscas es *UAS-ShalL371D¹⁷/CyO*. De esta misma forma, antes de evaluar la funcionalidad tanto de la *Kvα ShalL371D* así como de los RNAi contra los mRNA de los canales *Shal* y *Shab* en la mosca, procedimos a balancear los transgenes en las diferentes líneas de moscas utilizadas en el desarrollo de este trabajo, de acuerdo al cromosoma donde se insertó el transgen correspondiente. Para este fin, se llevaron a cabo cruzas de las líneas transgénicas con la línea DB que nos permitió obtener individuos con genotipos que incluyen a los transgenes de interés combinados en algunos casos, con un cromosoma balanceador y/o con cromosomas con marcadores fenotípicos fáciles de identificar. De esta forma se facilitó el seguimiento de los genotipos deseados.

5.3.2 Balanceo de la línea *UAS-Shali*.

Dado que la inserción *UAS-Shali* se encuentra en el cromosoma II, algunos machos con genotipo *UAS-Shali/UAS-Shali* se cruzaron con moscas hembras vírgenes DB (*CyO/Sp; MKRS/TM2*). De la progenie resultante se seleccionaron machos con el genotipo de *CyO/+; UAS-Shali/MKRS*. Los marcadores *Cy* (de *CyO*) y *Sb* (de *MKRS*) se seleccionaron por ser de fácil identificación. Los machos seleccionados se cruzaron nuevamente con hembras vírgenes DB y de esta cruce se seleccionaron moscas de la clase *CyO/Sp; UAS-Shali/MKRS* para fundar una línea estable con este genotipo lo que nos permitió rastrear la inserción de interés en cruces posteriores. De esta última cruce se esperaban 16 clases pero siete de ellas fueron letales por heredar cromosomas balanceadores en estado homocigoto. En el **Esquema 1** se muestran los genotipos de las clases esperadas para cada una de las cruces realizadas.

Esquema 1 Cruzas realizadas para balancear a la línea transgénica *UAS-Shali*.

A) La progenie obtenida de esta cruce produjo cuatro clases en donde se balancea la inserción de *UAS-Shali* en el cromosoma III. De esta cruce se utilizaron las moscas con el genotipo *CyO/+; UAS-Shali/MKRS*, en negritas. **B)** De esta cruce se obtuvieron 16 clases, de las cuales siete no son viables. Para fundar la línea estable se utilizaron los organismos con el genotipo *CyO/Sp; UAS-Shali/MKRS*, en negritas.

A	Machos		X	Hembras vírgenes	
	<i>UAS-Shali/UAS-Shali</i>			<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
	Alelos y/ó cromosomas			+; <i>UAS-Shali</i>	
	<i>CyO; MKRS</i>			<i>CyO/+; UAS-Shali/MKRS</i>	
	<i>CyO; TM2</i>			<i>CyO/+; UAS-Shali/TM2</i>	
	<i>Sp; MKRS</i>			<i>Sp/+; UAS-Shali/MKRS</i>	
	<i>Sp; TM2</i>			<i>Sp/+; UAS-Shali/TM2</i>	

B	Machos		X	Hembras vírgenes	
	<i>CyO/+; UAS-Shali/MKRS</i>			<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
Alelos y/ó cromosomas	<i>CyO; UAS-Shali</i>	<i>CyO; MKRS</i>		+; <i>UAS-Shali</i>	+; <i>MKRS</i>
<i>CyO; MKRS</i>	LETAL	LETAL		<i>CyO/+; UAS-Shali/MKRS</i>	LETAL
<i>CyO; TM2</i>	LETAL	LETAL		<i>CyO/+; UAS-Shali/TM2</i>	<i>CyO/+; MKRS/TM2</i>
<i>Sp; MKRS</i>	<i>CyO/Sp; UAS-Shali/MKRS</i>	LETAL		<i>Sp/+; UAS-Shali/MKRS</i>	LETAL
<i>Sp; TM2</i>	<i>CyO/Sp; UAS-Shali/TM2</i>	<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>		<i>Sp/+; UAS-Shali/TM2</i>	<i>Sp/+; MKRS/TM2</i>

5.3.3 Establecimiento de la línea *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS*.

En el VDCR reportan que en ocasiones los RNAi no funcionan adecuadamente en *D. melanogaster*, dando como resultado fenotipos wt. En otros casos, los fenotipos son hipomorfos, lo que es consistente con reducciones parciales en los niveles del mRNA blanco a causa de los RNAi. Trabajos previos demostraron que la sobreexpresión de varios de los componentes de la maquinaria implicada en el procesamiento de los RNAi, como la proteína Dicer-2, favorecen el funcionamiento adecuado de los RNAi experimentales. Por lo que, en estos trabajos concluyeron que Dicer-2 es un factor limitante en el silenciamiento de genes mediante RNAi en *D. melanogaster* (Dietzl et al.,

2007). Con base en este dato, generamos líneas que presentan inserciones codificantes tanto para los RNAi contra los canales Shal y Shab como para la proteína Dicer-2 con el fin de obtener un fenotipo robustecido del efecto del RNAi. Con este objetivo, una vez que se obtuvo la línea *CyO/Sp; UAS-Shali/MKRS* estable, seleccionamos machos de esta línea y se cruzaron con hembras vírgenes *UAS-dcr2/UAS-dcr2; MKRS/TM2*. De la progenie obtenida de esta cruce, se seleccionaron moscas de la clase *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* para fundar una línea estable. En el **Esquema 2** se muestran las clases esperadas de esta cruce.

Esquema 2 Cruza realizada para obtener la línea *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS*.

A partir de las moscas *CyO/Sp; UAS-Shali/MKRS* de la cruce anterior (**Esquema 1**) y moscas de la línea *UAS-dcr2* (*UAS-dcr2/UAS-dcr2; MKRS/TM2*), se obtuvieron ocho clases. Dos de ellas no viables. De esta cruce se seleccionaron las moscas con el genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS*, en negritas.

Machos <i>CyO/Sp; UAS-Shali/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>UAS-dcr2/UAS-dcr2; MKRS/TM2</i>
Alelos y/ó cromosomas	<i>UAS-dcr2; MKRS</i>	<i>UAS-dcr2; TM2</i>
<i>CyO; UAS-Shali</i>	<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i>	<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/TM2</i>
<i>CyO; MKRS</i>	LETAL	<i>UAS-dcr2/CyO; MKRS/TM2</i>
<i>Sp; UAS-Shali</i>	<i>UAS-dcr2/Sp; UAS-Shali/MKRS</i>	<i>UAS-dcr2/Sp; UAS-Shali/TM2</i>
<i>Sp; MKRS</i>	LETAL	<i>UAS-dcr2; MKRS/TM2</i>

5.3.4 Balanceo y establecimiento de las líneas con RNAi contra los mRNA de los canales Shab.

La línea *UAS-Shali* se adquirió como un control positivo de la inhibición funcional generalizada de los canales Shal y para comparar con el fenotipo observado por la expresión de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D. Entre los canales K_v más relacionados con los canales Shal están los de las subfamilias Shaker, Shab y Shaw (Salkoff et al., 1992; Wei et al., 1990). Por datos generados en el laboratorio sabemos que la inhibición de los canales Shaw tanto por el uso de una $K_{v\alpha}$ dominante negativa como por RNAi es letal para *D. melanogaster* (Oceguera, 2008); sin embargo, la inhibición funcional de los canales Shaker no afecta la viabilidad de la mosca (Gasque et al., 2005; Litchtinghagen et al., 1990). Se ha reportado que mutaciones puntuales dentro de la secuencia del gen que codifica para la familia de los canales Shab afectan la amplitud de la I_R , pero no se ha reportado alguna

implicación en la viabilidad de *D. melanogaster* (Hedge *et al.*, 1999; Peng & Wu, 2007). Para descartar que el fenotipo observado fuera debido a la inhibición de otro canal Kv relacionado con los canales Shal, específicamente los canales Shab, en el laboratorio el Dr. Enrique Reynaud Garza y Sofía González Salinas generaron la línea *UAS-Shabi*¹⁰ con una inserción en el cromosoma II codificante para un RNAi contra los mRNA de los canales Shab y se adquirieron del VDCR dos líneas (*UAS-ShabC2VT1* y *UAS-ShabiC3LT3*) que presentan en su genoma la inserción de un RNAi contra los mRNA de los canales Shab.

La línea *UAS-Shabi*¹⁰, previamente balanceada con *CyO*, se cruzó con moscas vírgenes DB para obtener individuos con un genotipo marcado también en el cromosoma III. De esta cruce se seleccionaron moscas machos con el genotipo *UAS-Shabi*¹⁰/*CyO*; *MKRS*/+ para cruzarlas nuevamente con moscas hembras vírgenes DB y de esta forma seleccionar las moscas con el genotipo *UAS-Shabi*¹⁰/*CyO*; *MKRS*/*TM2*. Las clases esperadas para estas dos últimas cruces se muestran en el **Esquema 3**.

Como un último paso, seleccionamos individuos con el genotipo *UAS-Shabi*¹⁰/*CyO*; *MKRS*/*TM2* y se cruzaron con moscas de la línea *UAS-dcr2*, con genotipo *CyO*/*Sp*; *UAS-dcr2*/*TM2*, para obtener moscas con el genotipo *UAS-Shabi*¹⁰/*CyO*; *UAS-dcr2*/*MKRS* para cruces posteriores, en el **Esquema 4** se muestran las clases esperadas de esta cruce.

Esquema 3

Cruzas realizadas para el balanceo de la línea *UAS-Shabi¹⁰*.

A) La progenie obtenida de esta cruce produjo ocho clases, dos de las cuales no son viables. De esta cruce se utilizaron las moscas con el genotipo *UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/+*. **B)** Se obtuvieron 16 clases de esta cruce, ocho de ellas letales. De esta cruce se utilizaron los organismos con el genotipo *Shabi¹⁰/CyO; MKRS/TM2*. En negritas se muestran las clases de interés para cada cruce.

A	Machos		X	Hembras vírgenes	
	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; +/+</i>			<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
	Alelos y/ó cromosomas		<i>UAS-Shabi¹⁰; +</i>		<i>CyO; +</i>
	<i>CyO; MKRS</i>		<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/+</i>		LETAL
	<i>CyO; TM2</i>		<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; TM2/+</i>		LETAL
	<i>Sp; MKRS</i>		<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; MKRS/+</i>		<i>CyO/Sp; MKRS/+</i>
	<i>Sp; TM2</i>		<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; TM2/+</i>		<i>CyO/Sp; TM2/+</i>

B	Machos		X	Hembras vírgenes	
	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/+</i>			<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
	Alelos y/ó cromosomas		<i>UAS-Shabi¹⁰; +</i>		<i>CyO; MKRS</i> <i>CyO; +</i>
	<i>CyO; MKRS</i>	LETAL	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/+</i>	LETAL	LETAL
	<i>CyO; TM2</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/TM2</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; TM2/+</i>	LETAL	LETAL
	<i>Sp; MKRS</i>	LETAL	<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; MKRS/+</i>	LETAL	<i>CyO/Sp; MKRS</i>
	<i>Sp; TM2</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; MKRS/TM2</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; TM2/+</i>	LETAL	<i>CyO/Sp; TM2/+</i>

Esquema 4

Establecimiento de la línea *UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS*.

A partir de las moscas *Shabi¹⁰/CyO; MKRS/TM2* de la cruce anterior (**Esquema 3**) y moscas de la línea *UAS-dcr2 (CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2)*, se obtuvieron 16 clases. Ocho de ellas no son viables. De esta cruce se seleccionaron las moscas con el genotipo *UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS*, en negritas.

Alelos y/ó cromosomas	Machos		X	Hembras vírgenes	
	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/TM2</i>			<i>CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2</i>	
	<i>CyO; UAS-dcr2</i>	<i>CyO; TM2</i>	<i>Sp; UAS-dcr2</i>		<i>Sp; TM2</i>
<i>UAS-Shabi¹⁰; MKRS</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/TM2</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; UAS-dcr2/MKRS</i>		<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; MKRS/TM2</i>
<i>UAS-Shabi¹⁰; TM2</i>	LETAL	LETAL	<i>UAS-Shabi¹⁰/Sp; UAS-dcr2/TM2</i>		LETAL
<i>CyO; MKRS</i>	LETAL	LETAL	<i>CyO/Sp; UAS-dcr2/MKRS</i>		<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>
<i>CyO; TM2</i>	LETAL	LETAL	<i>CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2</i>		LETAL

5.3.4.1 Establecimiento de la línea *UAS-ShabiC2VT1*.

Para confirmar los resultados de la inducción de la inhibición de los mRNA de los canales Shab, mediante el uso del RNAi Shabi¹⁰, se utilizaron las líneas *UAS-ShabiC2VT1* y *UAS-ShabiC3LT3* del VDRC. El proceso de balanceo de la línea *UAS-ShabiC2VT1* inició por la selección de moscas machos con genotipo *UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1* para cruzarlas con moscas hembras vírgenes DB. De esta craza se seleccionaron moscas machos de la clase *UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+* para cruzarlas con moscas hembras vírgenes DB, las clases esperadas para estas dos cruzas se muestran en el **Esquema 5**.

Posteriormente, se seleccionaron moscas machos de la clase *UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/TM2* para cruzarlas con hembras vírgenes con genotipo *CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2* para obtener moscas que porten las inserciones de las secuencias codificantes para el RNAi contra los mRNA de los canales Shab así como para el gen de la proteína Dicer-2. Estas moscas presentan el genotipo *UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/MKRS*, y portan marcadores fenotípicos que nos permiten rastrear la presencia de las inserciones en cruzas posteriores. Para mayor detalle de las diferentes clases esperadas en la craza ver el **Esquema 6**.

Esquema 5

Cruzas realizadas para el balanceo de la línea *UAS-ShabiC2VT1*.

A) La progenie obtenida de esta cruce produjo cuatro clases, de estas clases sólo se utilizaron las moscas con el genotipo *UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+*. **B)** En la cruce para la obtención de las moscas *ShabiC2VT1* balanceadas se generan 16 clases, siete de las cuales no son viables. De esta cruce se mantuvieron los organismos con el genotipo *UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/TM2*.

A		Machos	X	Hembras vírgenes	
		<i>UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; +/+</i>		<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
Alelos y/ó cromosomas		<i>UAS-ShabiC2VT1; +</i>			
<i>CyO; MKRS</i>		<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+</i>			
<i>CyO; TM2</i>		<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; TM2/+</i>			
<i>Sp; MKRS</i>		<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; MKRS/+</i>			
<i>Sp; TM2</i>		<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; TM2/+</i>			

B		Machos	X	Hembras vírgenes	
		<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+</i>		<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
Alelos y/ó cromosomas		<i>UAS-ShabiC2VT1; MKRS</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1; +</i>	<i>CyO; MKRS</i>	<i>CyO; +</i>
<i>CyO; MKRS</i>	LETAL	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+</i>	LETAL	LETAL	LETAL
<i>CyO; TM2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/TM2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; TM2/+</i>	LETAL	LETAL	LETAL
<i>Sp; MKRS</i>	LETAL	<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; MKRS/+</i>	LETAL	<i>CyO/Sp; MKRS/+</i>	
<i>Sp; TM2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; MKRS/TM2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; TM2/+</i>	<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	<i>CyO/Sp; TM2/+</i>	

Esquema 6Cruza realizada para obtener a la línea *UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/MKRS*.

A partir de las moscas *ShabiC2VT1/CyO; MKRS/TM2* de la cruce anterior (**Esquema 5**) y moscas de la línea *UAS-dcr2 (CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2)*, se obtuvieron 16 clases. Siete de ellas no son viables. De esta cruce se seleccionaron las moscas con el genotipo *UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/MKRS*.

Alelos y/ó cromosomas	Machos	X	Hembras vírgenes	
	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/TM2</i>		<i>CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2</i>	<i>CyO; MKRS</i>
	<i>UAS-ShabiC2VT; MKRS</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1; TM2</i>	<i>CyO; MKRS</i>	<i>CyO; TM2</i>
<i>CyO; UAS-dcr2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/MKRS</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/TM2</i>	LETAL	LETAL
<i>CyO; TM2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/TM2</i>	LETAL	LETAL	LETAL
<i>Sp; UAS-dcr2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; UAS-dcr2/MKRS</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; UAS-dcr2/TM2</i>	<i>CyO/Sp; UAS-dcr2/MKRS</i>	<i>CyO/Sp; UAS-dcr2/TM2</i>
<i>Sp; TM2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Sp; MKRS/TM2</i>	LETAL	<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	LETAL

5.3.4.2 Establecimiento de la línea *UAS-ShabiC3LT3*.

Para el caso de la línea *UAS-ShabiC3LT3*, se seleccionaron moscas machos con el genotipo *UAS-ShabiC3LT3/+* para cruzarlas con moscas hembras vírgenes DB. De esta cruce se seleccionaron moscas machos con el genotipo *CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS* y se cruzaron también con moscas DB. Las clases esperadas de las cruces para balancear la línea *UAS-ShabiC3LT3* se muestran en el **Esquema 7**.

De la progenie resultante se seleccionaron moscas machos con el genotipo *CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS*. Por último, las moscas macho *CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS* se cruzaron con moscas hembras vírgenes con genotipo *UAS-dcr2/UAS-dcr2; MKRS/TM2* para, de esta forma, obtener una línea estable de moscas con el genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS* para cruces posteriores. Para mayor detalle de la cruce ver el **Esquema 8**.

Esquema 7 Cruzas realizadas para el balanceo de la línea de moscas *UAS-ShabiC3LT3*.

A) La progenie obtenida de esta cruce produjo ocho clases, de las que se seleccionó el genotipo *CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS*. **B)** En la cruce de las moscas *UAS-ShabiC3LT3* con la línea DB se generan 16 clases de las cuales siete no son viables. Se conservaron los organismos con el genotipo *CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS*.

A	Machos <i>+/+; UAS-ShabiC3LT3/+</i>		X	Hembras vírgenes <i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
	Alelos y/ó cromosomas	<i>+/+; UAS-Shabi C3LT3</i>		<i>+/+</i>	
	<i>CyO; MKRS</i>	<i>CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>		<i>CyO/+; MKRS/+</i>	
	<i>CyO; TM2</i>	<i>CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>		<i>CyO/+; TM2/+</i>	
	<i>Sp; MKRS</i>	<i>Sp/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>		<i>Sp/+; MKRS/+</i>	
	<i>Sp; TM2</i>	<i>Sp/+; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>		<i>Sp/+; TM2/+</i>	

B	Machos <i>CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>		X	Hembras vírgenes <i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	
	Alelos y/ó cromosomas	<i>CyO; UAS-ShabiC3LT3</i>		<i>+/+; UAS-ShabiC3LT3</i>	<i>CyO; MKRS</i>
<i>CyO; MKRS</i>	LETAL	<i>CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>	LETAL	LETAL	
<i>CyO; TM2</i>	LETAL	<i>CyO/+; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>	LETAL	<i>CyO/+; MKRS/TM2</i>	
<i>Sp; MKRS</i>	<i>CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>	<i>Sp/+; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>	LETAL	LETAL	
<i>Sp; TM2</i>	<i>CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>	<i>Sp/+; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>	<i>CyO/Sp; MKRS/TM2</i>	<i>Sp/+; MKRS/TM2</i>	

Esquema 8 Establecimiento de la línea *UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS*.

A partir de las moscas *CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS* de la cruce anterior (**Esquema 7**) y moscas de la línea *UAS-dcr2* (*UAS-dcr2/UAS-dcr2; MKRS/TM2*), se obtuvieron ocho clases. Dos de las cuales no son viables. Se seleccionaron moscas con el genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS*.

Machos <i>CyO/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>		X	Hembras vírgenes <i>UAS-dcr2/UAS-dcr2; MKRS/TM2</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>UAS-dcr2; MKRS</i>	<i>UAS-dcr2; TM2</i>
<i>CyO; UAS-ShabiC3LT3</i>	<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>		<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>
<i>CyO; MKRS</i>	LETAL		<i>UAS-dcr2/CyO; MKRS/TM2</i>
<i>Sp; UAS-ShabiC3LT3</i>	<i>UAS-dcr2/Sp; UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>		<i>UAS-dcr2/Sp; UAS-ShabiC3LT3/TM2</i>
<i>Sp; MKRS</i>	LETAL		<i>UAS-dcr2/Sp; MKRS/TM2</i>

5.3.5 Expresión tejido-específica de las secuencias efectoras.

La inducción de la expresión de los transgenes efectores (*UAS-secuencias efectoras*) que se encuentran bajo la regulación del sistema *GAL4-UAS* se realizó mediante cruces con líneas que expresan al factor de transcripción *Gal4* bajo diferentes patrones tejido-específicos ("drivers"), obtenidas por el método del "enhancer trap". Así, de la F1 de estas cruces se obtiene progenie de distintas clases: i) las que heredan tanto al factor transcripcional *Gal4* como a los transgenes efectores (clases experimentales), ii) las clases que sólo heredan a uno de los dos elementos del sistema bipartito (*UAS-secuencia efectora* o *enhancer-GAL4*), por lo tanto, no deberían expresar a la secuencia efectora de interés ó iii) ninguno de ellos pues heredan sólo los cromosomas de la línea DB, y mueren, o cromosomas wt, estas dos últimas clases consideradas como clases control. Con base en la contabilización de la progenie se puede determinar si la expresión de un transgen efector produce un fenotipo de letalidad, semiletalidad o no causa ningún efecto sobre la viabilidad de *D. melanogaster*.

5.3.6 Cuantificación de la progenie de la F1 y normalización de los datos de viabilidad.

Para determinar la progenie esperada para cada clase de la F1, tanto para moscas hembras como para machos, se cuantificó el número de organismos que llegaron a etapa adulta en las clases control de acuerdo a la distribución mendeliana específica

para el esquema de cruces respectivo (organismos que heredan sólo cromosomas wt, cromosomas con la inserción *UAS*-secuencia efectora o cromosomas con la inserción *enhancer-GAL4*, independientemente) y se consideraron que representaban al total de organismos. Posteriormente, se calculó el número correspondiente de organismos para cada clase multiplicando el total de los organismos adultos de las clases control por la fracción poblacional que correspondía para cada clase esperada. El número de moscas eclosionadas adultas vivas para cada clase se dividió por el número de moscas esperadas para la clase correspondiente determinado anteriormente, con el objetivo de normalizar los datos y disminuir el efecto de la variabilidad propia de cada condición experimental (Vázquez et al., 2008).

5.3.9 Análisis estadístico de los datos de viabilidad.

Los datos normalizados de viabilidad o supervivencia representan el promedio obtenido para cada genotipo \pm el error estándar de la media (E.E.M.), a menos que en el texto se indique otra cosa. Los datos se analizaron por ANOVA utilizando el programa R v. 2.7.1 y posteriormente complementamos el análisis con la prueba de Tuckey para ANOVA. El nivel de significancia estadística que se utilizó fue del 95% de confianza como se indica en el texto.

6. Resultados.

6.1. Expresión heteróloga de la $K_{V\alpha}$ dominante negativa ShalL371D.

6.1.1 Expresión de los canales Shal wt y la caracterización de sus propiedades biofísicas.

Para evaluar la expresión correcta de los canales Shal wt en nuestro sistema, microinyectamos ovocitos de *X. laevis* con el mRNA codificante para este canal K_v . Para registrar las I_A generadas por la $K_{V\alpha}$ Shal wt, los ovocitos microinyectados se sometieron a protocolos de pulsos despolarizantes por fijación de voltaje con dos electrodos. El potencial de mantenimiento fue de -90 mV, para asegurarnos que los canales se encontraran en estado cerrado y sin inactivación. Se aplicaron pulsos despolarizantes a partir de -90 mV hasta +50 mV con incrementos de 10 mV (**Fig. 9A**).

