



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 142**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
A01K 1/03 (2006.01)
G06F 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05005342 .0**
96 Fecha de presentación : **10.03.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1571226**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Tecnología de procesadores génicos para determinar genes de memoria.**

30 Prioridad: **10.03.1999 US 124085 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.07.2011

73 Titular/es: **COLD SPRING HARBOR LABORATORY
1 Bungtown Road
Cold Spring Harbor, New York 11724, US
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG. y
Emory University**

72 Inventor/es: **Tully, Timothy P.;
Dubnau, Joshua I.;
Davis, Michael;
Mous, Jan y
Certa, Ulrich**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 142 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tecnología de procesadores génicos para determinar genes de memoria

Antecedentes de la invención

5 Un atributo que muchos organismos, incluyendo seres humanos, poseen es la memoria de episodios pasados. Este atributo se ha estudiado durante muchas décadas con mucha información ahora disponible que explica muchas de sus ramificaciones. Por ejemplo, se han identificado dos tipos básicos de memoria: memoria independiente de la transcripción, que incluye memoria a corto plazo.

10 Un aspecto relativamente conocido hasta ahora de memoria es la identidad de genes que contribuye a su manifestación. La identidad de los genes que contribuyen a la formación de memoria está justo ahora comenzando a explorarse. La identificación de genes asociados a la formación de memoria proporcionaría (a) una epidemiología genética de disfunción cognitiva, (b) herramientas de diagnóstico para individuos que llevan formas alélicas diferentes de estos genes (en asociación con diferentes niveles de comportamiento para formas particulares de cognición) y (c) nuevas dianas para descubrimiento de fármacos últimamente para mejorar varias formas de disfunción cognitiva (y particular fármacos se pueden equiparar a formas particulares de disfunción cognitiva mediante ensayos de diagnóstico). De este modo, sería útil tener técnicas disponibles que identificaran los genes que están asociados a la formación de memoria.

15 Cavallaro S et al., PNAS, 94:9669 - 9673 (1997) divulga el uso de identificación de ARN para identificar los genes relacionados con la memoria. Tully et al., Society for Neuroscience abstracts, vol. 19, no. 1/3:1066 (1993) describe que se inducen memorias independientes en *Drosophila* después de condicionamiento pavloviano usando protocolos de entrenamiento en masa y espaciado. El documento WO9849342 describe el uso de microdisposiciones para preparar un patrón de transcripción de gen diagnóstico estándar.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere al descubrimiento de los solicitantes de que los efectos diferenciales sobre la formación de memoria producida por ciertos protocolos experimentales se pueden usar para identificar genes implicados en la formación de memoria dependiente de la transcripción, particularmente la formación de memoria a largo plazo. La diferencia significativa entre cualquiera de los dos protocolos experimentales está en la inducción de memoria dependiente de la transcripción. La diferencia significativa entre cualquiera de los dos protocolos experimentales a compararse es la inducción de la memoria dependiente de la transcripción en el grupo experimental y la ausencia de memoria dependiente de la transcripción en el grupo control.

30 Memoria independiente de la transcripción incluye diversas "fases de memoria", tal como memoria a corto plazo, memoria a plazo intermedio (o medio) y memoria resistente a anestesia (en moscas). En común con estas formas es que los inhibidores farmacológicos de la transcripción de ARN no alteran estas memorias. Memoria dependiente de la transcripción usualmente se refiere a memoria a largo plazo e inhibidores de la síntesis de ARN bloquean su aparición.

35 Como resultado, la invención de los solicitantes se refiere a procedimientos de identificación de un gen o genes implicados en la memoria independiente de la transcripción (particularmente memoria a largo plazo) que comprende (a) entrenamiento de animales no humanos (particularmente mamíferos no humanos, otros vertebrados e invertebrados) como se establece en la reivindicación 1.

40 Las condiciones experimentales de la etapa (a) y etapa (i) constituyen un par de tratamientos (experimentales). La diferencia significativa entre las condiciones experimentales de la etapa (a) y etapa (i) está en la inducción de memoria dependiente de la transcripción.

Como se usa en el presente documento, un animal de control es un animal que es de la misma especie como, y de otra manera comparable con (por ejemplo, edad, sexo similar), el animal que está entrenado en condiciones suficientes para inducir formación de memoria dependiente de la transcripción en ese animal.

45 En una realización particular, ARN se extrae de la amígdala de animales entrenados o de control. En otra realización, ARN se extrae del hipocampo de animales entrenados o de control. En todavía otra realización, la señal de sondas hibridadas se amplifica, antes de la detección. En otra realización, se realiza una comparación estadística (realizada, llevada a cabo) entre la señal detectada en la etapa (e) y la señal detectada en un control que se obtiene mediante entrenamiento de animales control en condiciones suficientes para inducir memoria independiente de la transcripción pero no en la memoria dependiente de la transcripción.

50 La memoria dependiente de la transcripción se puede inducir usando condiciones experimentales específicas. En una realización, memoria dependiente de la transcripción se induce en un animal no humano usando un protocolo

de entrenamiento espaciado para la respuesta de evitación potenciada por el miedo. Memoria dependiente de la transcripción se puede inducir en un animal no humano usando un protocolo de evasión de caja de evitación. En otra realización, memoria dependiente de la transcripción se induce en un animal no humano usando un protocolo de condicionamiento de miedo contextual.

- 5 La invención también se refiere a un procedimiento de identificación de un gen o genes implicados en la memoria dependiente de la transcripción en *Drosophila*.

Como se usa en el presente documento, una *Drosophila* control es una *Drosophila* que es de la misma especie que, y de otra manera comparable a, la *Drosophila* que se entrena en condiciones suficientes para inducir la memoria dependiente de la transcripción en esa *Drosophila*.

- 10 En una realización del procedimiento de identificación de un gen o genes implicados en la memoria dependiente de la transcripción en *Drosophila*, las sondas de ADN se marcan con un marcador fluorescente y se detecta la señal usando un ensayo de fluorescencia. En una realización particular, la señal de las sondas hibridadas se amplifica antes de la detección. En la invención, se realiza una comparación estadística entre la señal detectada en la etapa (e) y la señal detectada en un control que se obtiene mediante entrenamiento de *Drosophila* control en condiciones suficientes para inducir memoria independiente de la transcripción pero no memoria dependiente de la transcripción.

15 Memoria dependiente de la transcripción se puede inducir en *Drosophila* usando un protocolo de entrenamiento espaciado (por ejemplo, entrenamiento espaciado de condicionamiento Pavloviano olfativo). Memoria independiente de la transcripción se puede inducir en *Drosophila* usando un protocolo de entrenamiento en masa (entrenamiento en masa de condicionamiento Pavloviano olfativo).

- 20 Una diferencia estadísticamente significativa en nivel de transcripción para un gen específico entre animales entrenados en condiciones suficientes para inducir memoria dependiente de la transcripción y animales control entrenados en condiciones apropiados que no son suficientes para inducir memoria dependiente de la transcripción identifica ese gen como un gen de memoria candidato (CMG). Una diferencia estadísticamente significativa en nivel de transcripción entre grupos entrenados espaciados y en masa para un gen específico identifica ese gen como un gen de memoria candidato.

- 25 Una diferencia estadísticamente significativa en nivel de transcripción para un gen específico entre animales entrenados en condiciones suficientes para inducir memoria dependiente de la transcripción y animales de control vírgenes (sin entrenar) identifica ese gen como un gen de plasticidad candidato (CPG). En una realización particular, una diferencia estadísticamente significativa en nivel de transcripción entre grupos entrenados espaciados y no entrenados para un gen específico identifica ese gen como un gen de plasticidad candidato.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama específico de un protocolo de entrenamiento descrito en Tully et al., Cell, 79:35 - 47 (1994)), que produce aprendizaje olfativo Pavloviano en moscas.