La familia de I_A macroscópicas generadas por la expresión de los canales Shal wt se registró utilizando el protocolo de activación que se esquematiza en la parte media del panel A de la **Figura 9**, donde se puede observar un comportamiento típico de las I_A , una salida rápida de iones K^+ y una caída rápida de la I_A debida a la inactivación de los canales wt. La amplitud de la I_A aumenta de manera proporcional a los pulsos despolarizantes. En la parte inferior del panel A de la **Figura 9** se muestra el registro electrofisiológico realizado a ovocitos microinyectados únicamente con mRNA para la $K_{V\alpha}$ ShalL371D donde se puede observar que estos canales no generan I_A . Para analizar el fenómeno de inactivación en estado estacionario de este canal K_v , el potencial de mantenimiento fue de -120 mV. Se dieron pre-pulsos despolarizantes desde -120 mV hasta +10 mV con incrementos de 10 mV, después de cada pre-pulso se aplicó un pulso de prueba a +40mV (**Fig. 9B**). La **Figura 9B** muestra la familia de I_A macroscópicas registradas a partir de ovocitos microinyectados con el mRNA para el canal wt, obtenidas al utilizar el protocolo de inactivación. En este caso la I_A disminuye como consecuencia de la inactivación de los canales wt conforme aumenta la despolarización del pre-pulso (**Fig. 9C**, círculos negros).

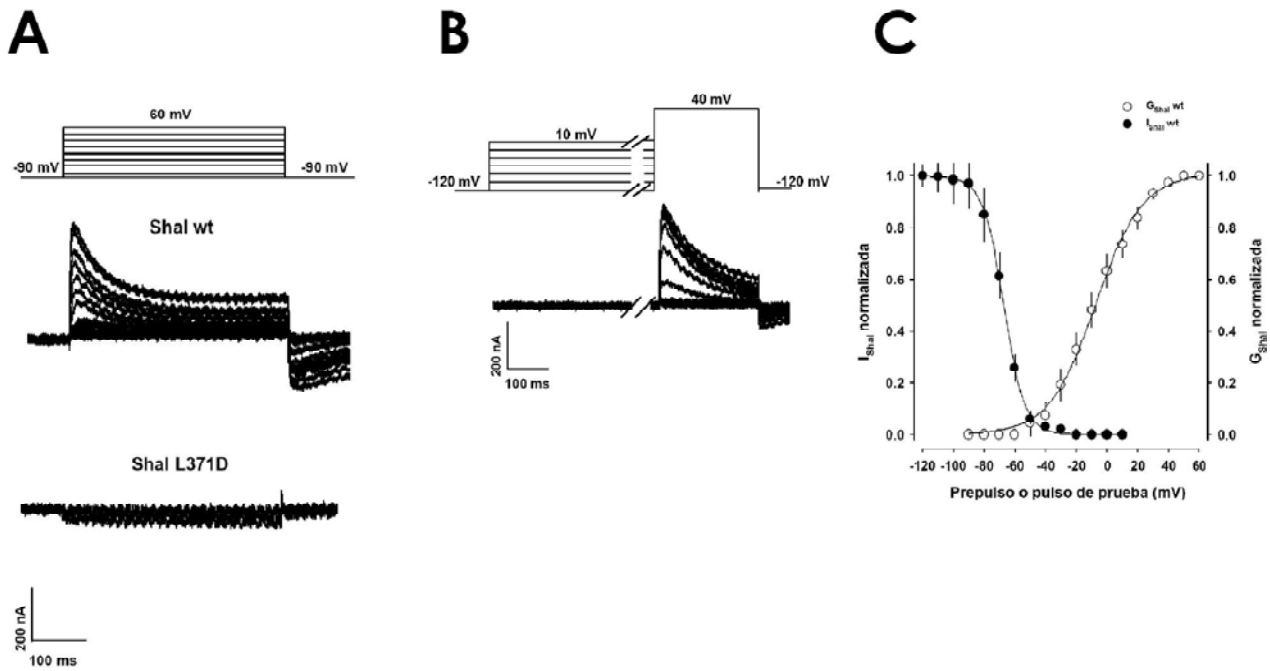


FIGURA 9. Familia de I_A codificadas por canales Shal expresados en ovocitos de *X. laevis*. **A**, en la parte superior del panel se esquematiza el protocolo de activación utilizado para los canales Shal, donde el potencial de mantenimiento fue de -90 mV con pulsos despolarizantes a partir de -90 mV con incrementos de 10 mV hasta llegar a +60 mV. En la parte media se muestran las familias de I_A macroscópicas representativas registradas en ovocitos de *X. laevis* inyectados con mRNA para el canal Shal wt. Los trazos del panel inferior muestran la falta de I_A para la versión ShalL371D. **B**, en la parte superior del panel se representa el protocolo de inactivación utilizado para el registro de las I_A generadas por la expresión de los canales Shal. Los trazos inferiores muestran a la familia de I_A macroscópicas representativas obtenidas en ovocitos de *X. laevis* con este protocolo. El potencial de mantenimiento fue de -120 mV desde el cual se aplicaron pre-pulsos despolarizantes con incrementos de 10 mV hasta llegar a +10 mV y posterior a cada pre-pulso se dió un pulso de prueba a +40 mV. **C**, gráfica de las curvas de activación (círculos blancos) e inactivación en estado estacionario (círculos negros) de las I_A mostradas en los paneles **A** y **B**, respectivamente. Los símbolos y barras representan el promedio \pm E.E.M. El número de células analizadas para cada condición experimental fue de diez ($n=10$).

Para asegurarnos de que en nuestras condiciones experimentales, el canal Shal wt se expresaba correctamente, analizamos las propiedades biofísicas de los canales wt expresados en ovocitos de *X. laevis*. Para empezar, comparamos varios parámetros biofísicos involucrados en el proceso de activación de este tipo de canales. Nuestros resultados indican que los canales wt se activaron a -50 mV, lo cual concuerda con valores ya reportados para este tipo de canales K_V . El promedio de la I_A máxima registrada a +20 mV fue de 429.5 ± 66.5 nA, lo que indica que obtuvimos una expresión robusta de los canales wt. El tiempo al pico para la I_A que obtuvimos fue de 27.2 ± 7.6 ms,

valor cercano al ya establecido en otros trabajos (ver **Tabla 6**). El voltaje medio de activación (V_{50}) de los canales wt fue ligeramente diferente al reportado anteriormente (-7.3 ± 0.9 mV). De manera consistente, la sensibilidad al voltaje de la corriente de los canales wt, representada por el valor de la constante de Boltzmann, fue similar estadísticamente a la reportada en trabajos previos ($k=15.3 \pm 0.7$). En la **Tabla 6** se presentan la comparación de los parámetros biofísicos mencionados arriba para la expresión de los canales wt en nuestro sistema y los valores previamente determinados en otros grupos de investigación para este tipo de canal K_v (Jegla & Salkoff, 1997; Wei et al., 1990).

Tabla 6

Análisis de las propiedades biofísicas del fenómeno de activación de las I_A generadas por canales Shal wt expresados en ovocitos de *X. laevis*.

Canal K_v	I_A al pico a +20 mV (nA)	Activación			
		Umbral (mV)	Tiempo para alcanzar el 95% del máximo de la I_A a 0 mV (ms)	V_{50} (mV)	Constante de Boltzmann (mV/# de veces)
Shal [†]	666	-50 a -40	26 ± 4	-3.8 ± 0.1	15.38 ± 0.07
Shal	429.5 ± 66.5 (10)	-50 (10)	27.2 ± 7.6 (10)	-7.3 ± 0.9 (10)	15.3 ± 0.7 (10)

Promedio de células analizadas (numero entre paréntesis) \pm D.E.M. [†] Jegla & Salkoff, 1997; Wei et al., 1990.

De la misma forma, analizamos diferentes parámetros involucrados en el fenómeno de inactivación en estado estacionario de los canales Shal wt expresados en nuestro sistema. El promedio del voltaje medio de inactivación (V_{50}) a partir de los registros experimentales fue de -67 ± 0.2 mV. A partir de la curva de la inactivación en estado estacionario normalizada, se determinó la pendiente de la curva, que corresponde a la constante de Boltzmann y tuvo un valor de 6.8 ± 0.2 mV/número de veces. Estos dos valores concuerdan estadísticamente con valores previamente reportados para este tipo de canales en la literatura (ver **Tabla 7**). Sin embargo, la τ_{FAST} a +50 mV tiene un valor de 20.0 ± 6.2 ms en este trabajo, diferente al reportado por otros grupos de investigación (Jegla & Salkoff, 1997; Wei et al., 1990). En la **Tabla 7** se comparan los valores obtenidos en nuestro laboratorio y los valores reportados previamente en la literatura (Jegla & Salkoff, 1997; Wei et al., 1990). Con base en este estudio comparativo podemos concluir

que, en nuestras condiciones experimentales, la expresión del canal Shal wt es correcta y que la falta de I_A en los canales ShalL371D no se debe a fallas en la manipulación de los ovocitos por nuestra parte.

Tabla 7 Parámetros electrofisiológicos del proceso de inactivación en estado estacionario de los canales Shal expresados en ovocitos de *X. laevis*.

Canal Kv.	Inactivación en estado estacionario.		
	V_{50} (mV)	Constante de Boltzmann (mV/# de veces)	τ_{FAST} a +50 mV (ms)
Shal [†]	-60.6 ± 0.1	6.3 ± 0.1	40.1 ± 2.1
Shal	-67 ± 0.2 (10)	6.8 ± 0.2 (10)	20 ± 6.2 (9)

Promedio de células analizadas (numero entre paréntesis) \pm D.E.M. [†] Jegla & Salkoff, 1997; Wei et al., 1990.

6.1.2 Determinación de la selectividad por K^+ de los canales Shal wt.

Por antecedentes sabemos que los canales Shal presentan una selectividad $P_{Na}/P_K < 0.01$ (Gutman et al., 2005), esto significa que el ión K^+ es el principal acarreador de carga en estos canales. En este trabajo, dado que el ovocito de *X. laevis* es exclusivamente permeable a iones K^+ , por la expresión de los canales Shal wt. Por lo tanto, estos iones atraviesan la membrana por los canales Shal que tienen una alta selectividad por K^+ . La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz nos permite predecir el potencial de la membrana (potencial de inversión teórico) cuando sólo está presente un tipo específico de canales iónicos; cuando los canales se abren, el potencial de la membrana se mueve hacia el valor del potencial de reposo para dicho ion. Para determinar si las I_A generadas por canales Shal wt, expresados en nuestro sistema, son debidas principalmente al flujo de iones K^+ calculamos el potencial de inversión teórico a dos $[K^+]_{int}$, 3 M y 150 μ M, manteniendo fija la $[K^+]_{ext}$ (2 mM). Cuando la $[K^+]_{int}$ (3M) es mayor que la $[K^+]_{ext}$, el valor del potencial de inversión teórico es de -151 mV. A la $[K^+]_{int}$ de 3 M, el potencial de reposo es de -97 ± 0.817 mV y dado que el potencial de inversión teórico en estas condiciones es de -151 mV, el flujo de K^+ tiende a salir del ovocito por el gradiente de concentración de K^+ . Dado que los valores del potencial de reposo son diferentes a los del potencial de inversión teórico, el flujo de K^+ tenderá a cambiar para restablecer el equilibrio del potencial en estado estacionario, por lo que la corriente

iónica registrada depende mayoritariamente del gradiente electroquímico de los iones K^+ (**Fig. 10**). En el segundo caso, donde la $[K^+]_{int}$ es de $150 \mu M$ menor que la $[K^+]_{ext}$, el valor del potencial de inversión teórico es de $7.25 mV$, mientras que el potencial de reposo fue de $-6.111 \pm 10.534 mV$. El exceso de cargas positivas en el exterior del ovocito se opone a la salida de K^+ y favorece que entren los iones K^+ (**Figura 10**).

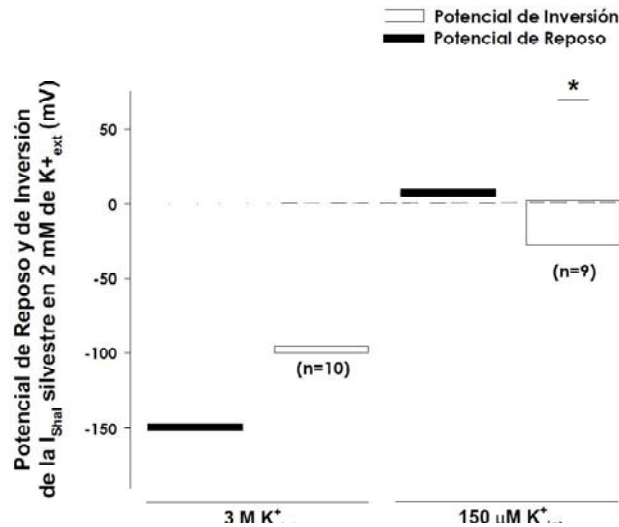


FIGURA 10. La I_A originada por la expresión del canal $Shal wt$ depende principalmente del ión K^+ como acarreador de carga. En la figura se muestra el promedio del potencial de reposo (línea continua en las cajas) a dos $[K^+]_{int}$ diferentes ($3 M$ y $150 \mu M$) manteniendo constante la $[K^+]_{ext}$ ($2 mM$). Las cajas representan la distribución de los datos en los primeros cuartiles, las barras verticales muestran la dispersión de los datos así como sus extremos los datos con valor máximo y mínimo. También se muestra el potencial de inversión teórico (cajas negras) calculado con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz a las mismas condiciones con las que se determinó el potencial de reposo. El E.E.M. no se muestra. El valor entre paréntesis indica el número de células analizadas (n). * $p < 0.001$.

6.1.3 Efecto de la coexpresión de las $Kv\alpha wt$ y $Shal371D$ sobre la densidad de la I_A .

Una vez demostrado que el canal $Shal wt$ se expresaba correctamente y que la expresión independiente de la $Kv\alpha Shal371D$ no producía I_A alguna (**Fig. 9** panel A), procedimos a evaluar si ésta última funciona como una proteína dominante negativa para el canal $Shal wt$. Para esto microinyectamos ovocitos de *X. laevis* con diferentes proporciones de mRNA para ambas $Kv\alpha$ del canal $Shal$ ($wt:Shal371D$; 3:1, 1:1, 1:3).

A partir de los registros de las I_A generadas por la expresión de los canales $Shal wt$ y $Shal371D$ en ovocitos de *X. laevis* y de los registros obtenidos cuando se inyectaron las diferentes proporciones de los mRNA de ambas $Kv\alpha$ ($wt:Shal371D$), obtuvimos las curvas

de densidad de I_A contra voltaje para cada condición experimental. Decidimos utilizar la densidad de la I_A para realizar un estudio comparativo más exacto (Fig. 11).

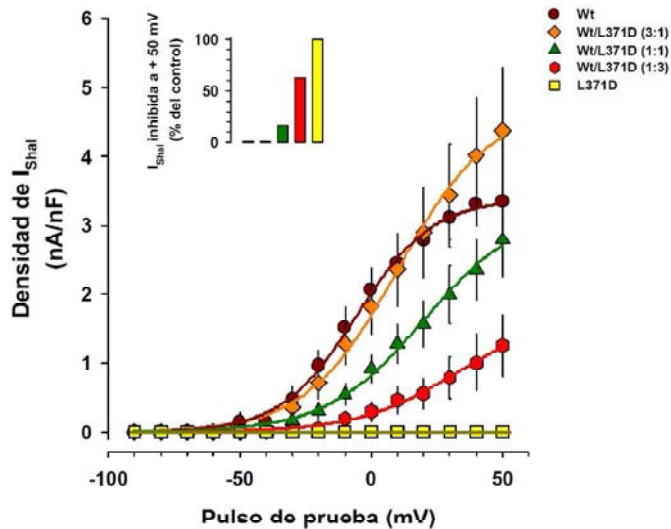


FIGURA 11. La $K_{v\alpha}$ ShalL371D actúa como dominante negativa inhibiendo la conducción de iones K^+ a través de los canales Shal wt. En la imagen se muestra la gráfica de la densidad de I_A a los diferentes pulsos de prueba de los registros de las I_A generadas por la expresión de los canales Shal wt, ShalL371D y diferentes proporciones de ambos canales (wt:ShalL371D, 3:1, 1:1 y 1:3). En el inserto se graficó el porcentaje de I_A inhibida para cada condición experimental con respecto a la I_A máxima generada a +50 mV por la expresión únicamente de canales wt. Para la condición experimental donde sólo se expresaron canales wt y canales ShalL371D analizamos diez y seis ovocitos, respectivamente. En la expresión de diferentes proporciones de canales wt y mutantes el número de células analizadas para la condición 3:1 (wt:ShalL371D) fue de cinco, para la proporción 1:1 analizamos ocho y para la proporción 1:3 diez ovocitos. Los símbolos y las barras del inserto representan el valor promedio \pm E.E.M.

La coexpresión de los canales Shal wt y de ShalL371D en proporción 3:1 (Fig. 11, rombos) fue estadísticamente similar a la expresión de los canales Shal wt (control, Fig. 11, círculos). El incremento en la proporción de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D con respecto a la $K_{v\alpha}$ wt ocasionó una reducción de la densidad de la I_A (Fig. 11, triángulos y hexágonos, respectivamente). Como ya lo demostramos anteriormente, la versión ShalL371D es incapaz de conducir I_A alguna al aplicarle el mismo protocolo de registro (Fig. 11, cuadrados).

En un análisis más detallado de los experimentos de coexpresión, comparamos el porcentaje de la I_A inhibida por la presencia de la versión ShalL371D en las diferentes proporciones ensayadas experimentalmente. La proporción wt:ShalL372D 1:1 reduce la I_A alrededor del 20% mientras que la proporción 1:3 inhibe alrededor de un 60% (inserto en la

Fig. 11, barra roja). Por último, la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D no produce I_A por lo que hay 100% de inhibición (inserto **Fig. 11**, barra amarilla). De estos resultados podemos concluir que la $K_{v\alpha}$ Shall371D disminuye significativamente la densidad de la I_A posiblemente al formar heterotetrámeros con las $K_{v\alpha}$ wt. La $K_{v\alpha}$ Shall371D funciona como dominante negativa de acuerdo a los criterios establecidos porque no genera un canal funcional cuando forma homotetrámeros y cuando al menos una $K_{v\alpha}$ Shall371D se coensambla con las $K_{v\alpha}$ wt se forman heterotetrámeros no funcionales.

La composición de los canales expresados en la membrana del ovocito dependió de las proporciones de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D inyectadas en cada una de las condiciones experimentales estudiadas. Por lo que, para cada condición se esperaba la formación de una fracción " ()" del heterotetrámero tipo " ". Para calcular la fracción de canales esperados de cada tipo para cada condición experimental, se utilizó una ecuación binomial de acuerdo al método utilizado por MacKinnon (1991). Dado que la I_A total es la suma de la I_A de cada uno de los canales que están contribuyendo en ella, se puede calcular la fracción de los homotetrámeros wt esperados que contribuyen a la amplitud de la I_A y la fracción de los homo y heterotetrámeros no funcionales para cada condición experimental (**Tabla 3**). De este análisis teórico, nosotros esperábamos que al coexpresar a las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D en las siguientes proporciones 3:1, 1:1 y 1:3, obtendríamos respectivamente una probabilidad binomial acumulada o porcentaje de inhibición de la I_A del 68.4%, del 93.8% y del 99.7% (**Tabla 3**) como consecuencia de los canales expresados con, al menos, una $K_{v\alpha}$ Shall371D como parte del tetrámero. Este resultado debería aproximarse al porcentaje de inhibición de la I_A total mostrada en el inserto de la **Figura 10**. Nuestros datos experimentales muestran un porcentaje de inhibición menor al esperado en una distribución binomial. Por ejemplo, la inhibición obtenida al coexpresar a las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D en la proporción 3:1 fue del 0%; en la proporción 1:1 fue del 20% y en la proporción 1:3 fue del 63%. Estos datos nos sugieren que el ovocito no está traduciendo los mRNA de los canales con la misma eficiencia. Por alguna razón, la $K_{v\alpha}$ wt se expresa mejor que la versión Shall371D. De hecho, nuestros datos muestran que la coexpresión de los canales wt y Shall371D en una proporción 1:3 (esperábamos un 63% de canales no funcionales) se comporta como si correspondieran a una distribución binomial para una proporción de 3:1. Para corroborar esta hipótesis realizamos una simulación de distribución binomial ajustando la probabilidad de inserción de la dominante negativa () al valor de probabilidad de inserción sugerido por nuestro análisis

previo (≈ 0.073). Los valores obtenidos de esta simulación fueron los siguientes: la inhibición esperada al coexpresar a los canales wt y Shall371D en la proporción 1:3 fue del 62%; mientras que para la coexpresión de los canales wt y Shall371D en la proporción 1:1 la inhibición fue del 21.7%; valores más cercanos a los obtenidos experimentalmente (ver **Tabla 8**). Esto sugiere que la $K_{v\alpha}$ wt se traduce entre 3.4 y 4 veces mejor que la dominante negativa Shall371D, aunque nuestro sistema de análisis no nos permitió una mayor exactitud en este cálculo. Este desbalance en la traducción de los mRNA de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D afectó a la probabilidad de inserción de la dominante negativa disminuyéndola de 0.25 a 0.003, de 0.5 a 0.029 y 0.75 a 0.073 para las distintas proporciones ensayadas en los experimentos de coexpresión (3:1, 1:1 y 1:3, respectivamente). Estas probabilidades de inserción tan pequeñas para la $K_{v\alpha}$ Shall371D explica por qué obtuvimos valores experimentales de inhibición menores a los teóricos. Por otra parte, los niveles de inhibición obtenidos por la coexpresión de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D, la probabilidad binomial acumulada y la distribución binomial reportadas en este trabajo sólo se pueden obtener si, y sólo si, la inserción de al menos una $K_{v\alpha}$ Shall371D es suficiente para obtener un canal Kv Shal no funcional (ver **Tabla 8**). Con requerimientos diferentes, por ejemplo, al menos dos o tres $K_{v\alpha}$ Shall371D necesarias para producir un canal no funcional, el porcentaje de inhibición de la corriente hubiera sido menor en todas las condiciones experimentales ensayadas (ver **Tabla 8**). Con base en estas observaciones podemos concluir que la $K_{v\alpha}$ Shall371D actúa efectivamente como una $K_{v\alpha}$ dominante negativa.

Tabla 8

Porcentaje de la inhibición de la I_A generada por la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D.

Proporción de mRNA inyectada (wt : mutante)	3 : 1	1 : 1	1 : 3
Inhibición experimental.	0	20	63
Distribución binomial acumulada o inhibición esperada.	68	93.7	99.4
Probabilidad de inserción calculada.	0.003	0.029	0.073
Distribución binomial acumulada simulada ($x=1-4$ mut).	0.003	21.7	62
Distribución Binomial acumulada simulada ($x=2-4$ mut).	0.01	1.8	21

6.1.4 Análisis de la activación e inactivación en estado estacionario de la coexpresión de las $K_{v\alpha}$ Shal wt y Shall371D.

Al analizar a detalle el porcentaje de I_A inhibida en la condición donde se expresa una proporción 1:3 de canales wt versus Shall371D observamos que hay más del 30% de I_A residual (inserto Figura 11, barra roja). Este porcentaje de I_A residual es producido por la formación de canales funcionales con las $K_{v\alpha}$ wt. Por esta razón, para determinar si la presencia de la $K_{v\alpha}$ Shall371 afectó a estos homotetrámeros funcionales, se analizaron las curvas normalizadas de la activación e inactivación en estado estacionario de los canales Shal para cada condición experimental. La coexpresión de las $K_{v\alpha}$ wt y las Shall371D ocasiona que las curvas de activación normalizadas se desplacen a potenciales más positivos (Fig. 12) comparadas con la curva de activación del canal wt (Fig. 12, círculos cafés). Además, el desplazamiento de la curva de activación correlaciona con el aumento de la proporción de la $K_{v\alpha}$ Shall371D.