- 35 La Figura 2 es una representación gráfica de resultados que muestra retención de memoria después de entrenamiento espaciado o en masa en moscas normales (tipo salvaje) o entrenamiento espaciado en moscas *hs-CREB2-r* transgénicas después de la expresión inducida del represor CREB (véase Yin et al., Cell, 79:49 - 58 (1994)). La memoria de aprendizaje y temprana (insensible a cicloheximida) son normales en moscas transgénicas. La memoria adicional (LTM dependiente de la síntesis de proteína) producida normalmente por entrenamiento espaciado está bloqueada en moscas transgénicas. Esta comparación revela que la única diferencia entre entrenamiento espaciado y en masa es la aparición de una memoria dependiente de la transcripción después de lo anterior.

- 40 La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra la diferencia promedio entre la señal detectada para una sonda de oligonucleótido de ADN específica perfectamente coincidente (PM) (complementaria) a una sección específica de un gen específico y señal detectada para esa sonda no coincidente (MM) para esa sección del gen como resultado de de la introducción de un error de secuencia de nucleótidos (mutación) en esa sección del gen. La diferencia promedio entre pares de PM y MM, y usualmente para 20 pares por gen, se determina mediante análisis del software de diseño Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Los cuadros representan microsecuencias en un procesador de microdisposición.

- 45 La Figura 4A es una representación de nube de puntos (espaciada contra en masa) de la señal media (diferencia normalizada transformada media) de unos procesadores $N = 10$, cada uno hibridado con sondas de ADN hechas de ARN extraído de las cabezas de *Drosophila* normal específico 24 horas antes a o bien entrenamiento espaciado o en masa. Cada cuadro representa un gen de *Drosophila*, 1542 de los cuales está contenido en cada procesador. Los

genes de memoria candidatos se identifican por los cuadros sombreados más claros. La localización del gen C/EBP en la representación gráfica se indica en la figura.

5 La Figura 4B es una representación de nube de puntos (espaciada contra en masa) que muestra los valores estadísticamente significativos de la Figura 4A. Cada cuadro representa un gen de *Drosophila* específico, 1542 de los cuales están contenidos en cada procesador. La localización del gen C/EBP en la representación gráfica se indica en la figura.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR). Los resultados confirman el efecto diferencial de entrenamiento espaciado contra de masa en el gen C/EBP.

10 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el efecto de un intervalo entre pruebas (ITI) entre pruebas de entrenamiento condicionadas por miedo en ratas sobre la memoria a largo plazo posterior. Los resultados definen protocolos de entrenamiento en masa y espaciado y muestran que la memoria de evasión potenciada por miedo es mejor después del entrenamiento espaciado que después del entrenamiento en masa.

15 La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre la memoria a largo plazo de la sobreexpresión de activador de CREB en la amígdala de ratas. Los resultados muestran que la sobreexpresión del activador de CREB en la amígdala potencia (incrementa) la memoria de evasión potenciada por miedo en ratas después del entrenamiento en masa.

La Figura 8 muestra mapas moleculares de la región genómica de *adf1*.

Descripción detallada de la invención

20 Para producir una "memoria a largo plazo," específica se somete a un animal a un protocolo de entrenamiento específico en condiciones controladas, experimentales. En los procedimientos de condicionamiento Pavloviano, por ejemplo, dos estímulos específicos se presentan en continuidad temporal para producir "memoria y aprendizaje asociativo." Uno de los dos estímulos se denomina "estímulo condicionado" (CS) y el otro se denomina "estímulo no condicionado" (US). El US usualmente es un refuerzo natural que provoca una "respuesta no condicionada" (UR) antes de entrenamiento de una manera "reflexiva". Con el emparejamiento CS-US, una "respuesta condicionada" (CR) comienza a aparecer en respuesta al CS antes (o en la ausencia de) la presentación del US. Después un CR a un emparejamiento CS-US específico se "aprende", después de eso comienza la formación de memoria.

30 La formación de memoria de esta experiencia específica, experimental puede existir en dos formas generales: una forma independiente de la transcripción y una forma dependiente de la transcripción. Lo anterior incluye diversas "fases de memoria," tal como memoria acorto plazo, memoria a plazo intermedio (o medio) y (en moscas) memoria resistente a. Común para estas formas es que los inhibidores farmacológicos de la transcripción de ARN no alteran estas memorias. La última forma usualmente se denomina como memoria a largo plazo y los inhibidores de la síntesis de ARN bloquean su aparición.

35 En modelos animales, diversos tratamientos experimentales, tal como mutación génica, bloqueo farmacológico, lesión anatómica o protocolos de entrenamiento específicos, pueden afectar a uno o más de estos tipos de memorias. En particular, algunos tratamientos experimentales producen cantidades normales de memoria independiente de la transcripción pero no a la producción de memoria dependiente de la transcripción. Tales observaciones constituyen la base de comparaciones de procesador de ADN informativo. en general, se realiza una comparación entre dos protocolos experimentales; un (grupo experimental) que es suficiente para inducir tanto las memorias independiente de la transcripción como dependiente de la transcripción y una que produce solamente la memoria independiente de la transcripción (grupo control). Cualesquiera diferencias detectables en los niveles de transcripción entre estos dos protocolos después se pueden atribuir a una memoria dependiente de la transcripción del aprendizaje inducido experimentalmente. Estas transcripciones se denominan en el presente documento "Genes de Memoria Candidatos" (CMG).

45 Aunque las condiciones experimentales están controladas para inducir un tipo específico de aprendizaje, también se pueden llevar a cabo otras formas experimentalmente no controladas de aprendizaje. De este modo, aunque un grupo control puede no producir memoria dependiente de la transcripción de la tarea específica experimental, independientemente puede producir una memoria dependiente de la transcripción de una experiencia de aprendizaje no controlada. Un tipo de tal experiencia son las formas "no asociativas" potenciales de aprendizaje que se producen en respuesta solamente a CS o US (solos), o en respuesta a presentaciones CS-US que no están apareados temporalmente (que es el requerimiento clave para "aprendizaje asociativo"). Por lo tanto, dependiente de las memorias de transcripción "no específicas" pueden existir en los grupos control, como se ha definido anteriormente. Esta observación da lugar a una clase más amplia de transcripciones implicadas en el aprendizaje "no específico", que los inventores denominan Genes de Plasticidad de Candidatos (CPG). Las comparaciones de procesadores de

ADN entre un grupo experimental, como se ha definido anteriormente, y animales vírgenes (no tratados) producirán CPG, junto con CMG.

Estudios genéticos de comportamiento en *Drosophila* han establecido un par de protocolos de entrenamiento con efectos diferenciales en la formación de memoria después de un paradigma de aprendizaje o olor - estímulo Pavloviano. Diez sesiones de entrenamiento "en masa" conjuntamente (es decir, sin ningún intervalo de descanso entre sesiones) produce aprendizaje máximo (adquisición) y memorias independientes de la transcripción (dependiente de la síntesis no proteica) (memorias tempranas, memoria a corto plazo). Por el contrario, diez sesiones de entrenamiento "espaciadas" (es decir, con un intervalo de descanso de 15 minutos entre sesiones) produce niveles equivalentes de aprendizaje y memorias independientes de la transcripción (memorias tempranas), así como niveles máximos de memoria dependiente de la transcripción (incluyendo memoria a largo plazo dependiente de la síntesis de proteínas (LTM)). LTM requiere entrenamiento espaciado; incluso 48 sesiones de entrenamiento en masa falla para inducir LTM (Tully et al., *Cell*, 79:35-47 (1994)). LTM dependiente de la síntesis de proteínas inducida por entrenamiento espaciado está bloqueada completamente mediante la sobreexpresión del represor CREB (Figura 1) (Yin et al., *Cell*, 79: 49 - 58 (1994)). La curva de memoria resultante después de entrenamiento espaciado, cuando está bloqueada LTM dependiente de CREB y de la síntesis de proteínas, es similar a la producida por entrenamiento en masa en moscas normales. Por el contrario, la sobreexpresión del activador de CREB induce LTM con menos entrenamiento (una sesión de entrenamiento) o con entrenamiento en masa (Figura 2) (Yin et al., *Cell*, 81:107 - 115 (1995)). Por lo tanto, la inducción de LTM es tanto dependiente de la síntesis de proteínas como de CREB. Estos resultados demuestran que la única diferencia funcional entre protocolos de entrenamiento espaciado y en masa es la aparición de memoria dependiente de la transcripción después de lo anterior.

Esta observación forma la base de un filtro diferencial para identificar genes "cadena abajo" adicionales que están regulados de manera transcripcional durante la formación de memoria dependiente de la transcripción. Las sondas de ADN se sintetizaron usando ARN extraído de las cabezas de moscas entrenadas espaciadas o en masa de acuerdo con los procedimientos conocidos en general en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York (1997)). Se extrajo ARN de cabezas de moscas como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Drain et al., *Neuron*, 6: 71 - 82 (1991)). El entrenamiento en masa y espaciado de moscas se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Tully et al., *Cell*, 79:35-47 (1994); y Tully y Quinn, *J. Comp. Physiol.*, 157: 263 - 277 (1985)). Sonda de ADN complementario (ADNc) se sintetizó del ARN extraído de acuerdo con procedimientos conocidos generalmente en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); and Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York (1997)). La mezcla de sondas de ADNc compleja después se hibridó en procesadores de microdisposiciones que contienen secuencias de ADN (secuencias de ADN diana) de 1542 genes de *Drosophila* (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA; véase también, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.445.934; y Ramsay, *Nature Biotechnology*, 16: 40 - 44 (1998)). En una realización particular, las sondas de ADN se marcan con un marcador detectable (por ejemplo, marcador fluorescente). La señal de sondas de ADN hibridado se amplificó y se detectó de acuerdo con procedimientos conocidos en general en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York (1997)). En una realización particular, la hibridación se detecta usando un ensayo de fluorescencia. Una comparación estadística (comparación de procesadores de ADN) se preparó (realizó) mediante comparación de la señal detectada entre grupos entrenados espaciados y en masa.

Un tamaño de muestra y un algoritmo de transformación de señal se ha determinado que mejora la fiabilidad estadística para detectar pequeñas diferencias en los niveles de transcripción entre grupos entrenados espaciados y en masa. En una realización preferida, se ha determinado que un tamaño de muestra 10 procesadores por grupo de tratamiento para cada protocolo de tratamiento (es decir, para cada gen, 10 procesadores para grupo entrenado espaciado y 10 procesadores para grupo entrenado en masa) mejora la fiabilidad estadística para detectar pequeñas diferencias en niveles de transcripción entre grupos entrenados espaciados y en masa. En una realización preferida, comparación estadística (Comparación de procesadores de ADN) se realiza usando el siguiente algoritmo de transformación de señal:

1. Determinar la "diferencia promedio" entre señal detectada por un conjunto de pares de cebadores para gen específico. La diferencia promedio entre señales coincidentes perfectas (PM) y no coincidentes (MM) se determina por análisis de software de diseño Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA).

2. Transformación Box-Cox:

Cualquier valor de diferencia promedio inferior a 10 se elimina. Los valores de diferencia promedios restantes para cada gen sobre cada procesador se normalizan después por la diferencia promedio global (a través todos los genes) para ese procesador entero.

5 **Gran Media = Diferencia promedio global para todos los procesadores y todos los genes/procesador**

Diferencia promedio global para el Procesador X

Factor de Normalización (para Procesador X) = -----

Gran Media

10 **Norm (Diferencia promedio) = (Factor de Normalización para el procesador X) x (Gen Y sobre el Procesador X)**

Diferencia promedio transformada = {ln [norm (diferencia promedio)]} x 2720,75

15 3. Determinar la media y el error estándar. Comparar la media para moscas entrenadas espaciadas y en masa para cada Gen Y usando ensayos de t estándar (alfa = 0,05). Si $p \leq 0,05$, entonces la transformación de señal media para un gen dado en moscas entrenadas espaciadas se considera que es estadísticamente diferente de la transformación de señal media para ese gen en moscas entrenadas en masa

De manera alternativa, comparación estadística (Comparación de procesadores de ADN) se puede realizar usando el siguiente algoritmo de transformación de señal:

20 1. Determinar la "diferencia promedio" entre señal detectada por un conjunto de pares de cebadores para gen específico. La diferencia promedio entre señales coincidentes perfectas (PM) y no coincidentes (MM) se determina por análisis de software de diseño Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA).

2. Transformación Box-Cox:

Cualquier valor de diferencia promedio negativa para un gen dado se hace cero. La "diferencia promedio hecha cero" (diferencia promedio 0) para cada gen sobre cada procesador se normalizan por la "diferencia promedio global" para ese procesador entero.

25 a)

Diferencia promedio 0 = Diferencia promedio, si la Diferencia Promedio ≥ 0 ,

= 0, si la Diferencia Promedio < 0

b) Normalización

30 **Gran Media = Diferencia promedio global para todos los procesadores y todos los genes/procesador**

Diferencia promedio global para el Procesador X

Factor de Normalización (para Procesador X) = -----

Gran Media

35 **Norm (Diferencia promedio 0) = Factor de Normalización (para el procesador X) x (Gen Y sobre el Procesador X) (para cada gen)**

c)

Diferencia promedio transformada = {ln [norm (diferencia promedio)]} x 2720,75136

40 3. Determinar la media y el error estándar. Comparar la media espaciada contra la media en masa con una comparación de ensato de t. para moscas entrenadas espaciadas y en masa para cada Gen Y usando ensayos de t estándar. Si $p \leq 0,05$, entonces la transformación de señal media para un gen dado en moscas entrenadas espaciadas se considera que es estadísticamente diferente de la transformación de señal media para ese gen en moscas entrenadas en masa

Se pueden usar otros algoritmos de transformación de señal en la realización de una comparación estadística (Comparación de procesadores de ADN) de señal detectada entre grupos entrenados espaciados y en masa.

- 5 Con estos planteamientos del propietario, 1542 comparaciones de entrenamiento espaciado contra la de en masa estadístico (ensayos de t de Student) se han determinado para *Drosophila*. Genes de memoria candidatos (CMG) (que no incluye elementos que se pueden transponer o genes mitocondriales), que están regulados de manera transcripcional durante la formación de memoria dependiente de la transcripción, se identificaron a partir de comparaciones de procesador de ADN (comparaciones estadísticas) entre grupos entrenados espaciados y en masa. Las transcripciones que están reguladas diferencialmente representan las implicadas específicamente en LTM "asociativa" inducida por el paradigma de aprendizaje de olor - estímulo Pavloviano.
- 10 Los CMG de *Drosophila* determinados a partir de análisis estadístico usando el algoritmo de transformación de señal en el que un valor de diferencia promedio menor que 10 para un gen dado se suprime, a partir de la comparación espaciada contra la de en masa (memoria de 24 horas), se presentan en la Tabla 1. Los CMG de *Drosophila* determinados a partir de análisis estadístico usando el algoritmo de transformación de señal en el que un valor de diferencia promedio negativo para un gen dado se hace cero, de la comparación espaciada contra la de en (memoria de 24 horas), se presentan en la Tabla 2.
- 15

TABLA 1: Genes de Memoria Candidatos Estadísticos, derivados de análisis estadístico (valores de diferencia promedio suprimidos < 10), de la comparación espaciada y en masa (memoria de 24 horas).