El desplazamiento en las curvas de activación normalizadas se refleja en el cambio del valor del voltaje medio de activación ($V_{50 \text{ act}}$), para los canales wt es -7.4 ± 0.9 mV, mientras que en presencia de la $K_{v\alpha}$ Shall371D se corre a valores positivos. Para las distintas condiciones experimentales de coexpresión de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D los valores obtenidos fueron 1.5 ± 0.5 , 17.3 ± 1.9 y 18.6 ± 3.6 mV (inserto Fig. 12, barras naranja, verde y roja, respectivamente). Con estas observaciones podemos inferir que la $K_{v\alpha}$ Shall371D está afectando la sensibilidad al voltaje de los canales wt dado que en las condiciones experimentales de coexpresión de las $K_{v\alpha}$ wt y Shall371D se necesitan voltajes más despolarizantes para alcanzar el 50% de la I_A máxima comparada con la curva del canal wt (Fig. 12, círculos cafés).

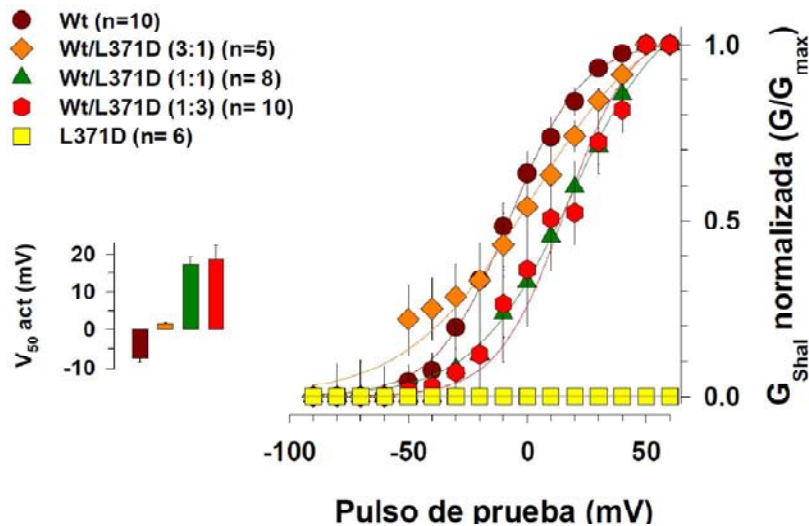


FIGURA 12. La $K_{v\alpha}$ ShalL371D modifica la activación de los canales Shal wt. La coexpresión de los canales wt y ShalL371D, en diferentes proporciones desplaza la curva de activación a valores más positivos. El desplazamiento de la curva de activación es proporcional al aumento de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D expresada heterológicamente en ovocitos de *X. laevis*. En el inserto de la izquierda se presenta el V_{50} act para cada condición analizada. Los símbolos y las barras del inserto representan el valor promedio \pm E.E.M. El valor entre paréntesis indica el número de células analizadas para cada condición experimental (n).

Para analizar si la $K_{v\alpha}$ ShalL371D afecta a la inactivación en estado estacionario, comparamos las curvas de inactivación normalizadas para cada condición experimental. La gráfica de las curvas de inactivación muestra que la coexpresión de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D con $K_{v\alpha}$ wt produce un desplazamiento de las curvas de inactivación hacia valores más negativos (**Fig. 13**), comparando con la curva de los canales wt (**Fig. 13**, círculos cafés). Esto se confirma al analizar el voltaje medio de inactivación (V_{50} Inact) que para los canales wt es de -67 ± 0.2 mV, mientras que, en el resto de los registros donde se coexpresaron distintas proporciones de las $K_{v\alpha}$ wt y ShalL371D el V_{50} Inact fue de -74.4 ± 2.5 , -93.6 ± 6.6 y -100.3 ± 10 mV (inserto **Fig. 13**, barras naranja, verde y roja, respectivamente). Estos datos nos indican que la $K_{v\alpha}$ ShalL371D hace que, en estado de reposo, se encuentren inactivados un mayor número de canales wt.

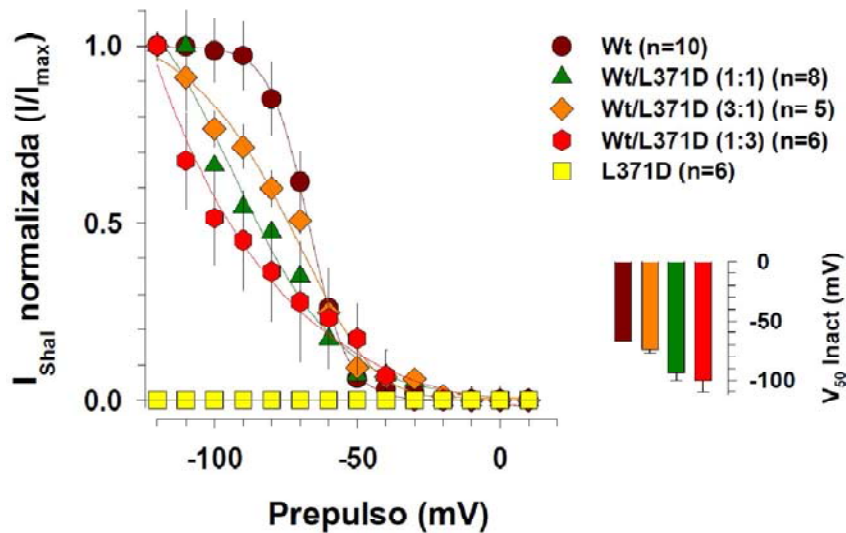


FIGURA 13. La expresión de la $K_{V\alpha}$ Shall371D afecta la sensibilidad al voltaje de la inactivación en estado estacionario de los canales $Shal$ wt. La $K_{V\alpha}$ Shall371D causa el desplazamiento de las curvas de inactivación en estado estacionario de las I_A generadas por la expresión de las $K_{V\alpha}$ wt en el sistema de ovocitos de *X. laevis*. En el inserto de la derecha se graficó el $V_{50} Inact$ para cada condición analizada. Los símbolos y las barras del inserto representan el valor promedio \pm E.E.M. El valor entre paréntesis indica el número de células analizadas para cada condición experimental (n).

En resumen, la versión Shall371D modifica la sensibilidad al voltaje de los canales wt al provocar que requieran voltajes más despolarizantes para abrirse. Además, en estado de reposo, la presencia de la $K_{V\alpha}$ Shall371D ocasiona que un mayor número de canales wt se encuentren inactivados comparados con el control. De este modo, además de actuar como una proteína dominante negativa, la expresión de la $K_{V\alpha}$ Shall371D contribuiría a inhibir a la I_A residual codificada por los canales $Shal$ wt.

6.2 Evaluación genética de la expresión de la dominante negativa Shall371D en *D. melanogaster*.

Una vez demostrado que la $K_{V\alpha}$ Shall371D actúa como una dominante negativa en un sistema de expresión heterólogo, procedimos a evaluar su eficiencia *in vivo*. Como consecuencia de los resultados descritos en la sección anterior, para lograr una buena inhibición de los canales $Shal$ wt *in vivo* fue necesario favorecer, de manera robusta, la expresión de la dominante negativa Shall371D utilizando secuencias reguladoras de expresión fuerte como son las regiones UAS del sistema de expresión Gal4-UAS. Siguiendo

la estrategia descrita en la Metodología generamos una línea de moscas con el transgen *UAS-ShalL371D*, que codifica para la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D bajo el control del factor transcripcional GAL4, por tener río arriba las secuencias reguladoras *UAS* a las que se une dicho factor, *UAS-ShalL371D¹⁷*, en el cromosoma II. El genotipo de estas moscas es *UAS-ShalL371D¹⁷/CyO*.

Con base en los datos de la expresión génica de *D. melanogaster*, verificamos que el mRNA del canal Shal tiene una alta expresión en diversos órganos vitales de la mosca. Esta información nos permitió planear la inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D ectópicamente, en neuronas o en músculos. Esto se llevó cabo a través del sistema Gal4-*UAS*, en donde la expresión del transgen *UAS-ShalL371D*, se obtiene al expresar al activador Gal4, en las regiones deseadas utilizando diferentes “drivers” que fueron, para la expresión ectópica *Act5C-GAL4*, para neuronas *elav-GAL4* y para músculo *Mef2-GAL4* (ver **Tabla 4**). En estos experimentos, nosotros esperábamos que la inhibición específica de la función de los canales Shal en estos tejidos, tuviera un efecto sobre la viabilidad *D. melanogaster*. Los animales con la expresión ubicua de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D deberían presentar un efecto equivalente al observado en organismos “knock-out” para este canal K_v de trabajos anteriores (Tsonuda & Salkoff, 1995).

6.2.1 Inducción ubicua de la expresión de la $K_{v\alpha}$ ShalL371D en *D. melanogaster*.

Como un primer acercamiento para determinar la funcionalidad de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D se buscó obtener animales donde se expresara ubicuamente esta $K_{v\alpha}$. Estos animales deben ser del genotipo *UAS-ShalL371D¹⁷/Act5C-GAL4* que se obtendrían cruzando moscas del genotipo *UAS-ShalL371D¹⁷/CyO* con moscas del genotipo *Act5C-GAL4*. De manera breve, contabilizamos la progenie de tres cruza independientes (n=3), donde 617 individuos fueron hembras y 570 machos dando un total de 1187 moscas contabilizadas. Para cada clase de esta cruza (de cuatro posibles) se esperaban un promedio de 103 ± 9 hembras y 95 ± 18 machos (**Tabla 9**). De las cuatro clases posibles, la clase *CyO/CyO* no es viable por heredar dos cromosomas balanceadores (ver **Esquema 9**). Otras dos clases tienen los genotipos de las clases parentales, *UAS-ShalL371D¹⁷/CyO* ó *Act5C-GAL4/CyO*. La última clase *UAS-ShalL371D¹⁷/Act5C-GAL4* contiene los transgenes de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D y del factor Gal4, por lo que constituyó la línea experimental. De manera consistente con

nuestra hipótesis, esta clase no es viable (**Fig. 14**), confirmando que la $Kv\alpha$ dominante negativa Shall371D reproducía el fenotipo descrito para los organismo “knock-out” del canal Shal.

Esquema 9 Clases esperadas de la cruce de moscas *UAS-Shall371D¹⁷/CyO* con moscas *Act5C-GAL4/CyO*.

Para esta cruce, la clase experimental es la que tiene el genotipo que contiene los dos componentes del sistema de expresión *GAL4-UAS*, mientras que las clases restantes se consideraron clases control.

Machos <i>UAS-Shall371D¹⁷/CyO</i>	X	Hembras vírgenes <i>Act5C-GAL4/CyO</i>
Alelos y/ó cromosomas	<i>act5-Gal4; +</i>	<i>CyO; +</i>
<i>UAS-Shall371D¹⁷; +</i>	<i>UAS-Shall371D¹⁷/Act5C-GAL4</i>	<i>UAS-Shall371D¹⁷/CyO</i>
<i>CyO; +</i>	<i>Act5C-GAL4/CyO</i>	LETAL

Tabla 9 La dominante negativa Shall371D ocasiona letalidad en la clase experimental *UAS-Shall371D¹⁷/Act5C-GAL4*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción de Moscas Eclosionadas
<i>UAS-Shall371D¹⁷/Act5C-GAL4</i>	♀	0 / 617	0 / 103 ± 9 *	0 *
	♂	0 / 570	0 / 95 ± 18 *	0 *
<i>Act5C-GAL4/CyO</i>	♀	305 / 617	101 ± 22 / 103 ± 9	0.99 ± 0.21
	♂	260 / 570	86 ± 21 / 95 ± 18	0.91 ± 0.11
<i>UAS-Shall371D¹⁷/CyO</i>	♀	312 / 617	104 ± 24 / 103 ± 9	1.01 ± 0.21
	♂	310 / 570	103 ± 20 / 95 ± 18	1.10 ± 0.11
<i>CyO/CyO</i>	♀	0 / 617	0 / 103 ± 9 *	0 *
	♂	0 / 570	0 / 95 ± 18 *	0 *

De esta cruce se esperaban un promedio de 103 ± 9 moscas hembra y 95 ± 18 moscas macho. La fracción de moscas eclosionadas es un indicativo directo de la viabilidad para cada clase. * $p < 0.001$, $n=3$ cruces independientes.

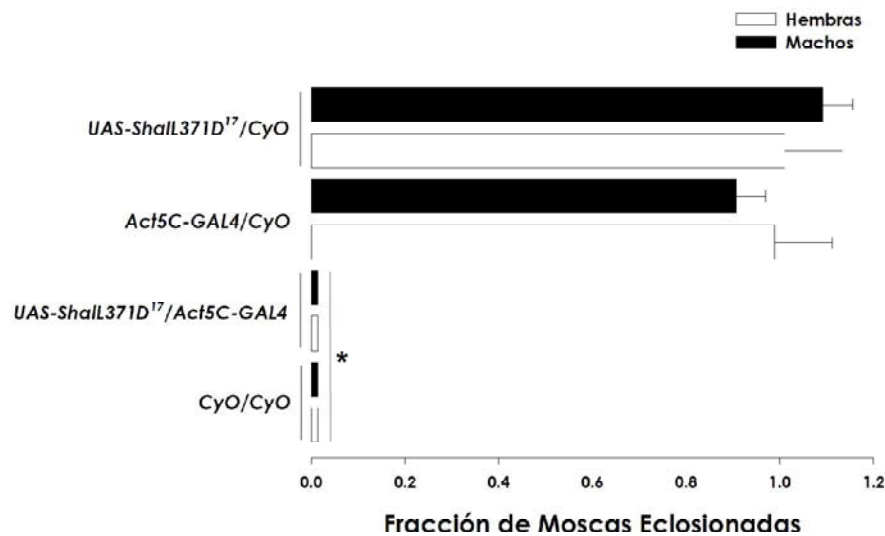


Figura 14. La expresión generalizada de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D es letal para *D. melanogaster*. Moscas del genotipo *UAS-Shall371D¹⁷/CyO* se cruzaron con moscas *Act5C-GAL4/CyO* para evaluar el fenotipo asociado a la expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D en todo el cuerpo de *D. melanogaster*. De las cuatro clases esperadas para esta cruce, una de ellas fue letal por heredar dos balanceadores *CyO*. La clase que heredó ambos elementos del sistema de expresión Gal4-UAS (*UAS-Shall371D¹⁷/Act5C-GAL4*) no produjo progenie adulta. En cambio las clases que heredaron sólo uno de los elementos del sistema de expresión bipartito (*Act5C/CyO* ó *UAS-Shall371D¹⁷/CyO*) fueron viables. En la gráfica se muestra la fracción de moscas eclosionadas para machos (barras negras) y para hembras (barras blancas) de cada clase esperada. Los valores de las moscas viables son similares estadísticamente. Las barras representan el promedio \pm E.E.M. * $p < 0.001$, $n=3$ cruces independientes.

Para comparar la eficiencia de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa contra una línea de moscas en la cual se hubiera caracterizado el efecto de la inhibición de la expresión del mRNA de los canales Shal, se adquirió una línea de moscas del NIG-Fly que posee un RNAi contra los canales Shal (*UAS-Shali*), que ya había sido evaluada por este Instituto. El NIG-Fly reportó que la expresión ubicua del RNAi contra los mRNA de los canales Shal es letal, por lo que utilizamos esta cruce como control positivo sobre el efecto del abatimiento de la función de los canales Shal en *D. melanogaster*, y lo comparamos con los resultados que obtuvimos de nuestra línea de moscas que expresaban a la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D. La línea *UAS-Shali*, además de la inserción del RNAi Shali, también presenta el transgen para la proteína Dicer-2 bajo el control de las secuencias UAS (*UAS-dcr2*) en el cromosoma II. Sólo eclosionaron dos moscas adultas, una mosca hembra y otra macho de las clases experimentales *UAS-dcr2/Act5C-GAL4; UAS-Shali/+* y *Act5C-GAL4/CyO; UAS-Shali/+*, por lo que podemos concluir que la inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal con el RNAi causa letalidad. Para mayor detalle de los resultados de esta

cruciar con el **Anexo 10.1**. Por antecedentes sabemos que en ocasiones, la proteína Dicer-2 constituye un factor limitante para el funcionamiento adecuado de un RNAi, dado que Dicer-2 se une a la dúplice del siRNA durante el procesamiento del RNAi (Dietzl *et al.*, 2007; Jaronczyk *et al.*, 2005; Rana, 2007). El nivel de letalidad observado en el caso de la línea *UAS-Shal1*, fue el mismo para las clases que heredaron el RNAi ó el transgen *Act5C-GAL4*, aún en ausencia de Dicer-2, por lo que, podemos concluir que Dicer-2 no constituyó un factor limitante para la inhibición de la expresión del mRNA del canal *Shal* (**Fig. 15**).

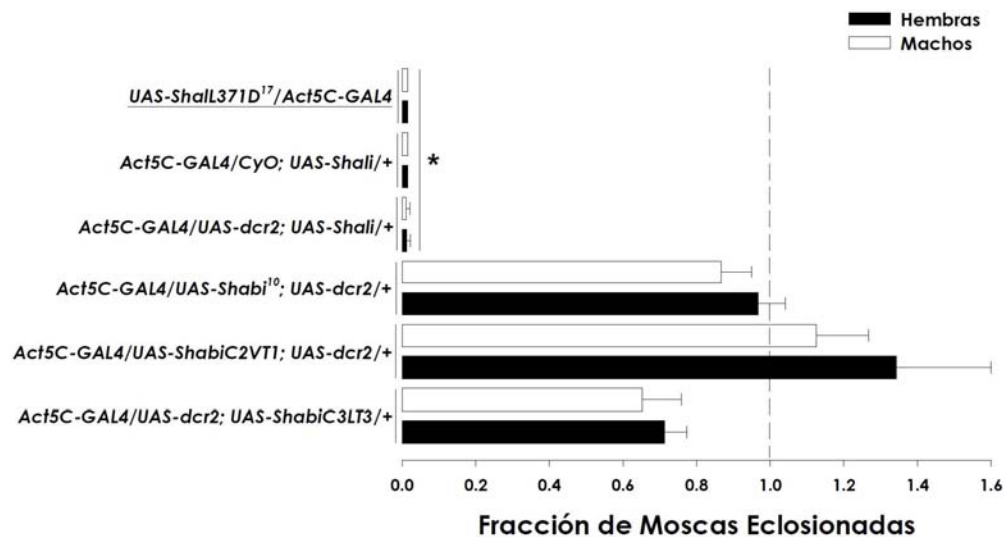


Figura 15. La inhibición ubicua de la expresión de los mRNA de los canales *Shal* en *D. melanogaster* causa letalidad de manera similar que la $K_{v\alpha}$ *ShalL371D*. En la gráfica se muestra la fracción de moscas eclosionadas de las clases experimentales *Act5-Gal4/UAS-ShalL371D*; *Act5C-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shal1/+*; *Act5C-GAL4/UAS-Shab1¹⁰; UAS-dcr2/+*; *Act5C-Gal4/UAS-Shab1C2VT1; UAS-dcr2/+* y *Act5C-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shab1C3LT3/+* de las cruces realizadas utilizando el driver *Act5C-GAL4* para inducir la expresión de la $K_{v\alpha}$ *ShalL371D* y la inhibición generalizada de la expresión de los mRNA de los canales *Shal* y *Shab* en *D. melanogaster*. Las barras representan el promedio de los datos de hembras (negras) y machos (blancas) \pm E.E.M., excepto en el caso de la clase *Act5C-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shab1C3LT3/+* es el promedio \pm D.E.M. Todos los datos provienen de tres cruces independientes (n=3). *p < 0.001.

La familia de canales K_v agrupa tanto a los canales *Shal* como a los canales *Shab*, por lo que, para descartar que el fenotipo de letalidad observado por la inhibición funcional de los canales *Shal* mediante un RNAi no se debiera a la posible participación de los canales *Shab*, decidimos utilizar RNAi contra los mRNA de los canales *Shab* como un control adecuado para confirmar la especificidad en la letalidad observada al inhibir a los mRNA de los canales *Shal* por RNAi, debido a la cercanía evolutiva entre ambos tipos de canales K_v (Salkoff *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1990). Realizamos ensayos de viabilidad

utilizando las líneas que portan inserciones codificantes para RNAi contra los mRNA de los canales Shab. Las líneas utilizadas fueron *UAS-Shabi*¹⁰, *UAS-ShabiC2VT1* y *UAS-ShabiC3LT3*. Encontramos que en ninguno de los casos, la expresión ubicua de los RNAi de las diferentes líneas provoca una diferencia estadística significativa con respecto a los valores de supervivencia de las clases control. Por esta razón podemos concluir que la inhibición funcional generalizada del mRNA de los canales Shab en *D. melanogaster* no es letal, las clases experimentales de estas cruzas se muestran en la **Figura 15**. Mayor detalle de los resultados de estas cruzas se presenta en el **Anexo 10.2**.

Dado que, el fenotipo de letalidad observado al inhibir los mRNA de los canales Shal endógenos es específico de la inhibición de los canales Shal y dado que las tres líneas con las diferentes inserciones de los RNAi contra los mRNA de los canales Shab presentan un comportamiento similar para los siguientes experimentos se utilizó la línea de moscas generada en el laboratorio, *UAS-Shabi*¹⁰.

6.2.2 Inhibición de los canales Shal en el SN de *D. melanogaster*.

En la sección anterior demostramos que la función de los canales Shal es esencial para la sobrevivencia de las moscas adultas. Esta información se obtuvo expresando ubicuamente la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D ó bien disminuyendo la expresión del mRNA de dichos canales con RNAi. Para desarrollar un modelo biológico viable que se pueda utilizar en estudios de aprendizaje y memoria, probamos si la inhibición de la expresión funcional del canal Shal específicamente en neuronas nos permitiría obtener organismos que alcanzaran estados de desarrollo avanzados. Para lograr este objetivo intentamos obtener animales del genotipo *UAS-ShalL371D*¹⁷/*elav-GAL4* que expresaran tanto Gal4 como la $K_{v\alpha}$ ShalL371D en todas las neuronas del SN de la mosca. La estrategia genética para lograr este objetivo es similar a la explicada en la sección anterior, en la Metodología y en el **Esquema 10**. Los resultados se encuentran en la **Tabla 10** y en la **Figura 16**. Encontramos que la inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa ShalL371D en el SN de la mosca es letal pues no encontramos individuos adultos del genotipo deseado, *UAS-ShalL371D*¹⁷/*elav-GAL4*, en un total de 1921 individuos viables de la F1 de la cruce entre individuos *UAS-ShalL371D*¹⁷/*CyO* e individuos *elav-GAL4/elav-GAL4*.

Esquema 10 Clases esperadas de la cruce de moscas con genotipo *UAS-ShalL371D17/CyO* con moscas *elav-GAL4/elav-GAL4*.

Dos clases de las cuatro esperadas constituyeron las clases experimentales: *elav-GAL4/X; UAS-ShalL371D17/+* y *elav-GAL4/Y; UAS-ShalL371D17/+* (en negritas).