Producto hikaru genki tipo 1

receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato receptor

subunidades citocromo c oxidasa mitocondrial, ATPasa6, 7 ARNt

subunidades citocromo c oxidasa mitocondrial, ATPasa6, 7 ARNt

subunidades citocromo c oxidasa mitocondrial, ATPasa6, 7 ARNt

gen C/EBP

inhibido

cofactor de molibdeno (cin)

dif

sintaxina1A (syx-1A)

proteína de membrana fsh, 7,6 kb ARNm

gen coriónico defectuoso fc 177 (dec-1)

ADN mitocondrial con 12 ARNt y 7 genes

proteasoma (PROSA-28.1.1.)

proteína de hilera de cisteína 32 (csp32)

ARN de FTZ-F1

ARNm de la proteína Mov34

Subunidad de factor de transcription TFIID 230 kda

croc/FD1 = cocodrilo

ARNm de OS-E de homólogo de proteína de unión a feromona CS-5

Gen de Proteína mago-nashi (mgn)

ARNm de la subunidad de 28 kDa del factor de inicio de la transcripción TFIID

(CONT)

ARNm de proteína La/SS-B de unión a ARN de Canton S (DLa/SS-B)

ARNm del precursor de la enzima convertora de angiotensina (Ance)

ARNm sin comisuras (comm)

ARNm del miembro de la superfamilia del receptor de hormona nuclear DHR78 (DHR78)

Gen de la subunidad beta de proteína 1 de suero larval (Lsp-1b)

ARNm de locus de corte para la proteína que contiene el homeodominio

Gen de la clase II de DRI para la subunidad reguladora del tipo I de quinada dependiente de AMPc

Gen PO

Gen PP1 13C para la proteína fosfatasa 1 13C

ARNm para la proteína de 51 kDa

genes mst 355a y 355b para la proteína secretora de glándulas accesorias masculinas

ARNm de PP-Y para la proteína fosfatasa Y (EC 3.1.3.)

Genes anon-66Da, Minute(3)66D y anon-66Db

ARNm para receptor 5HT-dro2A (receptor de serotonina)

ARNm de proteína de color de ojos (garnet)

ARNm de proteína de centelleo (spa)

ARNm de la proteína relacionada con la quinesina (costal-2)

ARNm de Fuzzy (fuzzy)

Gen de la quitinasa (CHT4)

ARNm para rab11

ARNm de neu=neuralizado

anacronismo Genómico /ARNm

ARNm de gen de proteína de los canal de sodio unido a ácido nucleico de una sola cadena supuesto de transposón TART-B1 (para), exones 9,10,11,12

mod2.2 (mod(mdg4))

ARNm de tirosina quinosa

ARNm de gliolectina de precursor KEK1 de la proteína de transmembrana rerepetición/Ig prot

ARNm de factor-1 (Deaf1) autorregulador deformado

ARNm de Lozenge (Iz)

ARNm de gancho (gancho)

ARNm de proteína de adaptador SH2/SH3 (Dock)

ARNm de proteína de fusión de ARNblown de glicoproteína de unión a retinoide y ácido graso

ARNm de GCR 101

ARNm para el receptor de glutamato metabotrópico

(CONT)

ARNm para factor de transcripción de homeodominio tardío de mariquitas

ARNm para proteína mitocondrial supuesta, gen colt parcial

ARNm para la proteína SA nuclear

Gen del tipo hikaru genki

Gen hopscotch de la tirosina quinasa

Gen syntaxina-1A (syx-1A)

Gen proteasoma (PROSA-28.1.1.)

Gen P-glicoproteína (MdR 49)

Gen de la proteína Mov34

Gen de la proteína del dominio POU (pdm-1)

Gen de la proteína del tipo de factor de crecimiento de Drosophila melanogaster epidermal (spitz)

Gen de la proteína(gc11) sin células germinales (clon 10B-1)

Gen de la proteína mago-nashi (mgn)

Gen del transportador de serotonina

Gen de la subunidad del factor de inicio de la transcripción TFIID 28 kDa

Gen de la subunidad grande de ribonucleósido-difosfato reductasa

Gen nudel (ndl)

Racimo del gen del complejo biotérox (BX-C)

Gen sin comisuras (comm)

Gen de la ADN polimerasa gamma

TABLA 2: Genes de Memoria Candidatos Estadísticos, de Drosophila, derivados de análisis estadístico (valor de diferencia promedio se hace cero), entre la comparación espaciada y en masa (memoria de 24 horas).

Gen de subunidad de proteína 1 beta larval (Lsp-1b)

Racimo del gen de cutícula hdl

Gen alfa-meildopa hipersensible 1(2)amd

Gen shaker ShB

Gen de proteína Elf1 de unión a ADN

Gen de proteína coriónica s16

Genes Adh y Adh-dup

Gen E2F

Gen de proteína de 51 kDa

Gen de caupolican homeoproteína a

(CONT)

Gen de receptor 5HT-dro2A

Gen de proteína de unión a odorant LUSH (lush)

Gen de la proteína de color de ojos (garnet)

Gen de la isoforma de adenilil ciclase DAC9

Gen de proteína relacionada con la quinesin (costal-2)

Gen de quitinasa (CHT1)

Gen canoe

Gen rab11

Gen de la proteína SWI de imitación (ISWI)

Gen de receptor guanilil ciclase (DGC1)

Gen supresor de tumor (warts)

Gen de proteína similar a quinesina (KLP4)

Gen de miosina-IA

Gen de la proteína básica citoplásmica (deltex)

Gen de la óxido nítrico sintasa dependiente de Ca /calmodulina (NOS)

Gen de proteína de los canales de sodio (para)

Gen CKII alfa subunidad interactor 1 (CKIIalfa-I1)

Gen del precursor KEK1 de la proteína transmembrana repetición/Ig rica en leucina (kek1)

Gen de la subunidad del tipo I de transferasa beta geranilgeranil I (beta GGT-I) gancho (gancho)

Gen de la proteína del adaptador de SH2/SH3 (Dock)

Gen de la proteína de unión a ARN lark (lark)

Gen de la glicoproteína de unión a retinoide y ácido graso

Gen de la proteína Dreg-2

Gen del factor de transcripción dMax

Gen de la proteína no cromosómica de histona Prod (prod)

Gen de la proteína de fusión blown (blow)

Gen orb

Gen angel

Gen del factor de transcripción de homeodominio de mariquita

5 Los procedimientos estadísticos descritos anteriormente solamente sugieren "candidatos estadísticos." Un aspecto fundamental de los procedimientos estadísticos empleados (así como otros procedimientos) es que candidatos "positivo falso" y "negativo falso" se obtienen junto con los "positivos verdaderos." Por lo tanto, un procedimiento independiente de la detección de cambios dependientes de la experiencia en la transcripción génica se debe aplicar a los "candidatos estadísticos." Tales procedimientos independientes incluyen análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) y ensayos de protección de ARNasa, y se pueden usar

para confirmar los candidatos estadísticos identificados. Los análisis cuantitativos de estos datos también son sujeto de resultados positivo falso y negativo falso.

- 5 Los cambios menores en los procedimientos estadísticos en el presente documento puede producir un conjunto diferente de "candidatos estadísticos". Con frecuencia, más de un tipo de transformación de datos es suficiente para producir una distribución normalizada de puntuaciones de diferencia. Sin embargo, cada transformación de datos usada producirá un conjunto diferente de candidatos estadísticos. Todos los procedimientos de detección de señal también deben resolver "valores iniciales", que son demasiado bajos para la precisa. El establecimiento de tales valores a "cero" es una forma de tratar esta dificultad. Otra forma es eliminar tales valores del conjunto de datos (por ejemplo, eliminar valores de menos de 10, por ejemplo).
- 10 Los datos del procesador proporcionan información confirmatoria, gen a gen, en lo que se refiere a las transcripciones que están implicadas con la memoria. Los datos de procesador también proporcionan respuesta de transcripción coordinada con estímulos diferentes a través de todas las transcripciones de genes. En particular, los datos de procesador proporcionan información en lo que se refiere al efecto coordinado que una transcripción génica tiene sobre la memoria.
- 15 La mayoría de los genes en *Drosophila* se ha mostrado que tienen homólogos mamíferos, y tal es el caso para la mayoría de los genes de *Drosophila* implicados en la formación de memoria (Dubnau and Tully, *Ann. Rev. Neurosci.*, 21:407 - 444 (1998)). Con el crecimiento del conocimiento que los homólogos de mamíferos pueden estar sustituidos funcionalmente en *Drosophila* para su homólogo de mosca, el presente descubrimiento implica directamente a los homólogos de mamíferos correspondientes.
- 20 Los efectos diferenciales sobre la memoria de larga duración producidos por entrenamiento espaciado contra en masa es un fenómeno ampliamente observado en el reino animal. En particular, un efecto diferencial espaciado - en masa sobre la memoria de larga duración se ha establecido recientemente para el efecto de evasión potenciado por el miedo condicionado en ratas (un sistema de modelo de mamífero). En el paradigma de evasión potenciado por miedo, memoria se infiere de un incremento en la amplitud de evasión en la presencia de un estímulo condicionado (CS) que se ha emparejado previamente con la sacudida del pie. Entrenamiento en masa en ratas (emparejamientos de 4-CS- sacudida con un intervalo de 10 segundos) no produce esencialmente memoria dependiente de la transcripción mientras que el entrenamiento espaciado (4 emparejamientos con un intervalo entre pruebas de 8 minutos) produce memoria dependiente de la transcripción significativa (Figura 6) (Josselyn et al., *Society for Neurosci.*, 24: 926, Abstract 365.10 (1998)). además, sobreexpresión de activador de CREB, administrado a la
- 25 amígdala mediante tecnología de vector viral potencia la memoria de entrenamiento en masa de una manera directamente análoga a la observada en *Drosophila* (Figura 7) (Josselyn et al., *Society for Neurosci.*, 24: 926, Abstract 365.10 (1998)). Estos datos demuestran un diferencial espaciado - en masa potenciado por con la que identificar los CMG de mamífero.
- 30 Por lo tanto, estos protocolos de entrenamiento se espera que produzcan los CMG en animales, tales como mamíferos, similares a los CMG identificados en *Drosophila*. El término "animal", como se usa en el presente documento, incluye mamíferos, así como otros animales, vertebrados e invertebrados (por ejemplo, aves, peces, reptiles, insectos (por ejemplo, especies de *Drosophila*), *Aplysia*). Los términos "mamífero" y "mamífero", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal vertebrado, incluyendo monotremas, marsupiales y placentarios, que amamantan a sus jóvenes y o bien paren a sus jóvenes vivos (mamíferos euterios o placentarios) o
- 35 son que ponen huevos (mamíferos metaterios o no placentarios). Ejemplos de especies de mamífero incluyen seres humanos y otros primates (por ejemplo, monos, chimpancés), roedores (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas) y ruminantes (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos).
- 40 Para identificar los CMG en animales no humanos (particularmente mamíferos no humanos, otros vertebrados e invertebrados), las sondas de ADN se sintetizan usando ARN extraído de los tejidos cerebrales de animales no humanos entrenados espaciados o en masa de acuerdo con procedimientos generalmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York (1997)). Estas sondas se pueden marcar con un marcador detectable. En una realización particular, las sondas de ADN se sintetizan usando ARN extraído de la amígdala de animales entrenados espaciados y en masa y, si se requiere, marcados con un marcador detectable. Se conocen en la técnica una diversidad de marcadores detectables y procedimientos de marcado, incluyendo marcadores detectados fluorescentes, quimioluminescentes, biotina, radioactivos, detectados enzimáticamente y detectados inmunológicamente (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York (1997)). Se extrae ARN de tejidos cerebrales, tal como la amígdala, de acuerdo con procedimientos disponibles en la técnica. El entrenamiento espaciado y en masa de animales se lleva a cabo con procedimientos generalmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Josselyn et al., *Society for Neurosci.*, 24:
- 55

926, Abstract 365.10 (1998); Cassella y Davis, *Physiol. Behav.*, 36: 377 - 383 (1986); Guzowski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2693-2698 (1997); Lamprecht et al., *J. Neuroscience*, 17(21): 6443 - 6450 (1997); Bourchuladze et al., *Cell*, 79: 59 - 68 (1994); y Kogan et al, *Curr. Biol.*, 7: 1 - 11 (1996)). Esta sonda de mezcla compleja se hibrida después en procesadores de microdisposición que contienen secuencias de ADN (secuencias de ADN diana) de genes del genoma de los animales (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.445.934; y Ramsay, *Nature Biotechnology*, 16: 40 - 44 (1998)). La señal de las sondas de ADN se amplifica y se detecta de acuerdo con procedimientos generalmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York (1997)). Por ejemplo, hibridación (la señal de la sonda hibridada) se puede detectar usando ensayos de fluorescencia o espectrometría de masas. Procedimientos que usan fibras ópticas, detección por diodos, quimioluminiscencia/luminiscencia, aglutinación de lecho de látex, detección de cambio de carga eléctrica directa (CCD) y lectura piezoeléctrica también se pueden usar. El algoritmo de transformación de señal descrito anteriormente usado para calcular los niveles de expresión génica entre grupos entrenados espaciados y en masa. Una diferencia estadísticamente significativa en nivel de transcripción entre grupos entrenados espaciados y en masa para un gen específico identifica un gen de memoria candidato. Comparación estadística (Comparación de procesadores de ADN) entre grupos entrenados espaciados y en masa se pueden realizar usando los algoritmos de transformación de la señal descritos anteriormente.

Además de la comparación estadística entre grupos entrenados espaciados y en masa, los CMG se pueden identificar a partir de comparaciones de procesador de ADN (comparaciones estadísticas) entre animales entrenados usando otros pares de protocolos experimentales. El grupo experimental se entrena en condiciones suficientes para inducir memoria dependiente de la transcripción y el grupo control se entrena en condiciones que no son suficientes para inducir memoria dependiente de la transcripción. La diferencia significativa entre cualesquiera protocolos experimentales en la inducción de memoria dependiente de la transcripción. La diferencia significativa entre cualesquiera dos protocolos experimentales a compararse es la inducción de memoria dependiente de la transcripción en el grupo experimental y la ausencia de memoria dependiente de la transcripción en el grupo control.