Machos <i>UAS-ShalL371D17/CyO</i>	X	Hembras vírgenes <i>elav-GAL4/elav-GAL4</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>elav-GAL4; +</i>
X; <i>UAS-ShalL371D17</i>		<i>elav-GAL4/X; UAS-ShalL371D17/+</i>
Y; <i>UAS-ShalL371D17</i>		<i>elav-GAL4/Y; UAS-ShalL371D17/+</i>
X; <i>CyO</i>		<i>elav-GAL4/X; CyO/+</i>
Y; <i>CyO</i>		<i>elav-GAL4/Y; CyO/+</i>

Tabla 10 Viabilidad de la progenie observada al expresar a la $K_{V\alpha}$ dominante negativa *ShalL371D* en el SN de *D. melanogaster*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>elav-GAL4/X; UAS-ShalL371D17/+</i>	♀	0 / 1005	0 / 335 ± 31.01	0 *
<i>elav-GAL4/Y; UAS-ShalL371D17/+</i>	♂	0 / 916	0 / 305.33 ± 54.04	0 *
<i>elav-GAL4/X; CyO/+</i>	♀	1005 / 1005	335 ± 31.01 / 335 ± 31.01	1 ± 0.093
<i>elav-GAL4/Y; CyO/+</i>	♂	916 / 916	305.33 ± 54.04 / 305.33 ± 54.04	1 ± 0.18

En el conteo poblacional de las clases esperadas no obtuvimos moscas adultas de las clases experimentales (promedio= 0). *p < 0.001, n=3 cruza independientes.

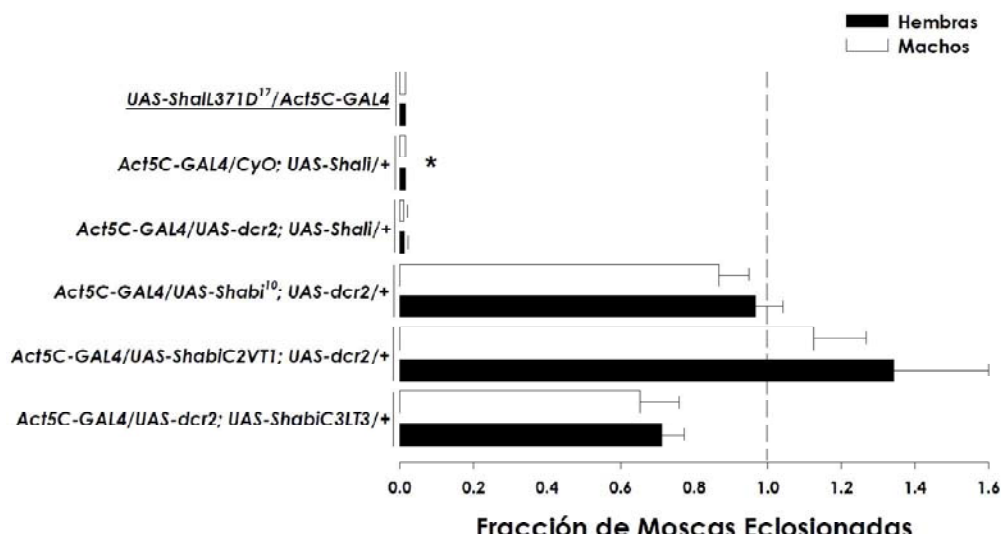


Figura 16. La expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D en el SN de *D. melanogaster* causa letalidad. De las cuatro clases esperadas de la cruce, dos clases corresponden a las clases control que muestran un 100% de viabilidad mientras que en las clases experimentales no se observó progenie alguna. Se cuantificaron un total de 1921 individuos, 1005 hembras y 916 machos. La progenie esperada para cada clase, es de 335 ± 31.01 hembras y 305.33 ± 54.04 machos. Las barras (negras: moscas hembras y blancas: moscas machos) representan el promedio de la fracción de moscas eclosionadas \pm E.E.M., * $p < 0.001$, $n=3$ cruces independientes.

En estas mismas condiciones experimentales probamos la eficiencia del RNAi específico contra los mRNA de los canales Shal (*UAS-Shali*) para compararlo con los resultados obtenidos para la expresión de la dominante negativa Shall371D en las neuronas. Nuestros datos indican que la inhibición de la expresión de los canales Shal, mediante el uso del RNAi *UAS-Shali*, en las neuronas de *D. melanogaster* no afecta la viabilidad de las moscas (**Fig. 17**). Estos resultados contrastan con los de la inhibición mediante el uso de la proteína dominante negativa Shall371D, sugiriendo que la dominante negativa es más eficiente para inhibir a los canales Shal neuronales endógenos que el RNAi Shali a pesar de la presencia de la proteína Dicer-2 en dos de las clases experimentales (**Anexo 10.3**).

Aunque la inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal en las neuronas no causó letalidad, comparamos este resultado con el obtenido al inhibir ahora la expresión de los mRNA de los canales Shab (mediante la expresión del RNAi Shabi con o sin Dicer-2) en las neuronas (**Anexo 10.4**). Al igual que para la inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal, la inhibición de los mRNA de los canales Shab en el SN no causó letalidad (**Fig. 17**).

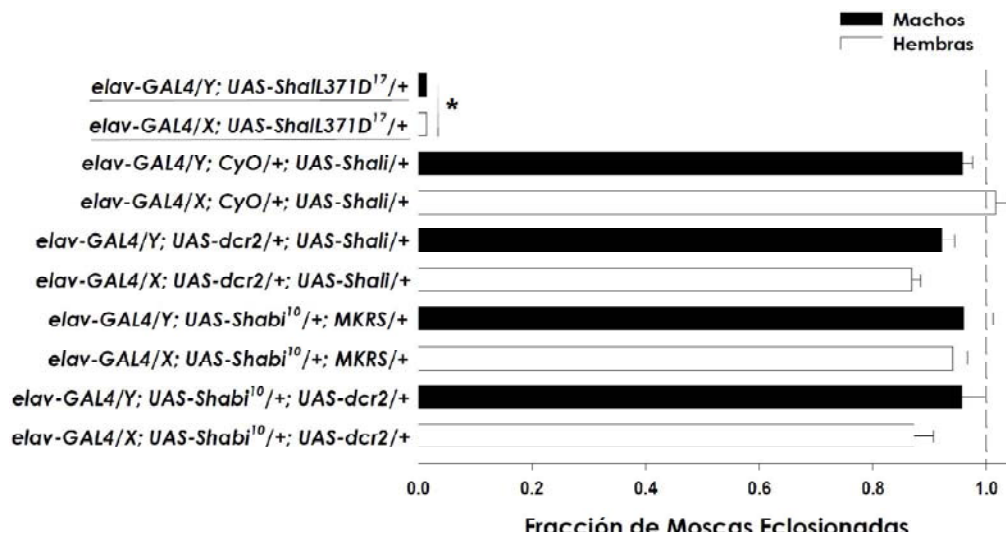


Figura 17. La dominante negativa Shall371D causa letalidad cuando se induce su expresión en el SN de *D. melanogaster*. El promedio de moscas observadas para las clases experimentales de las cruas realizadas utilizando el “driver” *elav-GAL4* para inducir la expresión de la $Kv\alpha$ Shall371D y de los RNAi contra los canales *Shal* y *Shab*. Las barras representan el promedio \pm E.E.M. $n=3$ cruas independientes. $*p < 0.001$.

6.2.3 Inhibición de los canales *Shal* endógenos de los músculos de *D. melanogaster*.

Como ya habíamos mencionado, los canales *Shal* se expresan preferencialmente en los músculos de *D. melanogaster* entre otros tejidos (Tabla 4), por lo que para evaluar a la $Kv\alpha$ Shall371D *in vivo* dirigimos su expresión a los músculos de *D. melanogaster*, a través del uso del “driver” *Mef2-GAL4*. Al igual que en los experimentos anteriores intentamos obtener animales del *UAS-ShalL371D¹⁷/Mef2-GAL4* (ver Esquema 11). Encontramos que la inducción de la expresión de la $Kv\alpha$ dominante negativa Shall371D en los músculos de la mosca causa letalidad pues no encontramos individuos adultos del genotipo deseado, *UAS-ShalL371D¹⁷/Mef2-GAL4*, en un total de 1262 individuos viables de la F1 de la crua entre individuos *UAS-ShalL371D¹⁷/CyO* e individuos *Mef2-GAL4/Mef2-GAL4* (Tabla 11 y Fig. 18).

Esquema 11 Clases esperadas de la cruce realizada para inducir la expresión de la $Kv\alpha$ Shall371D en los músculos de *D. melanogaster*.

El 50% de las clases esperadas heredaron al sistema bipartito Gal4-UAS completo (en negritas).

Machos <i>UAS-Shall371D17/CyO</i>	X	Hembras vírgenes <i>Mef2-GAL4/Mef2-GAL4</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>Mef2-GAL4</i>
<i>UAS-Shall371D17</i>		<i>UAS-Shall371D17/Mef2-GAL4</i>
<i>CyO</i>		<i>Mef2-GAL4/CyO</i>

Tabla 11 La inducción de la expresión de la $Kv\alpha$ dominante negativa Shall371D en los músculos de *D. melanogaster* causa letalidad.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>UAS-Shall371D17/Mef2-GAL4</i>	♀	0 / 695	0 / 219.67 ± 58.61	0 *
	♂	0 / 603	0 / 201 ± 47.61	0 *
<i>Mef2-GAL4/CyO</i>	♀	695 / 695	219.67 ± 58.61 / 219.67 ± 58.61	1 ± 0.27
	♂	603 / 603	201 ± 47.61 / 201 ± 47.61	1 ± 0.24

* $p < 0.001$. $n=3$ cruza independientes.

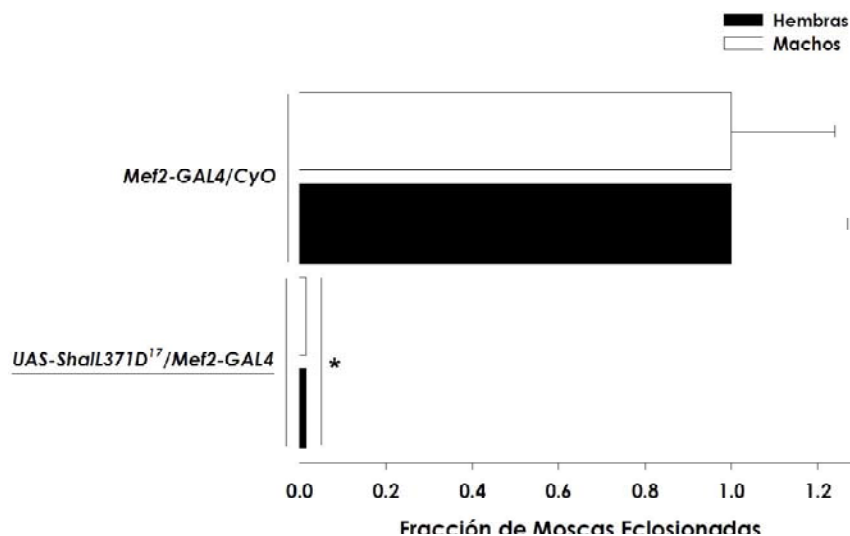


Figura 18. La inhibición de los canales Shal musculares es letal para la mosca. En la figura se muestra la fracción de las moscas que llegaron a la etapa adulta al inducir la expresión de la Kva dominante negativa Shall371D. La clase que heredó ambos elementos del sistema de expresión no es viable (*UAS-ShalL371D/Mef2-GAL4*). Se cuantificaron un total de 1262 individuos, 659 hembras y 603 machos. La progenie esperada para cada clase, es de 219.67 ± 58.61 para las hembras y 201 ± 47.61 para los machos. Las barras (negras: hembras, blancas: machos) representan el promedio de tres cruces independientes. * $p < 0.001$.

Asimismo, la inhibición de los mRNA de estos canales mediante el uso del RNAi Shal causó semiletalidad *D. melanogaster* cuando está presente la proteína Dicer-2 (*UAS-dcr2/Mef2-GAL4; UAS-Shali/+*), no así cuando está ausente (*Mef2-GAL4/CyO; UAS-Shali/+*). Este dato nos permite considerar que la eficiencia de procesamiento del RNAi utilizado para inhibir los mRNA de los canales Shal musculares endógenos de la mosca es deficiente. Al introducir en el sistema la proteína Dicer-2 que es un factor importante en este procesamiento postranscripcional, se aumenta el fenotipo inducido por el RNAi Shali causando hasta cierto grado letalidad en *D. melanogaster* (**Anexo 10.5 y Fig. 19**).

Al igual que en las secciones anteriores comparamos estos resultados con la inhibición de los mRNA de los canales Shab en los músculos (**Anexo 10.6**) y concluimos que la inhibición de los mRNA de los canales Shab musculares no causa letalidad en la mosca (**Anexo 10.6 y Fig. 19**). Este resultado nos permite confirmar que las herramientas utilizadas para abatir la expresión y/o función de los canales Shal en los músculo de *D. melanogaster* son específicas para este tipo de canales y no están afectando a otra subfamilia de canales Kv, en este caso particular a los canales Shab, a pesar que evolutivamente están muy relacionados (Salkoff et al., 1992; Wei et al., 1990).

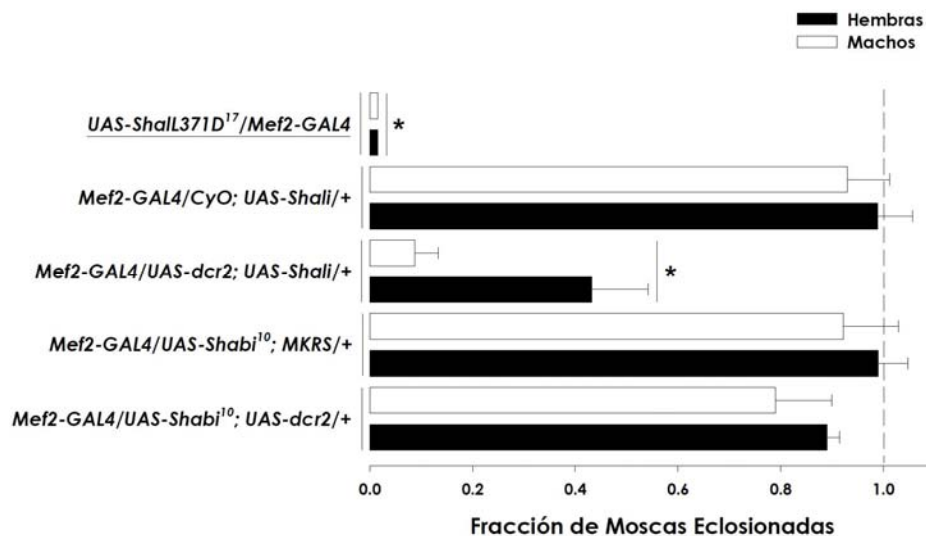


Figura 19. La expresión de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D y el “knock-down” de la expresión de los mRNA de los canales Shal en músculos causan distintos grados de letalidad en *D. melanogaster*. Gráfica de la fracción de moscas eclosionadas de las clases experimentales resultantes de las cruzas para inducir la inhibición de los canales Shal mediante la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D ó el RNAi Shali. La expresión del RNAi Shabi se utilizó como control de la especificidad del RNAi Shali. Las barras (negras: hembras y blancas: machos) representan el promedio \pm E.E.M. $n=3$ cruza independientes. * $p < 0.001$.

6.3 Establecimiento de la línea *UAS-ShalL371D¹⁷* para evaluar la participación de los canales Shal en procesos cognitivos.

Los estudios sobre el aprendizaje y la memoria olfativa en *D. melanogaster* enfocan sus estudios en el CF. Las versiones mutantes de canales iónicos dependientes de voltaje en el CF de *D. melanogaster*, alteran los procesos de aprendizaje y de retención de la información en la mosca (Gasque et al., 2006). Como un primer acercamiento del papel fisiológico de los canales Shal en estos procesos cognitivos evaluamos si la inhibición de estos canales en el CF no afectaba la viabilidad de *D. melanogaster*. Por lo tanto se obtuvieron individuos con el genotipo *UAS-ShalL371D¹⁷/7A2-GAL4*, donde se expresó la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D en el CF con el “driver” 7A2-GAL4. Además estos individuos portan el transgen *UAS-chameleon* que codifica para la proteína Chameleon que funciona como un sensor de Ca^{2+} . Al estar bajo el control de las secuencias *UAS*; y en presencia del “driver” 7A2-GAL4, Chameleon se expresa también en el CF. La estrategia genética para la obtención del genotipo de interés se encuentra en el **Esquema 12** y los resultados en la **Tabla 12** y la **Figura 20**. Nuestros resultados indican que la inhibición de los

canales Shal endógenos en el CF con la expresión de la $Kv\alpha$ dominante negativa Shall371D causa un fenotipo de semiletalidad exclusivamente en machos (**Fig. 20**).

Esquema 12

Clases esperadas de la cruce realizada para inhibir a los canales Shal en el CF mediante la expresión de la $Kv\alpha$ Shall371D.

	Machos <i>UAS-Shall371D¹⁷/CyO</i>	X	Hembras vírgenes <i>7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/UAS-chameleon</i>
Alelos y /ó cromosomas			
<i>UAS-Shall371D¹⁷</i>	<i>UAS-Shall371D¹⁷/7A2-GAL4; UAS-chameleon/+</i>		<i>CyO; UAS-chameleon</i>
<i>CyO</i>	<i>7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/+</i>		LETAL

Tabla 12

Semiletalidad en machos por la inducción de la expresión de la $Kv\alpha$ Shall371D en el CF de *D. melanogaster*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción Moscas Ecllosionadas
<i>UAS-Shall371D¹⁷/7A2-GAL4; UAS-chameleon/+</i>	♀	114 / 448	38 ± 4.51 / 55.67 ± 8.49	0.74 ± 0.17
	♂	73 / 396	24.33 ± 5.46 / 53.83 ± 6.82	0.46 ± 0.1 *
<i>UAS-Shall371D¹⁷/CyO; UAS-chameleon/+</i>	♀	155 / 448	51.67 ± 5.55 / 55.67 ± 8.49	0.94 ± 0.04
	♂	155 / 396	51.67 ± 7.13 / 53.83 ± 6.82	0.96 ± 0.01
<i>7A2-GAL4/CyO/+ ;UAS-chameleon/+</i>	♀	179 / 448	59.67 ± 11.46 / 55.67 ± 8.49	1.06 ± 0.04
	♂	168 / 396	56 ± 6.56 / 53.83 ± 6.82	1.04 ± 0.01
<i>CyO/CyO; UAS-chameleon/+</i>	♀	0 / 448	0 / 55.67 ± 8.49	0 *
	♂	0 / 396	0 / 53.83 ± 6.82	0 *

* p < 0.001. n=3 cruces independientes.

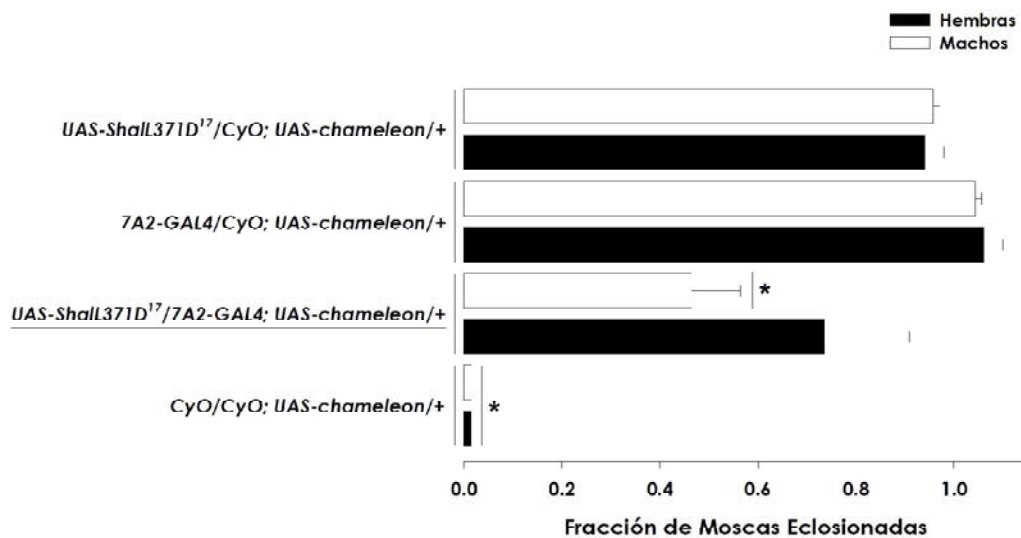


Figura 20. La inhibición de los canales Shal en el CF causa semiletalidad en machos adultos. Gráfica de la fracción de las moscas eclosionadas de las clases resultantes de la cruce para inducir la inhibición de los canales Shal presentes en el CF de *D. melanogaster* mediante el direccionamiento de la $K_{v\alpha}$ dominante negativa Shall371D a esta estructura neuronal. Se analizaron en total 844 individuos, 448 hembras y 396 machos. El promedio de moscas esperadas para cada clase fue de 55.67 ± 8.49 hembras y 53.83 ± 6.82 machos (mas datos en la **Tabla 12**). Se observa cierta letalidad en machos de la clase que hereda la inserción UAS-Shall371D así como 7A2-GAL4, comparada con las hembras de la misma clase y con la progenie de las clases control. Las barras representan el promedio \pm E.E.M. * $p < 0.001$.

La expresión del RNAi Shali en el CF de *D. melanogaster* causó un fenotipo de semiletalidad, afectando al 20% de la población (**Anexo 10.7**). Este efecto de semiletalidad parece depender de la presencia de la proteína Dicer-2 ya que en su ausencia los individuos que en teoría expresaron el RNAi fueron viables (**Fig. 21**). Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos con el RNAi Shali en el CF resulta complicada debido a que hasta el momento no se ha reportado que el CF participe en el control de funciones vitales básicas en la mosca.

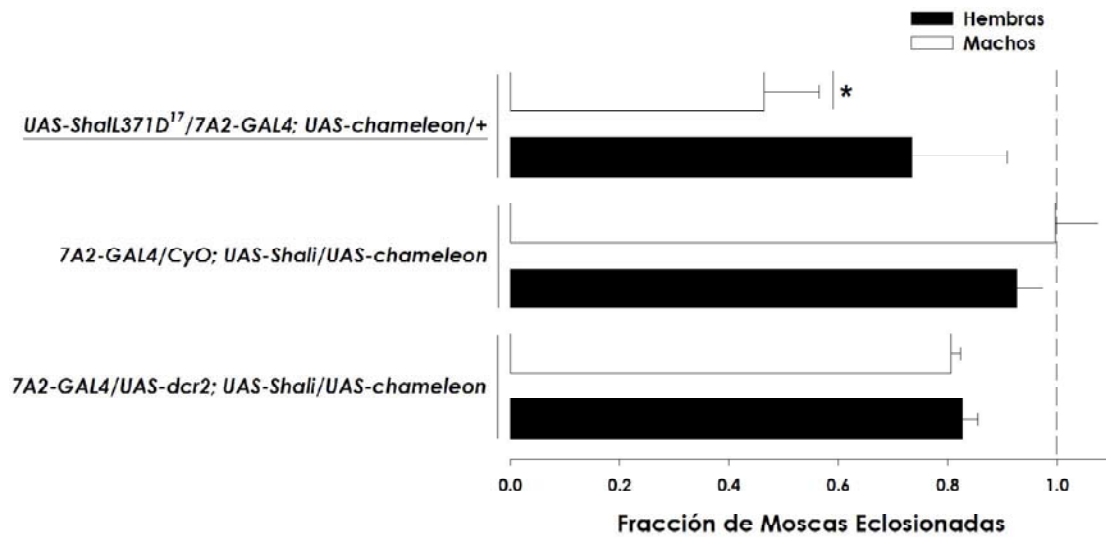


Figura 21. La expresión de la $Kv\alpha$ *ShalL371D* en el CF de *D. melanogaster* causa semiletalidad únicamente en machos. Gráfica de la fracción de moscas eclosionadas de las clases experimentales de las cruces realizadas para inducir la expresión de la $Kv\alpha$ dominante negativa *ShalL371D* y del RNAi *Shali* para inhibir la función de los canales *Shal* endógenos del CF utilizando la línea de moscas *7A2-GAL4*. Las barras representan el promedio de las moscas observadas \pm E.E.M. $n=3$ cruces independientes. * $p < 0.001$.