Pares de protocolos experimentales que principalmente difieren en la inducción de memoria dependiente de la transcripción se conocen en la técnica. Por ejemplo, un par de protocolos experimentales que principalmente difieren en la inducción de memoria dependiente de la transcripción puede constar de un protocolo de entrenamiento espaciado y un protocolo de entrenamiento en masa. En esta realización, entrenamiento de un animal que usa un protocolo de entrenamiento espaciado es suficiente para inducir memoria dependiente de la transcripción en el animal. Entrenamiento de un animal que usa un protocolo de entrenamiento en masa no es suficiente para inducir memoria dependiente de la transcripción. Como otro ejemplo, un par de protocolos experimentales que principalmente difieren en la inducción de memoria dependiente de la transcripción puede constar de entrenamiento de un animal normal (tipo salvaje) usando un protocolo de evasión de la caja de evitación (particularmente un protocolo de evasión de la caja de evitación) y entrenamiento de un animal en el que fórnix se lesiona quirúrgicamente el protocolo de evasión de la caja de evitación (Taubenfeld et al., *Nat. Neurosci.*, 2 (4): 309 - 310 (1999)). En esta realización, memoria dependiente de la transcripción se induce en el animal normal (de tipo salvaje). Memoria dependiente de la transcripción no está inducida en el animal en el que el fórnix está lesionado quirúrgicamente. Como un ejemplo adicional, un par de protocolos experimentales que principalmente difieren en la inducción de memoria dependiente de la transcripción puede constar de entrenamiento de un animal que usa un protocolo de condicionamiento de miedo contextual (particularmente un protocolo de condicionamiento de miedo contextual de una prueba) y entrenamiento de un animal habituado a la cámara de entrenamiento antes del condicionamiento de miedo contextual usando el protocolo de condicionamiento de miedo contextual (Imprey et al., *Nat. Neurosci.*, 1(7) :595 - 601 (1998)). En esta realización, memoria dependiente de la transcripción está inducida en el animal que no se ha habituado a la cámara de entrenamiento antes del condicionamiento de miedo contextual. Memoria dependiente de la transcripción no está inducida en el animal habituado a la cámara de entrenamiento antes del condicionamiento de miedo contextual. Otros pares de protocolos experimentales se pueden identificar fácilmente por los expertos en la técnica.

Sondas de ADN se sintetizan usando ARN extraído de los tejidos cerebrales, tales como la amígdala e hipocampo, de animales entrenados usando pares de protocolos experimentales, como se ha descrito en el presente documento, y, si se requiere, marcadas con un marcador detectable. Las mezclas de sondas de ADN después se hibridan en procesadores de microdisposiciones que contienen secuencias de ADN (secuencias de ADN diana) de genes del genoma de los animales. Una comparación estadística se realiza comparando los datos de procesador ADN entre los dos protocolos experimentales usando los algoritmos de transformación de señal descritos anteriormente.

Los procedimientos estadísticos en el presente documento se pueden usar para detectar diferencias en niveles de transcripción entre grupos entrenados y no entrenados (vírgenes). De acuerdo con lo anterior, genes candidatos de plasticidad (CPG) se pueden identificar a partir de comparaciones de procesador de ADN (comparaciones estadísticas) entre animales entrenados contra no entrenados (vírgenes). Las transcripciones que están reguladas de manera diferencial en esta clase incluyen los CMGS, junto con cualesquiera otros genes que son responsables de

5 manera transcripcional de una manera sensible "no asociativa" a las condiciones de entrenamiento general (por ejemplo, presentaciones de olores, electrochoque o cualesquiera otros aspectos experimentales del protocolo de entrenamiento). Algunas respuestas de transcripción no específicas se producen simplemente cuando un animal se coloca en un ambiente o cuando el animal se expone a un estímulo solo o no asociado en tiempo. Estos cambios de transcripción se pueden producir a partir de incrementos generales (no específicos) en la actividad neuronal o reflejan otras formas de aprendizaje / formación de memoria que no se relacionan con las condiciones generales de entrenamiento.

10 Los CPG de *Drosophila* determinados a partir de análisis estadístico que usan el algoritmo de transformación de señal en el que un valor de diferencia promedio por debajo de 10 para un gen dado se suprime, a partir de la comparación de de espaciado contra virgen (memoria de 24 horas), se presentan en la Tabla 3. Los CPG de *Drosophila* determinados de análisis estadístico que usa el algoritmo de transformación de señal en el que el valor de diferencia promedio negativo para un gen dado es cero, a partir de la comparación espaciada contra virgen (memoria de 24 horas), se presentan en la Tabla 4.

TABLA 3: Genes de Plasticidad de Candidatos Estadísticos, derivados de análisis estadístico (valores de diferencia promedio suprimidos < 10), de la comparación espaciada contra virgen (memoria de 24 horas).

<p>Proteína ribosomal S6 (rps6)</p> <p>ARNm hu-li tai shao (hts)</p> <p>ARNm de proteína de reparación de ADN endonucleasa de la proteína ribosomal S3/AP</p> <p>Gen gurken</p> <p>ARNm de proteína atonal</p> <p>Gen de la cadena intermedia de dineína citoplásmica (Cdic)</p> <p>Gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa-1</p> <p>Gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa-2</p> <p>Gen de proteína F1 de 50 kDa</p> <p>Gen Dmras85D</p> <p>Genes de serina proteasa (SER1 and SER2)</p> <p>ARNm de la cadena 2 ligera de miosina (MLC2)</p> <p>Genes de carboxilesterasa 6 y P (Est-6 y Est-P)</p> <p>ARNm de anexina IX</p> <p>ARNm de proteasoma (PROSA-28.1.1.)</p> <p>Gen de laminina B2</p> <p>ARNm de receptor de octopamina</p> <p>Gen del componente A2 de difenol oxidasa (Dox-A2)</p> <p>ARNm de homólogo de RAD6 (DHR6)</p> <p>ARNm de proteína de Mov34</p> <p>ARNm de glu-prolil ARNt aminoacil sintetasa</p> <p>ARNm de quinasa del receptor acoplada a laproteína G (GPRK-1)</p> <p>ARNm de optomotor-ciego</p> <p>ARNm de profilin (Carbonero cabecinegro)</p> <p>ARNm de factor de transcripción IIB (TFIIB)</p>
--

(CONT)

ARNm de proteína relacionada con glutathion S-transferasa

Genes de tripsina-alfa, -beta y -epsilon

Genes de tripsina-alfa, -beta y -epsilon

Gen de catalasa

Gen de la subunidad de proteasoma (1(3)73Ai)

ARNm de proteína PBPRP-2 relacionada la proteína de unión a la feromona Canton S

ARNm de la subunidad de 28 kDa del factor de inicio de la transcripción TFIID

Gen de formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutathion

ARNm de homólogo del factor de despolimerización de cofilina/actina

ARNm de proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida

ARNm de proteína ribosomal DL11

proteína rfc40, proteína Rop (Rop), y proteína de unión a GTP

Gen PROS-Dm25g para proteasoma

ARNm de DmTnC 41C para troponina-C

ARNm de WM6

ARNm para 40S proteína ribosomal S12

ARNm para ATPasa sintasa mitocondrial

Genes mst 355a y 355b para proteína secretora de glándulas accesorias masculinas

Gen Pkg para fosfoglicerato quinasa

Proteína ribosomal 15a (subunidad 40S) de D.melanogaster.

ARNm de proteína de color de ojos (garnet)

Gen de cisteína proteasa-1 (CP1)

ARNm de proteína de unión a calcio(SCP1)

Gen de citocromo P450 (CYP4D2)

Gen de alfa NAC (oxen), cds completo; y Pseudogen G76C

Gen de alfa NAC (oxen), cds completo; y Pseudogen G76C

ARNm de proteína relacionada con quinesina (costal-2)

ARNm de co-represor transcripcional SIN3A (Sin3A)

Gen de quitinasa (CHT2)

ARN para la proteína 4 relacionada con rab.

ARNm para tipo salvaje 1 Still

Gen que codifica la molécula de adhesión a célula (nrm)

Gen de fosfoglicero mutasa (Pglym78)

ARNm de receptor guanilil ciclasa (DGC1)

(CONT)

ADN de factor I (mutación W-IR1)

ADN de factor I (mutación W-IR1)

Transcriptasa inversa supuesta de elemento repetitivo de Fw

Transcriptasa inversa supuesta de elemento repetitivo de Fw

Segunda subunidad mayor de ARN polimerasa II (DmRP 140)

Gen de la membrana inducible por ecdisona (IMP-L1)

mdglhet, integrasa {MDG1 retrotransposón}

Dacp-1= proteína de cutícula

ARNm de glutamato decarboxilasa

Elemento 23Zn-1 deHeT-A.