7. Discusión.

7.1 La falta de subunidades accesorias podría explicar las diferencias observadas en la cinética de la I_A .

En general, los parámetros biofísicos determinados a partir de las I_A registradas por la expresión de canales Shal wt en el sistema heterólogo de ovocitos de *X. laevis*, son similares a los reportados previamente en la literatura. Esta observación nos permitió descartar problemas en la expresión de los canales wt, simplificó el análisis y la interpretación de los resultados obtenidos en las diferentes condiciones experimentales ensayadas en este proyecto. Sólo dos parámetros biofísicos fueron ligeramente diferentes a los reportados en la literatura: el V_{50} de activación y τ_{FAST} a +50 mV (**Tablas 6 y 7**). Por antecedentes sabemos que las $K_V\alpha$ de los canales K_V poseen las propiedades biofísicas intrínsecas del canal. Sin embargo, existen subunidades auxiliares que regulan y modifican a los parámetros biofísicos intrínsecos de la $K_V\alpha$. La subunidad accesorias más importante para un canal K_V es la $K_V\beta$, la cual es una proteína citoplasmática que se une al canal K_V a través del dominio TI (Gulbis et al., 2000). De manera particular, los canales K_V4 pueden asociarse físicamente con distintas $K_V\beta$ (Nakahira et al., 1996). La interacción incrementa la densidad de la I_A promoviendo y/o estabilizando la expresión de los canales K_V en la membrana celular, resultando en el desplazamiento del V_{50} de activación de los canales Shal a valores más hiperpolarizados, disminuyendo la cinética de inactivación y el tiempo de recuperación de la misma (An et al., 2000). Con base en estos datos proponemos que las diferencias observadas en el V_{50} de activación y la τ_{FAST} de inactivación del canal Shal wt podrían deberse a la falta de la modulación por las $K_V\beta$. En *D. melanogaster*, solo se ha reportado la expresión de una $K_V\beta$ (Hk, Hyperkinetic) pero hasta el momento no se ha reportado la asociación ni la modulación de los canales Shal por la proteína Hk. Un segundo candidato capaz de modificar las propiedades biofísicas del canal Shal son las proteínas denominadas KChIPs ("K_V channel-interacting proteins"). Este grupo de proteínas reguladoras, al igual que las $K_V\beta$, incrementan la densidad de la I_A , corren el V_{50} de los canales Shal a valores más hiperpolarizados, retrasan la cinética de inactivación y el tiempo de recuperación de la misma (An et al., 2000). Más aún, recientemente se identificó la interacción de la proteína SKIP3 ("Shal K⁺ channel interacting protein-3") con los canales Shal neuronales. Esta proteína puede catalogarse en el grupo de proteínas que interactúan con los canales de la subfamilia Shal. La

interacción del canal Shal con SKIP3, acelera la τ_{FAST} , por lo que, la falta de SKIP3 en el sistema heterólogo utilizado en este trabajo podría explicar los datos obtenidos con nuestro sistema (**Tabla 7**), como consecuencia de la regulación de la inactivación por SKIP3 (Diao et al., 2009).

7.1.1 El ion K^+ como acarreador de carga de la I_A .

Por otra parte, nuestros datos indican que el K^+ es el principal acarreador de carga para las I_A registradas por la expresión de los canales Shal wt. El potencial de inversión teórico con una $[K^+]_{int}$ de 3 M tuvo un valor más negativo que el potencial de reposo obtenido experimentalmente (**Fig. 10**). Considerando que esto se debe a que los canales Shal se encuentran cerrados a este voltaje por lo que no hay flujo neto de iones K^+ (**Fig. 9**, panel C).

En resumen, la expresión de los canales Shal wt en nuestro sistema generan I_A con un comportamiento similar a las reportadas por otros grupos de investigación. El análisis de los valores de las propiedades biofísicas concuerda con valores ya reportados para este tipo de canales.

7.1.2 La $K_{v\alpha}$ Shall371D actúa efectivamente como una nueva dominante negativa.

Como se mencionó en los Antecedentes, para considerar a una $K_{v\alpha}$ como dominante negativa es necesario que esta $K_{v\alpha}$ cumpla con dos características: i) no genera un canal funcional cuando forma homotetrámeros, ii) se observa un fenotipo de dominancia negativa cuando al menos una $K_{v\alpha}$ mutante forma parte de heterotetrámeros con $K_{v\alpha}$ wt. Con base en los datos obtenidos de la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D en ovocitos de *X. laevis* determinamos que cuando expresamos únicamente a la $K_{v\alpha}$ Shall371D no se genera I_A alguna, con lo cual se cumple una de las propiedades de una $K_{v\alpha}$ dominante negativa (**Fig. 9**).

De manera similar, la coexpresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D junto con $K_{v\alpha}$ wt provoca una disminución significativa de la densidad de la I_A . De manera consistente, el porcentaje de la I_A inhibida a +50 mV aumenta en los ensayos de coexpresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D y la $K_{v\alpha}$ wt, solo en las condiciones de coexpresión 1:1 y 1:3, wt:Shall371D, ya que, cuando microinyectamos una proporción 3 wt:1 Shall371D, no se observó diferencia

significativa (**Fig. 11**). En los ensayos de coexpresión se esperaba que las $K_{V\alpha}$ wt y Shall371D se coensamblaran en complejos tanto homo como heteroméricos, dado que ambas $K_{V\alpha}$ presentan el mismo dominio T1. La probabilidad de formación de un complejo en particular se determinó mediante la función de la distribución binomial. La hipótesis fue que la I_A total tenía que ser igual a la suma de las I_A generadas por los complejos que no incorporaron alguna $K_{V\alpha}$ Shall371D y que el porcentaje de I_A inhibida sería similar a la probabilidad binomial acumulada de los tetrámeros que incorporaron al menos una $K_{V\alpha}$ Shall371D (**Tabla 3**). Nuestros resultados contrastan con las aseveraciones esperadas, dado que, observamos un porcentaje de inhibición menor al esperado en una distribución binomial acumulada (inserto **Fig. 11** y **Tabla 8**). A pesar de que observamos niveles tan bajos de inhibición obtenidos por la coexpresión de $K_{V\alpha}$ s wt y Shall371D logramos determinar que para observar un efecto de dominancia negativa es necesario que al menos una $K_{V\alpha}$ Shall371D esté presente en cada heterotetrámero que conforma un canal K_v , con lo cual se cumple la segunda propiedad que deben de tener las $K_{V\alpha}$ dominantes negativas (**Tabla 8**).

En el presente trabajo, diseñamos a la $K_{V\alpha}$ Shall371D en donde se modificó la Leu de la posición 371 por un Asp en el filtro de selectividad de la $K_{V\alpha}$. Los codones sinónimos, que son los que codifican para el mismo aa, presentan una cuota de uso preferencial relacionada directamente con la historia evolutiva de la especie (Dufton, 1997). Si esta cuota no se respeta, podría ocasionar que la síntesis de una proteína fuera menos eficiente. En casos particulares, el uso de codones especiales o con una frecuencia de uso menor favorece la síntesis de una proteína al propiciar un plegado más lento y eficiente. Sin embargo, como regla general, para expresar un gen exógeno de manera eficiente, es conveniente que se respete ese uso preferencial de codones. En nuestro caso, la construcción de la $K_{V\alpha}$ Shall371D se realizó considerando como objetivo final la expresión de la $K_{V\alpha}$ en *D. melanogaster*, por ende, se mantuvo el uso preferencial de codones de la mosca. En nuestro sistema de expresión en *X. laevis*, teóricamente, el mRNA del canal wt se traduce de 3.4 a 4 veces mejor que el mRNA de la $K_{V\alpha}$ Shall371D. La diferencia en la traducción entre el mRNA wt y el de la $K_{V\alpha}$ Shall371D en *X. laevis*, podría deberse a que el codón GAC introducido en la $K_{V\alpha}$ Shall371D para el aa Asp no es el preferencial dado que en este organismo, existen dos codones que codifican para Asp, GAU y GAC, con frecuencias de uso de 30.3 y 22.6 (por cada mil), respectivamente

(Nakamura *et al.*, 2000). Esta diferencia de 7.7 puntos pudiera explicar la diferencia determinada entre los niveles de expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D y la wt.

7.1.3 La dominante negativa Shall371D y sus efectos sobre la I_A wt residual.

En los ensayos de coexpresión de los canales Shal observamos la presencia de una I_A residual debida a la formación de canales únicamente con $K_{v\alpha}$ wt (**Fig. 11**). Por esta razón, analizamos el efecto de la $K_{v\alpha}$ Shall371D en la función de los canales wt y encontramos que se requieren voltajes más positivos para la activación de los canales wt (**Fig. 12**) y la presencia de la $K_{v\alpha}$ Shall371D favorece que una mayor fracción de canales wt se encuentre inactivados (**Fig. 13**). Una posible explicación a esta observación sería que las $K_{v\alpha}$ Shall371D estarían secuestrando a las $K_{v\beta}$ endógenas del sistema por lo que los canales wt no estarían siendo modulados por las $K_{v\beta}$. Las $K_{v\beta}$ modulan la amplitud de la I_A , las cinéticas de activación e inactivación y el tiempo de recuperación de la inactivación, así como la distribución y/o su transporte subcelular de los canales Kv (Birnbaum *et al.*, 2004; Chouninard *et al.*, 1995; Kurata & Fedida, 2006; Torres *et al.*, 2007; Wang, 2008; Wang & Wu, 1996). Recientemente, se describió en *D. melanogaster*, la participación de la proteína SIDL ("Shal interactor of di-leucine motif") en la localización somatodendrítica de los canales Shal (Diao *et al.*, 2010).

7.2 La inhibición de los canales Shal endógenos causa letalidad en *D. melanogaster*.

7.2.1 Inhibición ubicua de los canales Shal endógenos.

Dado que, determinamos que la $K_{v\alpha}$ Shall371D opera como una $K_{v\alpha}$ dominante negativa en un sistema heterólogo, el siguiente paso fue establecer un sistema *in vivo*. Se evaluó la viabilidad de individuos transgénicos que expresaran la $K_{v\alpha}$ Shall371D en diferentes tejidos/grupos celulares de *D. melanogaster*, utilizando el sistema binario Gal4-*UAS*. Con base en el patrón de expresión de los canales Shal en organismos wt (**Tabla 4**, Chintapalli *et al.*, 2007) elegimos líneas drivers que expresan Gal4 en los tejidos donde se expresan los canales Shal (**Tablas 4 y 5**).

Primero, promovimos la expresión ubicua de la $K_{v\alpha}$ Shall371D en organismos con el genotipo *UAS-Shal371D¹⁷/Act5C-GAL4*. No encontramos individuos adultos con este

genotipo (**Tabla 9 y Fig. 14**), por lo que concluimos que la inhibición ubicua de los canales Shal causa letalidad en alguna etapa previa al estado adulto. Consistentemente la reducción ubicua de los niveles de la $Kv\alpha$ Shal endógeno lograda a través de la expresión de un RNAi específico contra el mRNA de los canales Shal, en individuos transgénicos de genotipos *Act5c-GAL4/CyO; UAS-Shali/+* y *Act5c-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shali/+* impide la llegada de los individuos con estos genotipos a la etapa adulta (**Fig. 15 y Anexo 10.1**).

Para descartar que el RNAi Shali estuviera teniendo un efecto inespecífico sobre otros canales Kv , se inhibió la expresión del mRNA de los canales Shab con tres diferentes RNAi (*UAS-Shabi¹⁰*; *UAS-ShabiC2VT1* y *UAS-ShabiC3LT3*). A diferencia de la letalidad observada con la inhibición de los mRNA de los canales Shal, la inhibición ubicua de los canales Shab no tuvo efecto en la viabilidad de individuos adultos (**Fig. 15 y Anexo 10.2**), por lo que concluimos que, la letalidad en individuos donde se disminuye ubicuamente la expresión de los canales Shal no se debe a algún efecto inespecífico sobre otro canal Kv , en particular el canal Shab.

7.2.2. Inhibición de los canales Shal endógenos en neuronas.

Los canales Shal se expresan en el cerebro de la mosca, por lo que expresamos la $Kv\alpha$ dominante negativa ShalL371D en el cerebro, el ojo, el ganglio torácico abdominal y corazón de la mosca (**Tabla 4**) con el uso del "driver" *elav-GAL4*. Encontramos que las moscas *elav-GAL4/X ó Y; UAS-ShalL371D¹⁷* mueren antes de llegar a la etapa adulta (**Fig. 17**). Sin embargo encontramos que los individuos que deberían expresar el RNAi a partir del transgen *UAS-Shali* son viables como adultos (**Fig. 17 y Anexo 10.3**). Una de las posibles explicaciones a la discrepancia de estos resultados es que el RNAi Shali no se esté expresando correctamente o no funcione con efectividad. Por eso, decidimos sobreexpresar en estos individuos a la proteína Dicer-2 (*UAS-dcr2*), la cual se sabe que participa en un paso limitante en el proceso de interferencia por dsRNA (Dietzl *et al.*, 2007). Sin embargo, no observamos un fenotipo de letalidad en adultos cuando indujimos la expresión del RNAi Shali en el SN de *D. melanogaster* en individuos con los genotipos *elav-GAL4/X ó Y; UAS-dcr2/+; UAS; Shali/+* (**Fig. 17 y Anexo 10.3**). Existe la posibilidad de que las isoformas del mRNA de los canales Shal neuronales no sean blanco del RNAi utilizado para inhibirlos. Con base en estos experimentos determinamos que la expresión de la $Kv\alpha$ ShalL371D en el SN de la mosca tiene un efecto deletéreo sobre la viabilidad de

moscas adultas a diferencia del RNAi Shali. La $K_{v\alpha}$ Shall371D interacciona con los canales wt endógenos y los inhibe, lo cual posiblemente ejerza un efecto sobre la viabilidad (**Fig. 17**). Esta hipótesis es consistente con trabajos previos donde se observó que líneas “knock-out” contra el canal Shal, en neuronas o motoneuronas, afectan las propiedades electrofisiológicas de estas células y la locomoción de *D. melanogaster* comprobando así que la inhibición del canal Shal en un órgano específico provoca fenotipos relacionados al órgano blanco (Ping *et al.*, 2011). Desafortunadamente en este trabajo no se menciona el impacto de la expresión en el SN de la dominante negativa contra los canales Shal (DNK_{v4}) en la viabilidad de las moscas lo que nos imposibilita comparar sus índices de sobrevivencia con nuestros resultados. Sin embargo, considerando a los organismos adultos observados en el trabajo arriba citado, es posible que la dominante negativa DNK_{v4} permita que cierto porcentaje de organismos sobrevivan a la expresión de la dominante negativa DNK_{v4}, de la misma forma como ocurrió cuando utilizamos al RNAi contra los mRNA de los canales Shal (*UAS-Shali*, este trabajo, **Anexo 10.1**). Esto sugiere diferencias en la eficiencia de inhibición entre la dominante negativa Shall371D y la DNK_{v4}, con respecto al porcentaje de organismos que escapan a un fenotipo de letalidad (“escapers”).

7.2.3 Inhibición de los canales Shal endógenos en músculos.

La expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D en el sistema muscular de *D. melanogaster* incluyendo el tracto gastrointestinal y el corazón (**Tabla 4**) a través del “driver” Mef2-GAL4, también ocasionó la ausencia de organismos adultos del genotipo *UAS-Shall371D¹⁷/Mef2-GAL4* (**Tabla 11** y **Fig. 18**). Esto indica un papel relevante de los canales Shal en el funcionamiento de los músculos de la mosca. A diferencia de lo que se había observado en la línea con el RNAi Shali expresado en otros tejidos, su expresión en músculos causó semiletalidad en las moscas adultas con el genotipo *UAS-dcr2/Mef2-GAL4; UAS-Shali/+*, lo que confirma que Dicer-2 exagera el fenotipo provocado por la expresión de un RNAi (**Fig. 19** y **Anexo 10.5**, Dietzl *et al.*, 2007). Estos resultados muestran un papel relevante de los canales Shal residentes de los músculos, indispensable para la viabilidad de la mosca (**Fig. 19**).

Hasta cierto punto es desconcertante que observemos un efecto similar en individuos que expresan el RNAi Shali ó la dominante negativa Shall371D en los músculos

pero no así en el SN de *D. melanogaster*. Nos cuestionamos si existen diferencias en los componentes de la maquinaria implicada en el silenciamiento de genes por RNAi en el SN y en los músculos de *D. melanogaster*. Otra posibilidad sería que los canales Shal nativos de los músculos sean diferentes a los canales Shal neuronales ya que la variabilidad de los canales Shal radica en el uso de “splicing” alternativo para generar isoformas de los canales de esta subfamilia, tal como ocurre para otras subfamilias de canales Kv (Iverson *et al.*, 1997; Pongs *et al.*, 1988). El RNAi Shali podría abatir la función de las isoformas de los canales Shal musculares y no la de los canales neuronales, causando la semiletalidad observada. Finalmente, también existe la posibilidad que al abatir a los canales Shal neuronales otra subfamilia de canales Kv realice las funciones que le corresponden a los canales Shal, los canales Shaker son los candidatos más probables por generar I_A.

7.2.4 La inducción de la expresión de la Kv α Shall371D en órganos de *D. melanogaster* que no expresan canales Shal endógenos.

Hasta el momento, los resultados discutidos se refieren a la expresión de la dominante negativa Shall371D en tejidos donde se tenía la certeza de que se expresaban canales Shal endógenos. Con la finalidad de tener otro panorama, el Dr. Ignacio López González expresó la Kv α Shall371D en la glándula salival de larvas de tercer instar, con el “driver” Sgs3-GAL4. En este órgano no se ha observado la expresión de canales Shal (Chintapalli *et al.*, 2007). El 92% de la población UAS-Shall371D/Sgs3-GAL4 es viable (dato no mostrado). Asimismo, las mocas con genotipo UAS-Shali/Sgs3-GAL4 son viables (dato no mostrado). La inducción de la expresión de la dominante negativa Shall371D en un tejido carente de canales Shal endógenos no afecta la viabilidad de *D. melanogaster*.

7.3 Establecimiento de una línea experimental para evaluar la formación de la memoria olfativa en *D. melanogaster*.

Como parte final de este trabajo evaluamos la inhibición de los canales Shal del CF. Esta estructura neuronal nos interesó porque tiene una participación importante en los procesos de aprendizaje y de memoria olfativa (Davis, 2005; Gasque *et al.*, 2006; Heinsenber, 2003; Keene & Wadell, 2007; McGuire *et al.*, 2005). Con las herramientas que

generamos en este trabajo, podremos evaluar, en un futuro, la participación de los canales Shal en procesos cognitivos.

En el laboratorio se cuenta con la línea de moscas 7A2-GAL4 que dirige la expresión del factor Gal4 al CF. La progenie de la clase *UAS-ShalL371D¹⁷/7A2-GAL4; UAS-chameleon/+* muestra semiletalidad en machos comparada con las clases control (**Tabla 12 y Fig. 20**).

De igual forma, se indujo la expresión del RNAi Shali específicamente en el CF de la mosca para corroborar el resultado obtenido con la dominante negativa Shall371D. Las clases experimentales de esta cruce *UAS-dcr2/7A2-GAL4; UAS-Shali/UAS-chameleon* y *7A2-GAL4/CyO; UAS-Shali/UAS-chameleon* sobreviven igual que las clases control, lo que nos indica que la inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal en el CF no es letal (**Fig. 21 y Anexo 10.7**). La inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal en el CF de la mosca, mediante el RNAi Shali no causó letalidad como la observada cuando utilizamos la dominante negativa Shall371D.

El CF se ha estudiado ampliamente por su papel en el proceso de aprendizaje asociativo. Recientemente se reportó que también participa en procesos de comportamiento de larva como la alimentación y en la locomoción. Por consiguiente el CF está involucrado en la viabilidad de las larvas. El gen *RanBPM* que codifica para la "ran-binding protein in the microtubule organizing center", es altamente expresado en las células del CF y se requiere en el SN para la modulación de la locomoción inducida por la luz y para el comportamiento de alimentación y crecimiento (Scantlebury *et al.*, 2010). Nuestros datos indican que los canales Shal del CF podrían participar en procesos fundamentales para la supervivencia de la larva o el adulto por la semiletalidad observada en machos por la expresión de la $K_{V\alpha}$ Shall371D en el CF (**Fig. 20**).

El papel de la I_A en el proceso de memoria en mamíferos ha sido complicado de caracterizar debido a que la I_A está codificada por múltiples genes. Por ejemplo, sabemos que la I_A en las neuronas piramidales de la corteza visual de ratón está codificada por, al menos, tres canales de K_V , dos de la subfamilia Shal ($K_{V4.2}$ y $K_{V4.3}$) y uno de la subfamilia Shaker ($K_{V1.4}$, Norris & Nerbonne, 2010). Por otra parte, no existen herramientas farmacológicas lo suficientemente específicas para abolir en su totalidad a la I_A . Por ejemplo, aún las toxinas específicas para los canales Shal, como las Phrixotoxinas (PaTx1 y PaTx2), son incapaces de bloquear completamente a las corrientes de Shal/ K_{V4}

expresadas heterológamente en ovocitos de *X. laevis* o en neuronas (Gasque et al., 2005; Ryglewski & Duch, 2009). Aún el uso de mutaciones ha mostrado poca eficacia para eliminar a la I_A en mamíferos, debido a la redundancia funcional sustentada en múltiples genes que codifican para esta corriente, y/o al remodelado eléctrico que ocurre por la homeostasis celular intrínseca (Chen et al., 2006; MacLean et al., 2003; Malin & Nerbonne, 2001; Nerbonne et al., 2008; Norris & Nerbonne, 2010).

En *D. melanogaster*, solamente dos genes codifican para la I_A en el CF, Shaker y Shal, mientras que los modelos de mamíferos utilizados hasta la fecha contienen múltiples genes de estas subfamilias. Por otra parte, los canales Shaker de *D. melanogaster* son los responsables de dar origen al componente mayoritario de la I_A en los músculos mientras que en las neuronas se encuentran restringidos a los axones y a las terminales nerviosas (Broadie & Bate, 1993; Rogero et al., 1997; Salkoff et al., 1992; Solc et al., 1987; Ueda & Wu, 2006; Wei et al., 1990). En contraste, los canales Shal se localizan exclusivamente en las regiones somatodendríticas de las neuronas y son los responsables de producir al componente mayoritario de la I_A en los somas de casi la totalidad de las neuronas de *D. melanogaster* (Bergquist et al., 2010; Diao et al., 2010; Gasque et al., 2005; Solc et al., 1987; Tsunoda & Salkoff, 1995). Además de estas diferencias en los patrones de expresión y localización subcelular entre los canales Shaker y Shal, estos también presentan diferentes propiedades biofísicas. Entre las más notables están la inactivación rápida claramente dependiente de voltaje que presentan los canales Shaker, mientras que la inactivación de los canales Shal, es usualmente independiente de voltaje aún cuando cambia de célula a célula. De igual forma, el rango de activación por voltaje de los canales Shal es significativamente más negativo. Además, los canales Shal, a diferencia de los canales Shaker, están altamente conservados entre distintas especies con respecto a su secuencia, localización subcelular, y propiedades biofísicas (Broadie & Bate, 1993; Gasque et al., 2005; Solc et al., 1987; Tsunoda & Salkoff, 1995).

En conjunto, todas las observaciones arriba mencionadas apoyan nuestra propuesta de utilizar a *D. melanogaster* como un modelo para el estudio y caracterización de los canales K_v en el aprendizaje y la memoria. Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que la $K_v\alpha$ Shall371D es una herramienta molecular que nos permitirá inhibir la expresión funcional de canales Shal nativos del CF y de esta forma ahondar en el papel fisiológico que desempeñan en la formación de la memoria olfativa de *D. melanogaster*.