ARNm de (zeste-blanco 4)

ARNm de Dachshund (dachshund)

ARNm de proteína Hk

Subunidad de la guanilil ciclasa beta (dgcb1) soluble

ARNm de citocromo P450 (Cyp4g1)

Gen de alfa esterasa (aE10)

Gen de la subunidad A de ATPasa vacuolar (vha68-2)

ARNm de desaturasa de ácido graso

Gen wunen

Genes Rga y Atu

ARNm de quinesina-73

ARNm de homólogo de MCM5 (DmMCMS)

ARNm de proteína de tipo quinesina 67a

ARNm de componente (dj) de proteína específica de esperma

Secuencia de ADN (aislamiento CBS) para ARNr 18S (extremo 3'), ARNr 5.8S y ARNr 28S

ARN nmr para DNMDAR-I

ARN para proteína de tipo enzima conversora de angiotensina

ARN para histona H4

ARN para factor de transcripción del homeodominio tardío de mariquita

Gen colt

ARN para subunidad gamma de ATP sintasa

ARN para tipo II de 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa

TABLA 4: Genes de Plasticidad de Candidatos Estadísticos, derivados de análisis estadístico (valores de diferencia promedio negativos se hacen cero), de la comparación en espaciada contra en masa (memoria de 24 horas).

Proteína Daughterless (da)
 Receptor esteroide (FTZ-F1B)
 proteína de dominio POU (pdm-1)
 Complejo bitórax (BX-C)
 Superfamilia de receptor de hormona nuclear (DHR96)
 Co-represor SIN3A transcripcional (Sin3A)
 ARN para histona H4
 ARN para homeodominio tardío de mariquita
 RAD6 (DHR6)
 serina proteasa supuesta (easter)
 Genes de serina proteasa (SER1 y SER2)
 Proteasoma (PROSA-28.1.1.)
 Proteína Mov34
 tripsina-alfa, -beta y -epsilon
 Genes de tripsina-alfa, -beta y -epsilon
 Gende la subunidad de proteasoma (1(3)73Ai)
 Gen PSMA5 de la subunidad alfa de proteasome 20S
 snake locus ARN para serina proteasa
 Gen PROS-Dm25g de D.melanogaster para proteasoma
 proteína secretora de glándulas accesorias masculinas (serpin)
 precursor de serina proteasa SER4 (Ser4)
 Gen de cisteína proteinasa-1 (CP1)
 ARNm de clon 6 de serina proteasa
 ARNm de Drosophila melanogaster dishevelled, cds completo.
 Gen Dmras85D, exón 3
 ARNm de quinasa de receptor acoplada a la proteína G (GPRK-1)
 Proteína rfc40 , proteína Rop (Rop), y proteína de unión a GTP pequeña
 Tirosina quinasa, secuencia parcial
 ARN para proteína 4 relacionada con rab
 ARN para proteína 3 relacionada con
 ARNm de homólogo inhibidor ded disociación GDP (dGDI)
 ARNm de (zeste-blanco 4)

(CONT)

fosfoinositida 3-quinasa, Dp 110
 subunidad catalítica de fosfatasa 2A
 ARNm de fasciclina III
 ARNm de anexina IX
 Gen hipersensible a alfa-metildopa 1(2)amd
 ARNm de GS2 para glutamina sintasa
 ARNm de GS1 para glutamina sintasa
 ARNm para receptor de dopamina
 ARNm de proteína de color de ojos (garnet), tipo clatrina
 Gen que codifica la molécula de adhesión a célula (nrm)
 ARNm de antígeno 2 de la superficie de neurona Nrv 2.2 2 (Nrv2)
 Gen de la subunidad A de la ATPasa R vacuolar (vha68-2)
 ARNm para DNMDAR-I
 Gen AcTr66B para proteína relacionada con actina
 ARNm DmTnC 41C para troponina-C
 ARNm de proteína relacionada con quinesina (costal-2)
 ARNm de proteína asociada a microtúbulos (asp)
 Gen de la cadena intermedia de dineína citoplásmica (Cdic)

5 La memoria dependiente de la transcripción se puede inducir usando condiciones experimentales específicas. En una realización, la memoria dependiente de la transcripción se induce en un animal no humano usando un protocolo de entrenamiento espaciado para la respuesta de evasión potenciada por miedo. En una segunda realización, la memoria dependiente de la transcripción se induce en un animal no humano usando un protocolo de evitación de caja de evasión. En una tercera realización, la memoria dependiente de la transcripción se induce en un animal no humano usando un protocolo de condicionamiento de miedo contextual.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que no se consideran limitantes de ninguna manera.

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1 aislamiento de *nalyot*^{P1}

15 Un transposón PlacW ligado a X (Bier et al., Science, 240 (4854): 913 - 916 (1988)) se movilizó para generar 2.182 cepas de transposantes con inserciones independientes sobre el segundo y tercer cromosomas (cf. Boynton y Tully, Genetics, 131:655-672 (1992); Dura et al., J. Neurogent., 9: 1 - 14 (1993)). La memoria de tres horas después de una única sesión de entrenamiento de aprendizaje olfatorios Pavloviano se cuantificó con un índice de comportamiento (PI) para cada una de estas cepas transposantes. N = 4 PIs se generaron después a partir de aquellas cepas que puntuaban un 70% o menos de una cepa parental de tipo salvaje [W1118 (CS10)]. En esta fase de selección, 93 cepas mutantes produjeron puntuaciones de 70% de memoria de tres horas de media de tipo salvaje o menos. Cada una de estas cepas mutantes después se cruzó durante cinco generaciones con la cepa parental para equilibrar sus antecedentes genéticos (heterogéneos). Cuando la memoria de tres horas se cuantificó de nuevo (N = 4 PIs) en estas cepas cruzadas, solamente ocho de los 93 mutantes candidatos todavía produjeron puntuaciones medias < 70% de tipo salvaje. Finalmente, tareas de motorización sensorial "relevantes de tarea" se ensayaron en ocho cepas mutantes. Los ocho mostraron reactividad al estímulo normal; cuatro, GB335 y EJ51, EJ220 y ES152, mostraron agudeza olfatoria reducida significativamente (Boynton y Tully, Genetics, 131: 655 - 672

(1992); Dura et al., J. Neurogent., 9: 1 - 14 (1993). [GB335, llamada ahora *dare*, se ha estudiado además y muestra una expresión preferencial en antenna (Freeman et al., Development, 126: 4591 - 4602 (1999)]. Las cuatro cepas mutantes restantes mostraron respuestas de motorización sensorial normal y se llamaron *latheo* (Boynton and Tully, Genetics, 131:655-672 (1992); Pinto et al., Neuron, 23: 45 - 54 (1999); Rohrbough et al., Neuron, 23:55-70 (1999), *linotte* (Dura et al., J. Neurogent., 9: 1 - 14 (1993); Bolwig et al., Neuron, 15: 829 - 842 (1995); Simon et al., Mech. Dev., 76:42-55 (1998), *golovan* y *nalyot*.

Ejemplo 2 clonación y caracterización de la región genómica de *nalyot*.

El transposón PlacW incluye un único sitio de restricción SacII seguido del origen bacteriano de replicación y gen de resistencia a ampicilina (Figura 8). Digestión de ADN genómico de *nalyot* (*nal*) con ligación a SacII en condiciones diluídas y transformación bacteriana permitió el rescate de plásmido de un fragmento de restricción de SacII de 9,4 kb junto con el ADN flanqueante de la región genómica. Experimentos de transferencia *in situ* y Southern de cromosoma verificaron que este fragmento se mapeaba conjuntamente con el sitio de inserción de P. Los fragmentos de rescate marcados radiactivamente se usaron para seleccionar un millón de placas de una genoteca genómica de *Drosophila* Can-S lambda-DashII (Stratagene). Análisis de aislamiento, subclonación y restricción de 10 clones genómicos independientes condujeron a la construcción de un mapa de 35 kb que se extiende sobre la región genómica alrededor del sitio de inserción del elemento P (Figura 8).