8. Conclusiones.

8.1. De la expresión heteróloga de las $K_{v\alpha}$ Shal en ovocitos de *X. laevis* podemos concluir:

- La expresión de la $K_{v\alpha}$ wt es la correcta con base en parámetros biofísico.
- La $K_{v\alpha}$ Shall371D actúa como una $K_{v\alpha}$ dominante negativa porque:

La conducción de iones K^+ se inhibe cuando expresamos únicamente a la $K_{v\alpha}$ Shall371D.

La coexpresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D junto con $K_{v\alpha}$ wt provoca una disminución significativa de la densidad de la I_A .

Se requieren voltajes muy positivos para la activación de los canales wt en presencia de la $K_{v\alpha}$ Shall371D.

Existe un incremento de canales wt inactivados cuando la $K_{v\alpha}$ Shall371D está presente.

8.2 De la evaluación de la línea *UAS-Shall371D¹⁷* podemos concluir:

- La inducción de la expresión ubicua de la $K_{v\alpha}$ Shall371D causa letalidad.
- La inhibición de los canales Shal neuronales mediante la inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D causa letalidad, a diferencia de la inhibición del mRNA de los canales.
- La inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D utilizando el driver *Mef2-GAL4* causa letalidad.

8.3 La inducción de la expresión de la $K_{v\alpha}$ Shall371D en el CF causa semiletalidad en machos, no así la disminución de la expresión de los canales wt por el método de RNAi. Obtuvimos progenie viable que porta la inserción *UAS-Shall371D¹⁷* junto con el driver *7A2-GAL4*. Esto nos permitirá tener animales donde podremos evaluar el papel de los canales Shal en procesos cognitivos.

8.4 Además, la $K_{v\alpha}$ Shall371D es una herramienta molecular que nos permitirá evaluar el papel fisiológico de los canales Shal endógenos de diversos tejidos o grupos celulares de *D. melanogaster*.

9. Perspectivas.

El desarrollo de una herramienta molecular como la dominante negativa ShalL371D permite el estudio del papel fisiológico de los canales Shal en diferentes áreas. Para fines prácticos, las perspectivas son a corto plazo y se centran en la continuación de este trabajo. En cuanto a la expresión de los canales Shal en el sistema heterólogo, falta concluir con evidencia experimental que la naturaleza de los canales K_v sea realmente de la subfamilia Shal. Por eso, se propone inhibirlos específicamente utilizando herramientas farmacológicas específicas contra los canales Shal como las Phrixotoxinas (Gasque et al., 2005).

En el presente trabajo no coexpresamos a la proteína Hk y/o SIDL junto con las $K_v\alpha$ Shal, por lo que sería interesante en un futuro, coexpresar a ambas subunidades en ovocitos de *X. laevis* para evaluar la posible modulación de la regulación y distribución subcelular de los canales Shal por estas proteínas. De esta manera, descartar la posibilidad de que la $K_v\alpha$ ShalL371D esté interfiriendo en el transporte hacia la membrana celular de los canales wt a través de obstruir la interacción de los canales wt con las $K_v\beta$ (Chouninard et al., 1995; Diao et al., 2010; Wang & Wu, 1996; Yao & Wu, 1999).

Los ensayos de viabilidad realizados se centran en la etapa adulta de la mosca, por lo que, se pueden realizar ensayos genéticos más precisos controlando la inducción o inhibición de la expresión del factor Gal4 por lo tanto condicionando la expresión de la dominante negativa ShalL371D. Para determinar las etapas del desarrollo de la mosca en la que la falta de los canales Shal produce letalidad.

Para determinar si la $K_v\alpha$ ShalL371D está actuando como una dominante negativa *in vivo*, se podría utilizar la progenie viable con genotipo *UAS-ShalL371D^{17/7A2}-GAL4; UAS-chameleon/+*, que en teoría se induce la expresión de la dominante negativa ShalL371D en el CF, para realizar cultivos primarios de cerebro o del CF. Para determinar si la $K_v\alpha$ ShalL371D tiene un efecto sobre las I_A totales se pueden obtener registros electrofisiológicos de estas células. La expresión de la proteína Chameleon podría tener dos funciones, i) la de marcador de las células del CF al detectarlas por fluorescencia y ii) sensor de los niveles de Ca^{2+} intracelular en células que expresan a la $K_v\alpha$ dominante negativa ShalL371D, antes y después de un entrenamiento para evaluar el aprendizaje y la memoria olfativa en la mosca.

Los ensayos de viabilidad realizados en este trabajo son una forma indirecta de evaluar la inhibición de la expresión de los canales *Shal*. Sin embargo, para confirmar que el fenotipo de letalidad observado se debe a la falta de expresión de los canales *Shal* es necesario determinar los niveles de mRNA del gen *Shal* por ensayos tipo Northern y/ó RT-PCR cuantitativo y de la proteína por ensayos tipo Western Blot ó de inmunofluorescencia. Sin embargo aún no contamos con anticuerpos contra las $K_{v\alpha}$ *Shal*.

En el laboratorio se cuenta con las herramientas moleculares para generar $K_{v\alpha}$ wt y mutantes con etiquetas para su identificación y localización. Con esto, se lograría realmente saber si las dos $K_{v\alpha}$ (wt y *Shal*L371D) están interaccionando físicamente y para determinar si su localización subcelular se modifica en los procesos de aprendizaje y memoria olfativa.

10. Anexos.

10.1 Inducción de la inhibición ubicua de los canales Shal mediante el RNAi Shali.

Realizamos tres cruzas independientes con individuos con el genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* con moscas de la línea *Act5C-GAL4/CyO*. En el **Esquema 13** se muestran las ocho clases esperadas para esta crza, dos de ellas no son viables porque heredan, de manera homóciga, al marcador *CyO*; dos clases correspondieron a las clases experimentales al heredar tanto la inserción del factor Gal4 como la inserción *UAS-Shali*; y las cuatro restantes son clases control. Cuantificamos 718 moscas adultas viables, 361 hembras y 357 machos. De las clases experimentales, *UAS-dcr2/Act5C-GAL4; UAS-Shali/+* y *Act5C-GAL4/CyO; UAS-Shali/+*, solo eclosionaron dos moscas adultas por lo que podemos concluir que la inhibición del mRNA de los canales Shal con el RNAi causa letalidad. Estos resultados se muestran en la **Tabla 13** y en la **Figura 22**.

Esquema 13

Esquema de la crza realizada para evaluar la expresión ubicua del RNAi Shali contra los mRNA de los canales Shal.

Dos clases heredaron ambos componentes del sistema de expresión bipartito Gal4-UAS (clases experimentales, en negritas).

Machos <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>Act5C-GAL4/CyO</i>
Alelos y/ó cromosomas	<i>Act5C-GAL4; +</i>	<i>CyO; +</i>
<i>UAS-dcr2; UAS-Shali</i>	<i>UAS-dcr2/Act5C-GAL4; UAS-Shali/+</i>	<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/+</i>
<i>UAS-dcr2; MKRS</i>	<i>Act5C-GAL4/UAS-dcr2; MKRS/+</i>	<i>UAS-dcr2/CyO; MKRS/+</i>
<i>CyO; UAS-Shali</i>	<i>Act5C-GAL4/CyO; UAS-Shali/+</i>	LETAL
<i>CyO; MKRS</i>	<i>Act5C-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	LETAL

Tabla 13

La expresión generalizada del RNAi contra los mRNA de los canales Shal ocasiona un fenotipo de letalidad en *D. melanogaster*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>Act5C-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shali/+</i>	♀	1 / 361	0.33 ± 0.33 / 30 ± 1.26 *	0.01 ± 0.01*
	♂	1 / 357	0.33 ± 0.33 / 29.67 ± 1.08 *	0.01 ± 0.01 *
<i>Act5C-GAL4/UAS-dcr2; MKRS/+</i>	♀	89 / 361	29.67 ± 2.03 / 30 ± 1.26	0.99 ± 0.05
	♂	89 / 357	29.67 ± 1.86 / 29.67 ± 1.08	1 ± 0.03
<i>Act5C-GAL4/CyO; UAS-Shali/+</i>	♀	0 / 361	0 / 30 ± 1.26 *	0 *
	♂	0 / 357	0 / 29.67 ± 1.08 *	0 *
<i>Act5C-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	♀	101 / 361	33.67 ± 0.88 / 30 ± 1.26	1.13 ± 0.07
	♂	89 / 357	29.67 ± 0.33 / 29.67 ± 1.08	1 ± 0.04
<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/+</i>	♀	84 / 361	28 ± 1.73 / 30 ± 1.26	0.93 ± 0.03
	♂	92 / 357	30.67 ± 3.84 / 29.67 ± 1.08	1.03 ± 0.1
<i>UAS-dcr2/CyO; MKRS/+</i>	♀	86 / 361	28.67 ± 2.73 / 30 ± 1.26	0.95 ± 0.05
	♂	86 / 357	28.67 ± 2.03 / 29.67 ± 1.08	0.97 ± 0.08
<i>CyO/CyO; UAS-Shali/+</i>	♀	0 / 361	0 / 30 ± 1.26 *	0 *
	♂	0 / 357	0 / 29.67 ± 1.08 *	0 *
<i>CyO/CyO; MKRS/+</i>	♀	0 / 361	0 / 30 ± 1.26 *	0 *
	♂	0 / 357	0 / 29.67 ± 1.08 *	0 *

Se esperaba un promedio de 30 ± 1.26 hembras y 29.67 ± 1.08 machos para cada clase. * p < 0.001, n=3 cruces independientes.

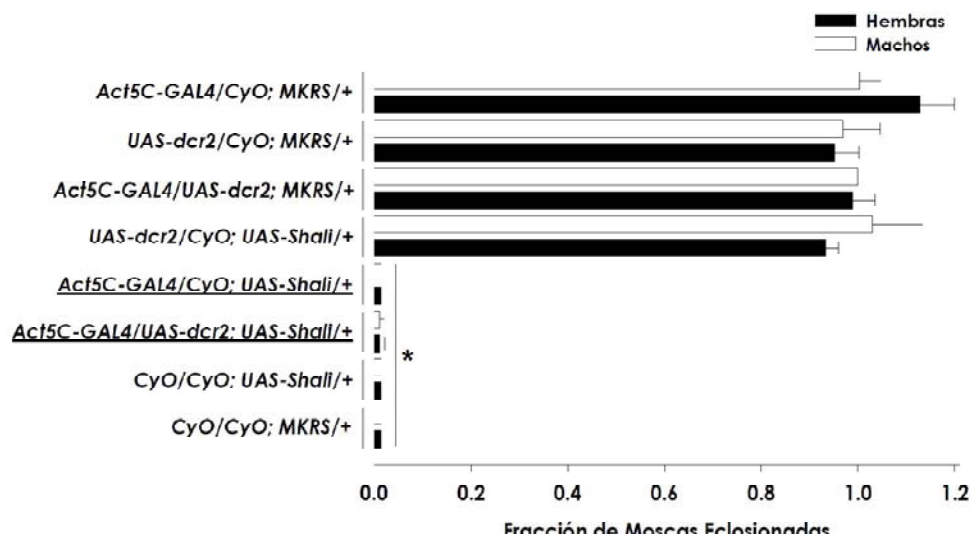


Figura 22. La inhibición de la expresión de los mRNA de los canales Shal causa letalidad. En la gráfica se muestra la fracción de moscas eclosionadas para cada clase resultante de la cruce de individuos con genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* con moscas de la línea *Act5C-GAL4/CyO*, tanto para hembras (barras negras) como para machos (barras blancas). No se observó progenie de las clases experimentales *UAS-dcr2/Act5C-GAL4; UAS-Shali/+* y *Act5C-GAL4/CyO; UAS-Shali/+*. Las barras representan el valor promedio \pm E.E.M. * $p < 0.001$, $n = 3$ cruces independientes.

10.2 Inducción de la expresión ubicua de los RNAi contra los mRNA de los canales Shab.

Evaluamos la viabilidad de la progenie resultante de la cruce de moscas de la línea *UAS-Shabi¹⁰* con moscas de la línea *Act5C-GAL4*. En el **Esquema 14** se muestran los genotipos de las ocho clases esperadas de esta cruce. De las ocho clases esperadas, dos fueron letales por heredar al marcador *CyO* en doble dosis génica, cuatro de las clases heredaron el sistema de expresión incompleto por lo tanto se consideraron clases control, las dos clases restantes fueron las clases experimentales de la cruce ya que heredaron tanto la inserción *UAS-Shabi¹⁰* como la del factor *Gal4*. Contabilizamos un total de 601 moscas de la progenie de tres cruces independientes ($n = 3$), 322 hembras y 279 machos. En la gráfica de la **Figura 23**, se muestran los valores de la fracción de moscas eclosionadas de las clases experimentales (*UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+* y *UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; MKRS/+*), los cuales no presentan diferencia estadística significativa con respecto a los valores de las clases control. Por lo tanto, concluimos que la inhibición generalizada de los mRNA de los canales *Shab* no afecta la viabilidad de *D. melanogaster*.

Esquema 14

Esquema de cruce de individuos con el genotipo *UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS* con individuos de la línea *Act5C-GAL4/CyO*.

Dos de las clases esperadas heredaron ambos componentes del sistema de expresión Gal4-UAS (clases experimentales, en negritas).

Machos <i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>act5C-Gal4/act5C-Gal4; +/+</i>
Alelos y/ó cromosomas	<i>Act5C-GAL4; +</i>	<i>CyO; +</i>
<i>UAS-Shabi¹⁰; UAS-dcr2</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/+</i>
<i>UAS-Shabi¹⁰; MKRS</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; MKRS/+</i>	<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/+</i>
<i>CyO; UAS-dcr2</i>	<i>Act5C-GAL4/CyO; UAS-dcr2/+</i>	LETAL
<i>CyO; MKRS</i>	<i>Act5C-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	LETAL

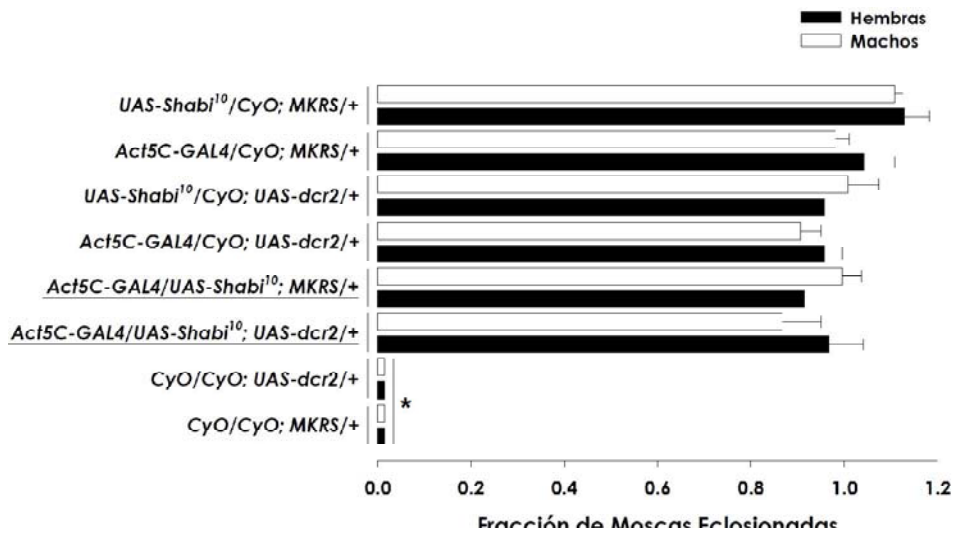


Figura 23. La expresión ubicua del RNAi *Shabi¹⁰* contra los mRNA de los canales *Shab* no afecta la viabilidad de *D. melanogaster*. En la gráfica se muestran los valores de la fracción de moscas eclosionadas tanto para hembras (barras negras) como para machos (barras blancas) de las clases resultantes de la cruce de individuos con genotipo *UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS* con moscas de la línea *Act5C-GAL4/CyO*. Las barras representan el promedio ± E.E.M. **p* < 0.001, *n* = 3 cruces independientes.

Tabla 14

Viabilidad de las clases experimentales con el genotipo *UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+* y *UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; MKRS/+*.

La expresión ubicua del RNAi Shabi contra los mRNA de los canales Shab no afecta la viabilidad en *D. melanogaster*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fración moscas eclosionadas
<i>UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+</i>	♀	73 / 322	24.33 ± 3.76 / 24.93 ± 2.36	0.97 ± 0.07
	♂	68 / 279	22.67 ± 3.38 / 26.33 ± 4.18	0.87 ± 0.08
<i>UAS-Shabi¹⁰/Act5C-GAL4; MKRS/+</i>	♀	69 / 322	23.00 ± 3.21 / 24.93 ± 2.36	0.92 ± 0.05
	♂	78 / 279	26.00 ± 3.51 / 26.33 ± 4.18	1 ± 0.04
<i>Act5C-GAL4/CyO; UAS-dcr2/+</i>	♀	71 / 322	23.67 ± 1.2 / 24.93 ± 2.36	0.96 ± 0.04
	♂	71 / 279	23.67 ± 3.18 / 26.33 ± 4.18	0.91 ± 0.04
<i>Act5C-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	♀	77 / 322	25.67 ± 0.67 / 24.93 ± 2.36	1.04 ± 0.07
	♂	77 / 279	25.67 ± 3.48 / 26.33 ± 4.18	0.98 ± 0.03
<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/+</i>	♀	72 / 322	24.00 ± 3.06 / 24.93 ± 2.36	0.96 ± 0.03
	♂	81 / 279	27.00 ± 6.03 / 26.33 ± 4.18	1.01 ± 0.07
<i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; MKRS/+</i>	♀	85 / 322	28.33 ± 3.84 / 24.93 ± 2.36	1.13 ± 0.05
	♂	88 / 279	29.33 ± 5.04 / 26.33 ± 4.18	1.11 ± 0.02
<i>CyO/CyO; UAS-dcr2/+</i>	♀	0 / 322	0 / 24.93 ± 2.36 *	0 *
	♂	0 / 279	0 / 26.33 ± 4.18 *	0 *
<i>CyO/CyO; MKRS/+</i>	♀	0 / 322	0 / 24.93 ± 2.36 *	0 *
	♂	0 / 279	0 / 26.33 ± 4.18 *	0 *

Para cada clase se esperaban, en promedio, 24.93 ± 2.36 hembras y 26.33 ± 4.18 machos. *p < 0.001, n=3 cruces independientes.

Realizamos tres cruces independientes (n=3) de individuos con genotipo *UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS* con moscas de la línea *Act5C-GAL4/CyO*.

De esta cruce se esperaban cuatro clases, dos clases experimentales y dos clases control, en el **Esquema 15** se muestran los genotipos de las clases esperadas para esta cruce. De las tres cruces independientes, se contaron un total de 495 individuos de los cuales 261 fueron hembras y 234 machos. Nuestros resultados indican que la expresión ubicua del RNAi ShabiC2VT1 no es letal, dado que, los valores obtenidos para cada una de las clases esperadas en esta cruce fueron estadísticamente similares (**Fig. 24 y Tabla 15**).

Esquema 15

Clases esperadas de la cruce de moscas *UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS* con moscas *act5C-Gal4/CyO*.

De las clases esperadas, dos heredaron la inserción *UAS-ShabiC2VT1* junto con la del factor Gal4 y solo una de ellas la inserción codificante para la proteína Dicer-2 (consideradas clases experimentales, en negritas); las clases control fueron las que no heredaron la inserción *Act5C-GAL4*.

Machos	X	Hembras vírgenes
<i>UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS</i>		<i>Act5C-GAL4/CyO</i>
Alelos y/o cromosomas	<i>Act5C-GAL4; +</i>	<i>CyO; +</i>
<i>UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/+</i>
<i>UAS-ShabiC2VT1; MKRS</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/Act5C-GAL4; MKRS/+</i>	<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+</i>

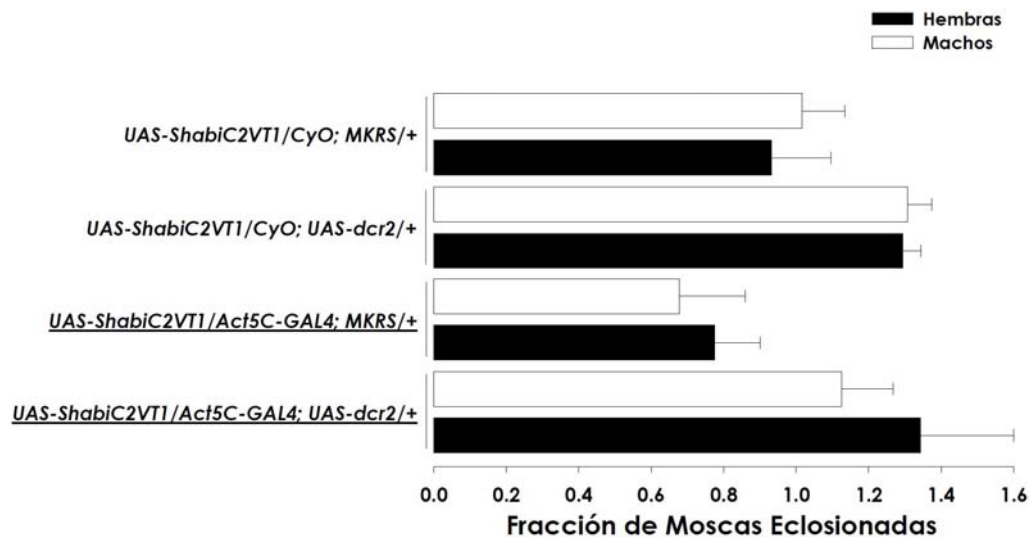


Figura 24. La expresión ubicua del RNAi C2VT1 contra los mRNA de los canales Shab no afecta la viabilidad de *D. melanogaster*. Realizamos tres cruces independientes de moscas con los genotipos *UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS* y *Act5C-GAL4/CyO* para evaluar si la expresión generalizada del RNAi ShabiC2VT1. Las cuatro clases resultantes fueron viables. Las barras representan (blancas: hembras y negras: machos) el promedio \pm E.E.M.

Tabla 15 Viabilidad de la progenie resultante de la cruce de moscas *UAS-ShabiC2VT1/UAS-ShabiC2VT1; UAS-dcr2/MKRS* con moscas *Act5C-GAL4/CyO*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas Eclosionadas
<i>UAS-ShabiC2VT1/Act5C-GAL4; UAS-dcr2/+</i>	♀	80 / 261	26.67 ± 4.26 / 20 ± 0.68	1.35 ± 0.44
	♂	63 / 234	21 ± 1.15 / 19 ± 1.35	1.15 ± 0.27
<i>UAS-ShabiC2VT1/Act5C-GAL4; MKRS/+</i>	♀	47 / 261	15.67 ± 2.91 / 20 ± 0.68	0.78 ± 0.23
	♂	40 / 234	13.33 ± 4.48 / 19 ± 1.35	0.69 ± 0.32
<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; UAS-dcr2/+</i>	♀	78 / 261	26 ± 1.15 / 20 ± 0.68	1.30 ± 0.09
	♂	74 / 234	24.67 ± 0.88 / 19 ± 1.35	1.33 ± 0.13
<i>UAS-ShabiC2VT1/CyO; MKRS/+</i>	♀	56 / 261	18.67 ± 3.18 / 20 ± 0.68	0.94 ± 0.28
	♂	57 / 234	19 ± 1 / 19 ± 1.35	1.04 ± 0.22

Se esperaban en promedio 20 ± 0.68 hembras y 19 ± 1.35 machos de cada clase. n=3 cruces independientes.

Seleccionamos individuos con el genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS* para cruzarlas con individuos con genotipo *Act5C-GAL4/Act5C-GAL4*. En el **Esquema 16** se enlistan las cuatro clases esperadas para esta cruce. De la progenie resultante de tres cruces independiente, contamos 548 hembras y 423 machos, dando un total de 971 mosca. Con los valores de la fracción de moscas eclosionadas para cada clase se construyó la gráfica de la **Figura 25**.

Esquema 16 Clases esperadas de la cruce de moscas con el genotipo *UAS-dcr2/CyO*; *UAS-ShabiC3LT3/MKRS* y moscas con genotipo *Act5C-GAL4/Act5C-GAL4*.

Las clases experimentales (en negritas) heredaron tanto la inserción del RNAi como la del factor Gal4 pero solo una de ellas también heredo la inserción que codifica para la proteína Dicer-2, las demás clases se consideraron clases control de la misma cruce.

Machos <i>UAS-dcr2/CyO</i> ; <i>UAS-ShabiC3LT3/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>act5C-Gal4/act5C-Gal4</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>Act5C-Gal4</i> ; +
<i>UAS-dcr2</i> ; <i>UAS-ShabiC3LT3</i>		<i>UAS-dcr2/Act5C-GAL4</i> ; <i>UAS-ShabiC3LT3/+</i>
<i>UAS-dcr2</i> ; <i>MKRS</i>		<i>UAS-dcr2/Act5C-GAL4</i> ; <i>MKRS/+</i>
<i>CyO</i> ; <i>UAS-ShabiC3LT3</i>		<i>Act5C-GAL4/CyO</i> ; <i>UAS-ShabiC3LT3/+</i>
<i>CyO</i> ; <i>MKRS</i>		<i>Act5C-GAL4/CyO</i> ; <i>MKRS/+</i>

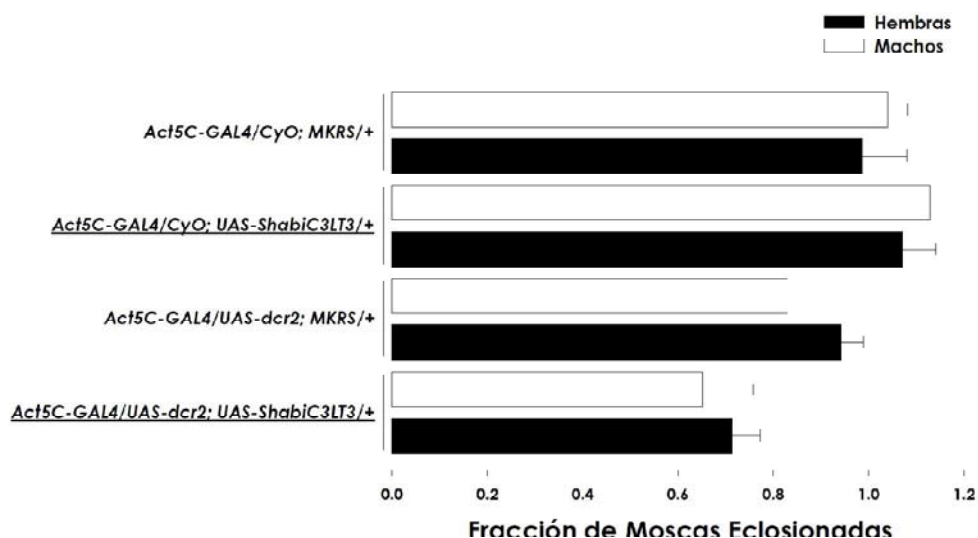


Figura 25. La expresión ubicua del RNAi C3LT3 contra los mRNA de los canales *Shab* no afecta la viabilidad de *D. melanogaster*. En la gráfica se muestra los valores promedio de la fracción de moscas eclosionadas tanto para hembras (barras negras) como machos (barras blancas) de las cuatro clases resultantes de la cruce de individuos con el genotipo *UAS-dcr2/CyO*; *UAS-ShabiC3LT3/MKRS* con moscas con genotipo *Act5C-GAL4/Act5C-GAL4*. Las barras representan el promedio \pm D.E.M. n=3 cruces independientes.

Tabla 16

Viabilidad de la progenie resultante de la cruce de moscas *UAS-dcr2/CyO; UAS-ShabiC3LT3/MKRS* con moscas *Act5C-GAL4/Act5C-GAL4*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>UAS-dcr2/Act5C-GAL4; UAS-ShabiC3LT3/+</i>	♀	105 / 548	35 ± 0.58 / 49.22 ± 1.85	0.72 ± 0.06
	♂	75 / 423	25 ± 1.73 / 38.67 ± 2.34	0.66 ± 0.11
<i>UAS-dcr2/Act5C-GAL4; MKRS/+</i>	♀	139 / 548	46.33 ± 2.6 / 49.22 ± 1.85	0.95 ± 0.07
	♂	96 / 423	32 ± 1.53 / 38.67 ± 2.34	0.84 ± 0.06
<i>Act5C-GAL4/CyO; UAS-ShabiC3LT3/+</i>	♀	158 / 548	52.67 ± 0.67 / 49.22 ± 1.85	1.08 ± 0.05
	♂	131 / 423	43.67 ± 2.85 / 38.67 ± 2.34	1.14 ± 0.02
<i>Act5C-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	♀	146 / 548	48.67 ± 3.84 / 49.22 ± 1.85	1.0 ± 0.04
	♂	121 / 423	40.33 ± 3.18 / 38.67 ± 2.34	1.05 ± 0.10

Las clases experimentales (en negritas) de la cruce fueron viables y no se observa diferencia estadística significativa con las clases control. n=3 cruces independientes. Para cada clase se esperaban 49.22 ± 1.85 hembras y 38.67 ± 2.34 machos. Promedio ± D.E.M.

10.3 Inducción de la expresión del RNAi Shali en el SN de *D. melanogaster*.

Los genotipos de los individuos para esta cruce fueron *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* y individuos *elav-GAL4/elav-GAL4*, realizamos tres cruces independientes (n=3). De esta cruce se obtuvieron ocho clases, las cuales se enlistan en el **Esquema 17**. Cuatro de las clases corresponden a clases experimentales y las otras cuatro a clases control. Cuantificamos 801 hembras y 746 machos, dando un total de 1547 individuos (**Tabla 17**). Nuestros datos indican que la inhibición de los mRNA de los canales Shal, mediante el uso del RNAi Shali, en las neuronas de *D. melanogaster* no afecta la viabilidad de las moscas (**Fig. 26**).

Esquema 17

Cruza de individuos con genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* con moscas de genotipo *elav-GAL4/elav-GAL4*.

El 50% de las clases esperadas constituyeron las clases experimentales (en negritas).

Machos <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>elav-GAL4/elav-GAL4</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>elav-GAL4; +; +</i>
<i>X; UAS-dcr2; UAS-Shali</i>		<i>elav-GAL4/X; UAS-dcr2/+; UAS-Shali/+</i>
<i>Y; UAS-dcr2; UAS-Shali</i>		<i>elav-GAL4/Y; UAS-dcr2/+; Shali/+</i>
<i>X; UAS-dcr2; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/X; UAS-dcr2/+; MKRS/+</i>
<i>Y; UAS-dcr2; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/Y; UAS-dcr2/+; MKRS/+</i>
<i>X; CyO; UAS-Shali</i>		<i>elav-GAL4/X; CyO/+; UAS-Shali/+</i>
<i>Y; CyO; UAS-Shali</i>		<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; UAS-Shali/+</i>
<i>X; CyO; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/X; CyO/+; MKRS/+</i>
<i>Y; CyO; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; MKRS/+</i>

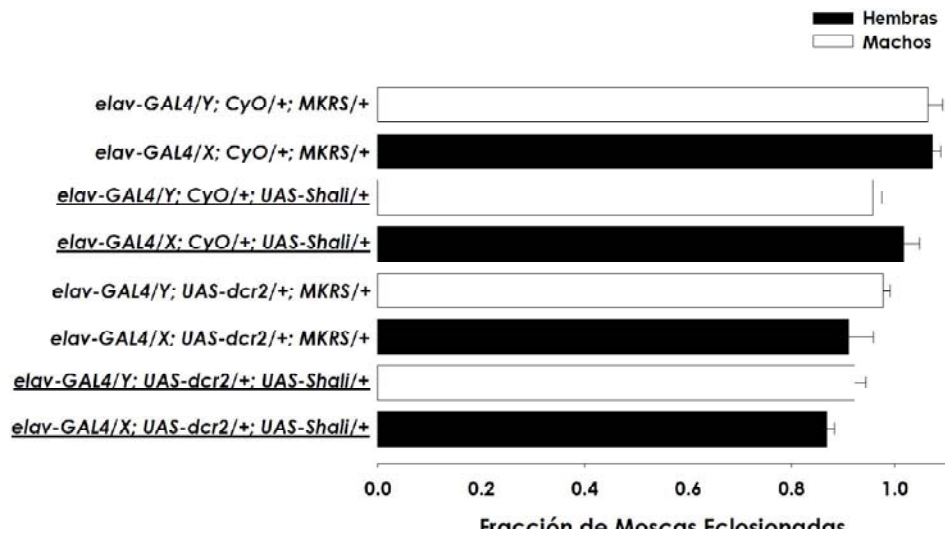


Figura 26. La expresión del RNAi contra los mRNA de los canales Shal en el SN de *D. melanogaster* no afecta la viabilidad de las moscas. La fracción de moscas eclosionadas, para las clase resultantes de la cruce de moscas con genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* con moscas *elav-GAL4/elav-GAL4*, se muestra en la gráfica para moscas hembras (barras negras) y machos (barras blancas). No se observa diferencia estadística significativa entre las clases experimentales y las clases control. Las barras representan el promedio \pm E.E.M.

Tabla 17 Viabilidad de las moscas que heredan los elementos *elav-GAL4* y *UAS-Shali*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>elav-GAL4/X; UAS-dcr2/+; UAS-Shali/+</i>	♀	179 / 801	59.67 ± 9.56 / 69.11 ± 12.67	0.87 ± 0.02
<i>elav-GAL4/Y; UAS-dcr2/+; UAS-Shali/+</i>	♂	176 / 746	58.67 ± 9.96 / 63.33 ± 10.03	0.92 ± 0.02
<i>elav-GAL4/X; UAS-dcr2/+; MKRS/+</i>	♀	191 / 801	63.67 ± 12.99 / 69.11 ± 12.67	0.91 ± 0.05
<i>elav-GAL4/Y; UAS-dcr2/+; MKRS/+</i>	♂	185 / 746	61.67 ± 9.02 / 63.33 ± 10.03	0.98 ± 0.01
<i>elav-GAL4/X; CyO/+; UAS-Shali/+</i>	♀	209 / 801	69.67 ± 11.05 / 69.11 ± 12.67	1.02 ± 0.03
<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; UAS-Shali/+</i>	♂	181 / 746	60.33 ± 8.67 / 63.33 ± 10.03	0.96 ± 0.02
<i>elav-GAL4/X; CyO/+; MKRS/+</i>	♀	222 / 801	74 ± 13.05 / 69.11 ± 12.67	1.07 ± 0.02
<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; MKRS/+</i>	♂	204 / 746	68 ± 12.42 / 63.33 ± 10.03	1.06 ± 0.03

Para cada clase se esperaban 69.11 ± 12.67 hembras y 63.33 ± 10.03 machos. n=3 cruzas independientes.

10.4 Inhibición de los mRNA de los canales *Shab* en el SN de *D. melanogaster*.

Realizamos tres cruzas independientes de moscas con genotipo *UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS* con moscas con genotipo *elav-GAL4/elav-GAL4*. De la crua esperábamos ocho clases, cuatro de ellas heredaron tanto la inserción *UAS-Shabi¹⁰* como la del factor Gal4 (clases experimentales), las cuatro clases restantes son las clases de control (**Esquema 18**). Cuantificamos un total de 1693 individuos, 931 hembras y 762 machos. Los valores promedio para cada una de las clases esperadas no muestran diferencias estadísticas significativas aún en presencia de la proteína Dicer-2 (**Fig. 27** y **Tabla 18**).

Esquema 18

Clases esperadas de la cruce de moscas con la inserción de *UAS-Shabi¹⁰* con moscas de la línea *elav-GAL4*.

Machos <i>UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>elav-GAL4/elav-GAL4; +/+</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>elav-GAL4; +; +</i>
X; <i>UAS-Shabi¹⁰; UAS-dcr2+</i>		<i>elav-GAL4/X; UAS-Shabi¹⁰/+; UAS-dcr2/+</i>
Y; <i>UAS-Shabi¹⁰; UAS-dcr2</i>		<i>elav-GAL4/Y; UAS-Shabi¹⁰/+; UAS-dcr2/+</i>
X; <i>UAS-Shabi¹⁰; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/X; UAS-Shabi¹⁰/+; MKRS/+</i>
Y; <i>UAS-Shab¹⁰; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/Y; UAS-Shabi¹⁰/+; MKRS/+</i>
X; <i>CyO; UAS-dcr2</i>		<i>elav-GAL4/X; CyO/+; UAS-dcr2/+</i>
Y; <i>CyO; UAS-dcr2</i>		<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; UAS-dcr2/+</i>
X; <i>CyO; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/X; CyO/+; MKRS/+</i>
Y; <i>CyO; MKRS</i>		<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; MKRS/+</i>

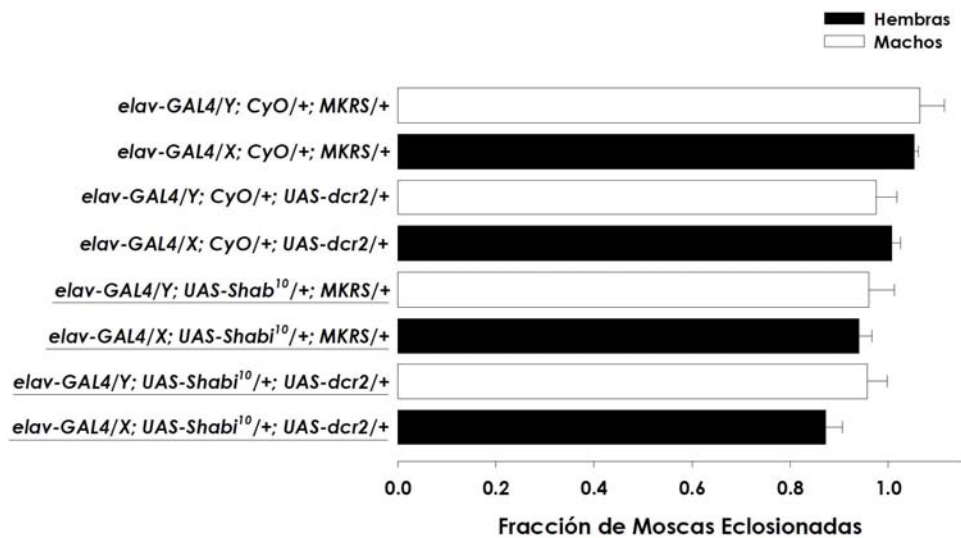


Figura 27. La inhibición de los mRNA de los canales *Shab* neuronales no afecta la viabilidad *D. melanogaster*. Gráfica de la fracción de moscas eclosionadas para las ocho clases esperadas de la cruce de moscas con genotipo *UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS* con moscas *elav-GAL4/elav-GAL4*, las cuales no muestran diferencia estadística significativa. Las barras representan el promedio, de moscas hembras (barras negras) y machos (barras blancas) respectivamente, ± E.E.M., de cada clase. n=3 cruces independientes.

Tabla 18

La viabilidad de *D. melanogaster* no se ve afectada por la inhibición de los mRNA de los canales Shab neuronales.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>elav-GAL4/X; UAS-Shabi^{i0/+}; UAS-dcr2/+</i>	♀	210 / 931	70 ± 11.02 / 80.11 ± 11.61	0.87 ± 0.03
<i>elav-GAL4/Y; UAS-Shabi^{i0/+}; UAS-dcr2/+</i>	♂	184 / 762	61.33 ± 4.26 / 64.22 ± 4.7	0.96 ± 0.04
<i>elav-GAL4/X; UAS-Shabi^{i0/+}; MKRS/+</i>	♀	226 / 931	75.33 ± 11.33 / 80.11 ± 11.61	0.94 ± 0.03
<i>elav-GAL4/Y; UAS-Shabi^{i0/+}; MKRS/+</i>	♂	184 / 762	61.33 ± 3.18 / 64.22 ± 4.7	0.96 ± 0.05
<i>elav-GAL4/X; CyO/+; UAS-dcr2/+</i>	♀	242 / 931	80.67 ± 11.61 / 80.11 ± 11.61	1.01 ± 0.02
<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; UAS-dcr2/+</i>	♂	189 / 762	63 ± 7.37 / 64.22 ± 4.7	0.97 ± 0.04
<i>elav-GAL4/X; CyO/+; MKRS/+</i>	♀	253 / 931	84.33 ± 12.12 / 80.11 ± 11.61	1.05 ± 0.01
<i>elav-GAL4/Y; CyO/+; MKRS/+</i>	♂	205 / 762	68.33 ± 5.61 / 64.22 ± 4.7	1.06 ± 0.05

Para cada clase se esperaban 60.11 ± 11.61 hembras y 64.22 ± 4.7 machos. n=3 cruzas independientes.

10.5 inducción de la expresión del RNAi Shali en los músculos de *D. melanogaster*.

Realizamos tres cruzas independientes (n=3) de individuos con genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* y moscas con genotipo *Mef2-GAL4/Mef2-Gal4*. De la crusa esperábamos cuatro clases, dos de las cuales heredaron las inserciones *UAS-Shali* y *Mef2-GAL4* (clases experimentales) y las restantes son las clases control (**Esquema 19**). Cuantificamos un total de 1197 individuos, 678 hembras y 519 machos. La inhibición de los mRNA de los canales Shal musculares causa semiletalidad en *D. melanogaster* en la clase que presenta la inserción *UAS-dcr-2* con genotipo *UAS-dcr2/Mef2-GAL4; UAS-Shali/+*, no así cuando está ausente en individuos con genotipo *Mef2-GAL4/CyO; UAS-Shali/+* (**Fig. 28** y **Tabla 19**).

Esquema 19 Clases esperadas de la cruce para inducir la inhibición de canales Shal musculares de la mosca mediante el RNAi Shali.

Machos <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i>	X	Hembras vírgenes <i>Mef2-GAL4/Mef2-GAL4</i>
Alelos y/ó cromosomas		<i>Mef2-GAL4; +</i>
<i>UAS-dcr2; UAS-Shali</i>		<i>Mef2-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shali/+</i>
<i>UAS-dcr2; MKRS</i>		<i>Mef2-GAL4/UAS-dcr2; MKRS/+</i>
<i>CyO; UAS-Shali</i>		<i>Mef2-GAL4/CyO; UAS-Shali/+</i>
<i>CyO; MKRS</i>		<i>Mef2-GAL4/CyO; MKRS/+</i>

Tabla 19 Viabilidad de las clases experimentales y control resultantes de la cruce de moscas *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* con moscas *Mef2-GAL4/Mef2-GAL4*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
<i>Mef2-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shali/+</i>	♀	93 / 678	31 ± 14.47 / 28 ± 20.86	0.43 ± 0.11 *
	♂	19 / 519	6.33 ± 3.28 / 23.89 ± 16.78	0.09 ± 0.05 *
<i>Mef2-GAL4/UAS-dcr2; MKRS/+</i>	♀	184 / 678	61.33 ± 20.33 / 28 ± 20.86	0.93 ± 0.02
	♂	183 / 519	61 ± 22.72 / 23.89 ± 16.78	1.01 ± 0.15
<i>Mef2-GAL4/CyO; UAS-Shali/+</i>	♀	201 / 678	67 ± 23.5 / 28 ± 20.86	0.99 ± 0.07
	♂	147 / 519	49 ± 12.58 / 23.89 ± 16.78	0.93 ± 0.08
<i>Mef2-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	♀	200 / 678	66.67 ± 18.85 / 28 ± 20.86	1.08 ± 0.08
	♂	170 / 519	56.67 ± 15.6 / 23.89 ± 16.78	1.06 ± 0.07

Para cada clase esperábamos un promedio de 28 ± 20.86 moscas hembras y 23.89 ± 16.78 moscas machos. * p < 0.001, n=3 cruces independientes.

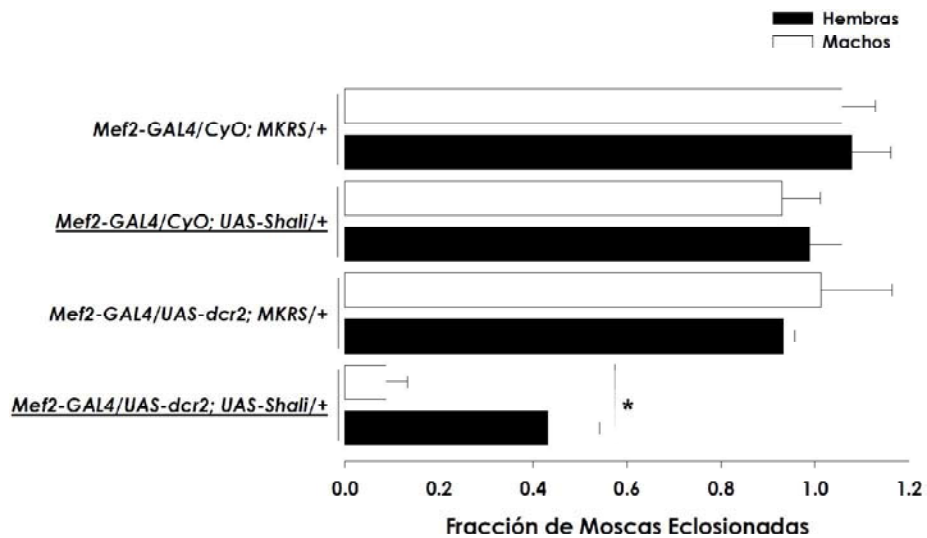


Figura 28. Semiletalidad en *D. melanogaster* inducida por la inhibición de los mRNA de los canales Shal musculares mediante el RNAi Shali. Fracción de moscas eclosionadas de las clases resultantes de la cruce para inhibir a los mRNA de los canales Shal musculares utilizando a las líneas *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* y *Mef2-GAL4/Mef2-GAL4*. De las cuatro clases, dos son clases experimentales por que heredaron las inserciones *UAS-Shali* y *Mef2-GAL4*, las dos restantes se consideraron clases control. Las barras (negras: hembras y blancas: machos) representan el promedio de tres cruces independientes \pm E.E.M. * $p < 0.001$.

10.6 Inducción de la expresión del RNAi Shabi en los músculos de *D. melanogaster*.

Se indujo la inhibición de los mRNA de los canales Shab mediante cruces de moscas de la línea *UAS-Shabi*¹⁰ con moscas de la línea *Mef2-GAL4* (ver **Esquema 20**). De tres cruces independientes se contabilizaron un total de 601 moscas, 322 hembras y 279 machos (**Tabla 20**). No se observó diferencia estadística significativa entre las clases control y las clases experimentales, por lo que la inhibición de los canales Shab musculares no causa letalidad en la mosca (**Figura 29**).

Esquema 20

Genotipos de las clases resultantes de la cruce para inducir la inhibición de los mRNA de los canales Shab musculares de *D. melanogaster*.

Machos	X	Hembras vírgenes
UAS-Shabi¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS		Mef2-GAL4/Mef2-GAL4
Alelos y/ó cromosomas		<i>Mef2-GAL4; +</i>
<i>UAS-Shabi¹⁰; UAS-dcr2</i>		UAS-Shabi¹⁰/Mef2-GAL4; UAS-dcr2/+
<i>UAS-Shabi¹⁰; MKRS</i>		UAS-Shabi¹⁰/Mef2-GAL4; MKRS/+
<i>CyO; UAS-dcr2</i>		<i>Mef2-GAL4/CyO; UAS-dcr2/+</i>
<i>CyO; MKRS</i>		<i>Mef2-GAL4/CyO; MKRS/+</i>

Tabla 20

Viabilidad de la progenie resultante de la cruce para inducir la inhibición de los mRNA de los canales Shab mediante el RNAi Shabi.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
UAS-Shabi¹⁰/Mef2-GAL4; UAS-dcr2/+	♀	74 / 322	24.67 ± 3.28 / 27.56 ± 2.94	0.89 ± 0.02
	♂	59 / 279	19.67 ± 5.7 / 24.44 ± 4.7	0.79 ± 0.11
UAS-Shabi¹⁰/Mef2-GAL4; MKRS/+	♀	82 / 322	27.33 ± 3.48 / 27.56 ± 2.94	0.99 ± 0.06
	♂	68 / 279	22.67 ± 5.7 / 24.44 ± 4.7	0.92 ± 0.11
<i>Mef2-GAL4/CyO; UAS-dcr2/+</i>	♀	84 / 322	28 ± 3.21 / 27.56 ± 2.94	1.02 ± 0.07
	♂	80 / 279	26.67 ± 4.48 / 24.44 ± 4.7	1.1 ± 0.09
<i>Mef2-GAL4/CyO; MKRS/+</i>	♀	82 / 322	27.33 ± 2.96 / 27.56 ± 2.94	0.99 ± 0.01
	♂	72 / 279	24 ± 4.93 / 24.44 ± 4.7	0.98 ± 0.03

Para cada clase esperábamos un promedio de 27.56 ± 2.94 moscas hembras y 24.44 ± 4.7 moscas machos. n=3 cruces independientes.

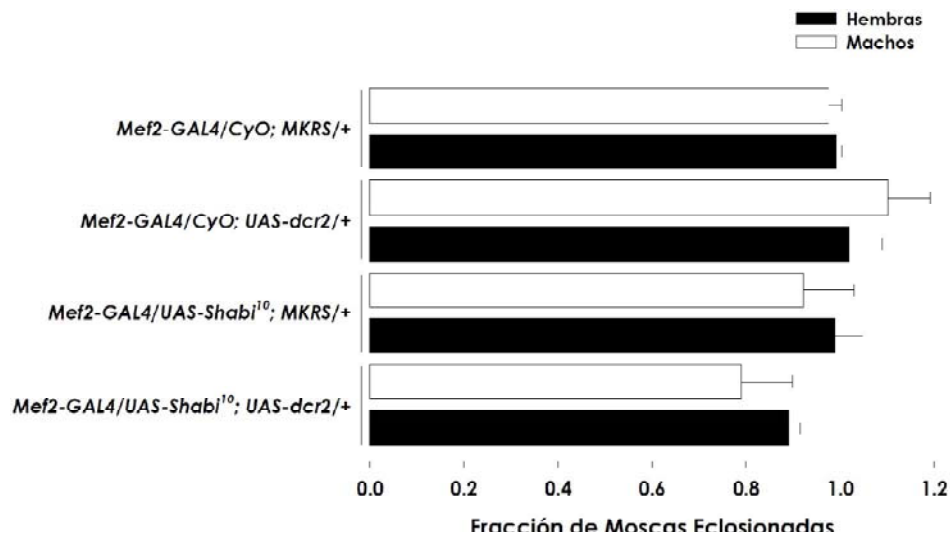


Figura 29. La inhibición de los mRNA de los canales Shab del musculo no afecta la viabilidad de *D. melanogaster*. En la gráfica se muestra los valores promedio \pm E.E.M., de la fracción de moscas eclosionadas (barras negras: hembras y barras blancas: machos) de las clases resultantes de la cruce realizada con individuos con genotipo *UAS-Shab1¹⁰/CyO; UAS-dcr2/MKRS* y moscas de la línea *Mef2-GAL4*, para inducir la inhibición de los mRNA de los canales Shab musculares de *D. melanogaster*. No se observó diferencia significativa entre las clases control y las clases experimentales.

10.7 Inhibición de los mRNA de los canales Shal residentes del CF de *D. melanogaster*.

Se seleccionaron moscas con genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* e individuos con genotipos *7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/UAS-chameleon* para cruzarlos. De la cruce se esperaban ocho clases, dos de ellas heredaron tanto la inserción *UAS-Shali* y la inserción *7A2-GAL4* (clases experimentales), las clases restantes son las clases control. En el **Esquema 21** se muestran las clases antes mencionadas.

De la progenie viable se contabilizó un total de 905 individuos, 444 moscas hembras y 461 moscas machos. De manera consistente con lo observado al expresar a la $Kv\alpha$ dominante negativa *Shal L371D*, la expresión de un RNAi contra el mRNA del canal *Shal* en el CF causó un fenotipo de semiletalidad, afectando al 20% de la población (**Tabla 21** y **Fig. 30**).

Esquema 21

Clases esperadas de la cruce para inducir la expresión del RNAi Shali en el CF de *D. melanogaster*.

Alelos y/ó cromosomas	Machos	X	Hembras vírgenes
	<i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS</i>		<i>7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/UAS-chameleon</i>
			<i>7A2-GAL4; UAS-chameleon</i> <i>CyO; UAS-chameleon</i>
<i>UAS-dcr2; UAS-Shali</i>			<i>7A2-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shali/UAS-chameleon</i> <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/UAS-chameleon</i>
<i>UAS-dcr2; MKRS</i>			<i>7A2-GAL4/UAS-dcr2; UAS-chameleon/MKRS</i> <i>UAS-dcr2/CyO; UAS-chameleon/MKRS</i>
<i>CyO; UAS-Shali</i>			<i>7A2-GAL4/CyO; UAS-Shali/UAS-chameleon</i> LETAL
<i>CyO; MKRS</i>			<i>7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/MKRS</i> LETAL

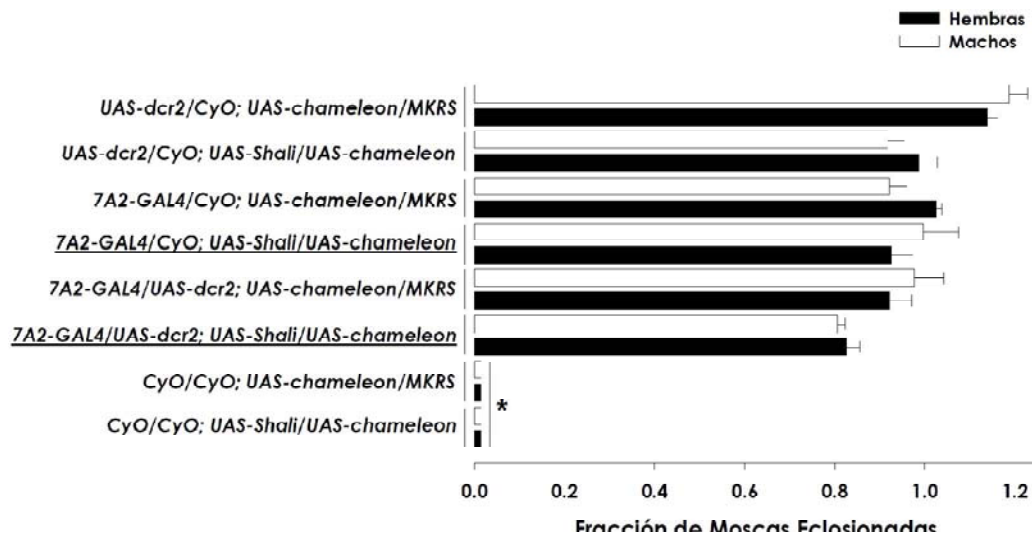


Figura 30. La inhibición de los mRNA de los canales Shal mediante el RNAi Shali en el CF de *D. melanogaster* causa semiletalidad. En la gráfica se muestra la fracción de moscas eclosionadas para las clases esperadas de la cruce de individuos con genotipo *UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/MKRS* con moscas de la línea *7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/UAS-chameleon* para inhibir la función de los mRNA de los canales Shal en el CF de la mosca. Las barras (negras: hembras y blancas: machos) representan el promedio de los valores obtenidos de tres cruces independientes \pm E.E.M. * $p < 0.001$.

Tabla 21

Viabilidad de las clases experimentales de la crua realizada para inducir la inhibición de los mRNA de los canales Shal en el CF de *D. melanogaster*.

Genotipo	Sexo	Observado / Total	Promedio observado / Promedio esperado	Fracción moscas eclosionadas
7A2-GAL4/UAS-dcr2; UAS-Shali/UAS-chameleon	♀	63 / 444	21 ± 2.31 / 25.4 ± 2.77	0.83 ± 0.03
	♂	64 / 461	21.33 ± 3.18 / 26.47. ± 3.99	0.81 ± 0.02
7A2-GAL4/UAS-dcr2; UAS-chameleon/MKRS	♀	71 / 444	23.67 ± 3.84 / 25.4 ± 2.77	0.92 ± 0.05
	♂	76 / 461	25.33 ± 2.03 / 26.47. ± 3.99	0.98 ± 0.07
UAS-dcr2/CyO; UAS-Shali/UAS-chameleon	♀	70 / 444	25 ± 2.52 / 25.4 ± 2.77	0.99 ± 0.04
	♂	81 / 461	24 ± 2.65 / 26.47. ± 3.99	0.92 ± 0.04
UAS-dcr2/CyO; UAS-chameleon/MKRS	♀	78 / 444	29 ± 3.51 / 25.4 ± 2.77	1.14 ± 0.02
	♂	73 / 461	31.67 ± 5.78 / 26.47. ± 3.99	1.19 ± 0.04
7A2-GAL4/CyO; UAS-Shali/UAS-chameleon	♀	75 / 444	23.33 ± 1.76/ 25.4 ± 2.77	0.93 ± 0.05
	♂	72 / 461	27 ± 6.24 / 26.47. ± 3.99	1 ± 0.08
7A2-GAL4/CyO; UAS-chameleon/MKRS	♀	87 / 444	26 ± 2.65 / 25.4 ± 2.77	1.03 ± 0.01
	♂	95 / 461	24.33 ± 3.48 / 26.47. ± 3.99	0.92 ± 0.04
CyO/CyO; UAS-Shali/UAS-chameleon	♀	0 / 444	0 / 25.4 ± 2.77	0 *
	♂	0 / 461	0 / 26.47. ± 3.99	0 *
CyO/CyO; UAS-chameleon/MKRS	♀	0 / 444	0 / 25.4 ± 2.77	0 *
	♂	0 / 461	0 / 26.47. ± 3.99	0 *

Para clase esperábamos un promedio de 25.4 ± 2.77 moscas hembras y 26.47 ± 3.99 moscas machos. n=3 cruzaas independientes. *p < 0.001.

11. Referencias.

- An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.-P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S. & Rhodes, K. J.** (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. **403**, 553-556.
- Bean, P. B.** (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 451-465.
- Bergquist, S., Dickman, D. K. & Davis, G. W.** (2010) A hierarchy of cell intrinsic and target-derived homeostatic signaling. *Neuron*. **66**, 220-234.
- Bilen, J. & Bonini, N. M.** (2005) *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 153-171.
- Birnbaum, S. H., Varga, A. W., Yuan, L.-L., Anderson, A. E., Sweatt, J. D. & Schrader, L. A.** (2004) Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol. Rev.* **84**, 803-833.
- Brand, A. H. & Perrimon, N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Broadie, K. S. & Bate, M.** (1993) Development of larval muscle properties in the embryonic myotubes of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **13**, 167-810.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K. & Scheuer, T.** (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. **49**, 124-141.
- Chen, X., Yuan, L.-L., Zhao, C., Birnbaum, S. G., Frick, A., Jung, W. E., Schwarz, T. L., Sweatt, J. D. & Johnston, D.** (2006) Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K⁺ current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **26**, 12143-12151.
- Chintapalli, V. R., Wang, J. & Dow, J. A. T.** (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* **39**, 715-720.
- Choe, S.** (2002) Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 115-121.
- Chouinard, S. W., Wilson, G. F., Schlimgen, A. K. & Ganetzky, B.** (1995) A potassium channel β subunit related to the aldo-keto reductase superfamily is encoded by the *Drosophila* Hyperkinetic locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 6763-6767.
- Covarrubias, M., Bhattacharji, A., De Santiago-Castillo, J. A., Dougherty, K., Kaulin, Y. A., Na-Phuket, T. R. & Wang, G.** (2008) The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem. Res.* **33**, 1558-1567.
- Davis, R. L.** (1996) Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol. Rev.* **76**, 299-317.
- Davis, R. L.** (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 275-302.
- Diao, F., Waro, G. & Tsunoda, S.** (2009) Fast inactivation of Shal (Kv4) K⁺ channels is regulated by the novel interactor SKIP3 in *Drosophila* neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **42**, 33-44.
- Diao, F., Chaufy, J., Waro, G. & Tsunoda, S.** (2010) SIDL interacts with the dendritic targeting motif of Shal (Kv4) K⁺ channels in *Drosophila*. *Mol. Cell. Neurosci.* **45**, 75-83.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblaue, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. & Dickson, B. J.** (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. **448**, 151-156.
- Duffy, J. B.** (2002) Gal4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*. **34**, 1-15.

- Dufton, M. J.** (1997) Genetic code synonym quotas and amino acid complexity: cutting the cost of proteins? *J. Theor. Biol.* **187**, 165-173.
- Espinosa, F., Lopez-Gonzalez, I., Serrano, C. J., Gasque, G., De la Vega-Beltran, J. L., Treviño, C. L. & Darszon, A.** (1999) Anion channel blockers differentially affect T-type Ca²⁺ currents of mouse spermatogenic cells, α 1E currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev. Genet.* **25**, 103-114.
- Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.-M., Buchner, E. & Galizia G.** (2002) Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr. Biol.* **12**, 1877-1884.
- Gasque, G., Labarca, P., Reynaud, E. & Darszon, A.** (2005) Shal and shaker differential contribution to the K⁺ currents in the *Drosophila* mushroom body neurons. *J. Neurosci.* **25**, 2348-2358.
- Gasque, G., Larbarca, P., Delgado, R. & Darszon, A.** (2006) Bridging behavior and physiology: ion channel perspective on mushroom body-dependent olfactory learning and memory in *Drosophila*. *J. Cell. Physiol.* **209**, 1046-1053.
- Greenspan, R. J.** (1997) *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA. ISBN 0-87969-492-0.
- Gulbis, J. M., Zhou, M., Mann, S. & MacKinnon, R.** (2000) Structure of the cytoplasmic β subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science.* **289**, 123-127.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grismmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stuhmer, W. & Wang, X.** (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationship of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 473-508.
- Heisenberg, M.** (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 266-275.
- Hedge, P., Gu, G.-G., Chen, D., Free, S. J., Singh, S.** (1999) Mutational analysis of the *Shab*-encoded delayed rectifier K⁺ channels in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **274**, 22109-22113.
- Hille, B.** (2001) *Ion channels of excitable membranes*, third edition. Sinauer, Sunderland, USA. ISBN 0-87893-321-2.
- Iverson, L. E., Mottes, J. R., Yeager, S. A. & Germeraad, S. E.** (1997) Tissue-specific alternative splicing of *Shaker* potassium channel transcripts results from distinct modes of regulating 3' splice choice. *J. Neurobiol.* **32**, 457-468.
- Jaronzcyk, K., Carmichael, J. B. & Hobman, T. C.** (2005) Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? *Biochem. J.* **387**, 561-571.
- Jegla, T. & Salkoff, L.** (1997) A novel subunit for Shal K⁺ channels radically alters activation and inactivation. *J. Neurosci.* **17**, 32-44.
- Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J. & Covarrubias, M.** (2004) Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 343-369.
- Keene, A. C. & Waddell, S.** (2007) *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 341-354.
- Kim, J., Jung, S.-C., Clemens, A. M., Petralia, R. S. & Hoffman, D. A.** (2007) Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* **54**, 933-947.
- Kurata, H. T. & Fedida, D.** (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **92**, 185-208.

- Lane, D. M.** (Project Leader) Online Statistics Education: A Multimedia Course of Study (<http://onlinestatbook.com/>). Rice University, Houston, Texas, USA.
- Lichtinghagen, R., Stocker, M., Wittka, R., Boheim, G., Stühmer, W., Ferrus A. & Pongs, O.** (1990) Molecular basis of altered excitability in *Shaker* mutants of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **13**, 4399-4407.
- Lindsley, D. L. & Zimm, G. G.** (1992) The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press. San Diego, USA. INSB 0-12-450990-8
- Liu, X. & Davis, R. L.** (2006) Insect olfactory memory in time and space. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 679-685.
- López-González, I., De la Vega-Beltrán, J. L., Santi, C. M., Florman, H. M., Felix, R. & Darszon, A.** (2001) Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca²⁺ currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. *Dev. Bio.* **236**, 210-219.
- MacKinnon, R.** (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature.* **350**, 232-235.
- MacLean, J. N., Zhang, Y., Johnson, B. R. & Harris-Warrick, R. M.** (2003) Activity-independent homeostasis in rhythmically active neurons. *Neuron.* **37**, 109-120.
- Malin, S.A. & Nerbonne, J. M.** (2001) Molecular heterogeneity of the voltage-gated fast transient outward K⁺ current, I_{Af}, in mammalian neurons. *J. Neurosci.* **21**, 8004-8014.
- Mathur, R., Zhou, J., Babila, T. & Koren, G.** (1999) Ile-177 and Ser-180 in the S1 segment are critically important in Kv1.1 channel function. *J. Biol. Chem.* **274**, 11487-11493.
- McGuire, S. E., Roman, G. & Davis, R. L.** (2004) Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet.* **20**, 284-391.
- Mcguire, S. E., Deshazer, M. & Davis, R. L.** (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Progress Neurobiol.* **76**, 328-347.
- Misonou, H., Mohapatra, D. P. & Trimmer, J. S.** (2005) Kv2.1 A voltage-gated K⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *NeuroToxicology.* **26**, 743-752.
- Mohapatra, D. P., Park, K.-S. & Trimmer, J. S.** (2007) Dynamic regulation of the voltage-gated Kv2.1 potassium channel by multisite phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1064-1068.
- Muqit, M. M. & Feany, M. B.** (2002) Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 237-243.
- Nakahira, K., Shi, G., Rhodes, K. J. & Trimmer, J. S.** Selective interaction of voltage-gated K⁺ channel β-subunits with α-subunits. *J. Biol. Chem.* **271**, 7084-7089.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T.** (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 292.
- Nerbonne, J. M., Gerber, B. R., Norris, A. & Burkhalter, A.** (2008) Electrical remodeling maintains firing properties in cortical pyramidal neurons lacking KCND2-encoded A-type K⁺ currents. *J. Physiol.* **586**, 1565-1579.
- Norris, A. J. & Nerbonne, J. M.** (2010) Molecular dissection of I_A in cortical pyramidal neurons reveals three distinct components encoded by Kv4.2, Kv4.3, and Kv1.4 α-subunits. *J. Neurosci.* **30**, 5092-5101.
- Oceguera, C. A.** (2008) Establecimiento de una línea de moscas transgénicas para evaluar el papel de los canales de K⁺ Shaw y Shaker en los cuerpos fungiformes. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

- Peng, I.-P. & Wu, C.-F.** (2007) Differential contributions of Shaker and Shab K⁺ currents to neuronal firing patterns in *Drosophila*. *J. Neurophysiol.* **97**, 780-794.
- Perrimon N.** (1998) Creating mosaics in *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 243-247.
- Ping, Y., Waro, g., Licursi, A., Smith, S., Vo-Ba, D.-A. & Tsunoda, S.** (2011) Shal/Kv4 channels are required for maintaining excitability during repetitive firing and normal locomotion in *Drosophila*. *PLoS ONE.* **6**, e-16043.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S. & Ferrus, A.** (1988) Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *The EMBO J.* **7**, 1087-1096.
- Rana, T.M.** (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **8**, 23-36.
- Ribera, A. B., Pacioretty, L. M. & Taylor, R. S.** (1996) Probing molecular identity of native single potassium channels by overexpression of dominant negative subunits. *Neuropharmacology.* **35**, 1007-1016.
- Rodríguez-Valentín, R., López-González, I., Jonquera, P., Labarca, P., Zurita, M. & Reynaud, E.** (2006) Oviduct contraction in *Drosophila* is modulated by a neural network that is both, octopaminergic and glutamatergic. *J. Cell. Physiol.* **209**, 183-198.
- Rogero, O., Hämmerle, B. & Tejedor, F. J.** (1997) Diverse expression and distribution of Shaker potassium channels during the development of the *Drosophila* nervous system. *J. Neurosci.* **17**, 5108–5118.
- Roman, G. & Davis, R. L.** (2001) Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *BioEssays.* **23**, 571-581.
- Ryglewski, S. & Duch, C.** Shaker and Shal mediate transient calcium-independent potassium current in a *Drosophila* flight motoneuron. *J. Neurophysiol.* **102**, 3673-3688.
- Salkoff, L., Baker, K., Butler, A., Covarrubias, M., Pak, M. D. & Wei, A.** (1992) An essential “set” of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci.* **15**, 161-166.
- Scantlebury, N., Zhao, X. L., Rodriguez Moncalvo V. G., Camiletti, A., Zahanova, S., Dineen, A., Xin, J.-H. & Campos, A. R.** (2010) The *Drosophila* gene *RanBPM* functions in the mushroom body to regulate larval behavior. *PLoS ONE.* **5**, e10652.
- Solc, C. K., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W.** (1987) Single-channel and genetic analyses reveal two distinct A-type potassium channels in *Drosophila*. *Science.* **236**, 1094–1098.
- St Johnston, D.** (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 176-188.
- Thompson, S. M.** (2007) I_A in play. *Neuron.* **54**, 850-852.
- Tombola, F., Pathak, M. M. & Isacoff, E. Y.** (2006) How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **22**, 23-52.
- Torres, Y. P., Morera, F. J., Carvacho, I. & Latorre, R.** (2007) A marriage of convenience: beta-subunits and voltage-dependent K⁺ channels. *Biol. Chem.* **24**, 24485-24489.
- Tsonuda, S. & Salkoff, L.** (1995) Genetic analysis of *Drosophila* neurons: Shal, Shaw, and Shab encode most embryonic potassium currents. *J. Neurosci.* **15**, 1741-1754.
- Ueda, A. & Wu, C.-F.** (2006) Distinct frequency-dependent regulation of nerve terminal excitability and synaptic transmission by I_A and I_K potassium channels revealed by *Drosophila* Shaker and Shab mutations. *J. Neurosci.* **26**, 6238–6248.

- van Roessel P. & Brand A. H.** (2000) Gal4-mediated ectopic gene expression in *Drosophila*. In: *Drosophila Protocols* (ed. M. A. W. Sullivan and R. S. Hawley), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 439-441.
- Vázquez, M., Cooper, M. T., Zurita, M. & Kennison, J. A.** (2008) γ Tub23C interacts genetically with brahma chromatin-remodeling complexes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **180**, 835-843.
- Wang, J. W. & Wu, C.-F.** (1996) *In vivo* functional role of the *Drosophila Hyperkinetic* β subunit in gating and inactivation of Shaker K⁺ channels. *Biophys. J.* **71**, 3167-3176.
- Wang, K.** (2008) Modulation by clamping: Kv4 and KChIP interactions. *Neurochem. Res.* **33**, 1964-1969.
- Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. & Salkoff, L.** (1990) K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science*. **248**, 599-603.
- Wu, C. L., Xia, S., Fu, T. F., Wang, H., Chen, Y. H., Leong, D., Chiang, A. S. & Tully, T.** (2007) Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nat. Neurosci.* **10**, 1578-1586.
- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T. F., Lin, W. Y., Wu, C. L., Pyzocha, L., Lin, I. R., Saitoe, M., Tully, T. & Chiang, A. S.** (2005) NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **12**, 603-615.
- Yao, W.-D. & Wu, C.-F.** (1999) Auxiliary *Hyperkinetic* β subunit of K⁺ channels: regulation of firing properties and K⁺ currents in *Drosophila* neurons. *J. Neurophysiol.* **81**, 2472-2484.