Los mapas de intrón/exón de las unidades de transcripción *adf1* y *cn20* se muestran en la Figura 8. El elemento *nal*^{P1} (flecha) está insertado dentro de un intrón de la unidad de transcripción *adf1*, 147 pares de bases cadena abajo del sitio donante de ajuste. El gen *adf1* codifica un factor de transcripción relacionado de manera distante con la familia de myb family (England et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 683 - 687 (1992)) y está de manera alternativa ajustado en (al menos) dos ARNm. *i1* e *i2* corresponden a dos sitios de de comienzo de la traducción potenciales. Dos intrones adicionales de aproximadamente 3,5 kb y 59 pares de bases parecen estar ajustados de manera constitutiva y separan el residuo de la unidad de transcripción de *adf1* en exones de 274 pares de bases y de 1.013 pares de bases. El gen *cn20* es novedoso y produce una única, transcripción no ajustada que puede codificar una proteína de encode 395 aminoácidos. Se indica el grado de la supresión genómica en *nalle60*. Sitios de restricción: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; S, SacII.

Ejemplo 3 análisis de transferencia northern de *adf1* y *cn20* en moscas *nal*^{P1} mutantes y de tipo salvaje y aislamiento de *adnc*.

Se aisló ARN total de moscas adultas enteras, cabezas de adultos o cuerpos de adultos con el reactivo TriZOL (BRL). La fracción de poli(A) se purificó posteriormente con oligo(dT) celulosa (Collaborative Research) o perlas magnetizadas oligo(dT) (Dynal). Se fraccionó el ARN poli(A) purificado mediante formación de electroforesis en gel de formaldehído - agarosa y se transfirió a una membrana de nylon ZetaProbe (BioRad) en 10 x SSC. Se fijó el ARN sobre la membrana seca mediante reticulación de UV a 2.500 μ joules (Stratalinker). Para la identificación inicial de clases de transcripciones, se sondaron las tiras de membrana durante toda una noche con fragmentos de ADN genómicos marcados radiactivamente con alta rigurosidad tampón Church y Gilbert, se lavó abundantemente y se expuso a película Kodak BioMax.

Las sondas seleccionadas se hibridaron a dos genotecas de ADNc de cabezas de adultos de *Drosophila*, una genoteca de cabezas de adulto de bacteriófago lambda gt11 (Salvaterra) y una genoteca de plásmido pJG4-5 (Roshbash). A partir de estas dos genotecas, se aislaron un total de once clones, que corresponden a dos unidades de transcripción independientes, y se evaluaron mediante análisis de restricción. Diez clones correspondían a la unidad de transcripción *adf1*. El mapeo de restricción y análisis de secuencia de un subconjunto de éstas reveló un sitio de procesamiento de extremo 3' común y heterogeneidad en el extremo 5'. La heterogeneidad de 5' reflejó el ajuste parcial de intrón 1 (114 pares de bases) y, quizás, síntesis de la primera hebra incompleta. Un clon, *cn20*, correspondía a una unidad de transcripción independiente, cercana.

Para cuantificar el efecto de la inserción de P sobre niveles de ARN de *adf1* y *cn20*, las transferencias de Northern derivados de *nal*^{P1} y cabezas o cuerpo de tipo salvaje se analizaron como antes con sondas marcadas radiactivamente correspondientes a *adf1*, *cn20* y un ARN control *rp49*.

Con relación a los niveles control de ARN de *rp49*, los niveles de expresión de ARNm de *cn20* en tanto las cabezas como cuerpos eran similares en moscas de tipo salvaje y mutantes. Por el contrario, los niveles de expresión de ARNm de *adf1* se redujeron en al menos dos veces en cabezas y cuerpos de mutantes.

Ejemplo 4 producción de anticuerpos.

El marco abierto de lectura de ADF1 entero se insertó en el vector de expresión pET30(a) (Novagen) en forma de una fusión C terminal. La inducción de IPTG robusta de proteína de fusión de ADF1 se obtuvo en bacterias BL21 transformadas. La mayoría de la proteína inducida estaba en la fracción de los cuerpos insoluble, de inclusión y esta fracción (aislada 3 horas después de la inducción) se enriqueció al 85% para la proteína de fusión ADF1. Esta fracción se lavó abundantemente con PBS y se usó directamente como un antígeno. Anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón se obtuvieron mediante procedimientos convencionales (Harlow y Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY (1998)). Se inocularon tres ratones con 50 µg de la fracción de cuerpos de inclusión (en adyuvante completo de Freund), después se reinmunizaron cada dos semanas con 50 µg de fracción de cuerpos de inclusión en adyuvante de Freund incompleto. Los tres ratones mostraron respuestas inmunes robustas; uno se sacrificó para evaluar fusiones de hibridoma. De 800 líneas de hibridoma candidatas, 17 mostraron una respuesta en análisis de transferencia de puntos de ADF1. La evaluación posterior de las 17 líneas mediante transferencia de Western y ensayos inmunoquímicos condujeron al aislamiento de diez líneas monoclonales, incluyendo MAb ADF1-8 y MAb ADF1-17.

Ejemplo 5 análisis de transferencia de western de los niveles de proteína *adf-1* en moscas mutantes *na/pl* y de tipo salvaje.

Cabezas o cuerpos congelados se aislaron como se ha descrito previamente (Yin et al., Cell, 79:49-58 (1994)), y extractos se prepararon mediante homogeneización de 100 µl de polvo de cabezas congeladas en 500 µl de tampón RIPA. Se determinaron las concentraciones de proteína mediante el ensayo de proteína Bio-Rad. Las muestras de proteína se desnaturalizaron en colorante de carga estándar, se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron electroforéticamente a membrana de nitrocelulosa de 100 mA durante 2 horas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Cada membrana se bloqueó durante toda una noche a 4°C en PBST + 5% de leche, después se incubó durante 1 - 2 horas con anticuerpo primario en PBST + 5% de leche. Los anticuerpos primarios usados eran sueros policlonales de ratón contra *adf1* (1:1000), sobrenadante monoclonal de ratón (MAb Adf1-17) contra *adf1* (1:20) sobrenadante monoclonal de ratón TBP (1:5), y ascitos monoclonales de ratón contra α -tubulina (1:50,000) (Sigma). La membrana se lavó abundantemente en PBST y se incubó durante 1 - 2 horas con anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a HRP (Bio-Rad; 1:500). Después de un lavado abundante en PBST, los productos conjugados se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (Substrato SuperSignal ULTRA de Pierce) y autorradiografía.

Con relación a los niveles de control de otras dos proteínas (proteína de unión a TATA -y alfa-TUBULINA), la expresión de ADF1 se redujo al menos dos veces en moscas mutantes.

Ejemplo 6 comparación de conjuntos de datos de procesador de ADN entre moscas de tipo salvaje y un mutante de un único gen, *nalyot*.

Se compararon los conjuntos de datos de Procesador de ADN entre moscas normales (de tipo salvaje) y un mutante de un único gen, *nalyot*. El mutante *nalyot* se mostró que tenía memoria normal después de entrenamiento en masa, pero LTM no estaba inducido por entrenamiento espaciado. Además, la mutación *nalyot* se identificó como inserción de transposón en el gen *Adf1*, cuyo efecto es para reducir la cantidad de transcripción de *Adf1* y proteína en cabezas de moscas mutantes.

Cuando todos los valores iniciales se establecieron a cero y se analizaron después los datos, no se detectó diferencia significativa entre moscas de tipo salvaje y mutantes *nalyot* para el gen *Adf1*. Sin embargo, cuando los valores iniciales de 10 o menos se eliminaron de los análisis (mejor que establecer cero), se detectó un efecto significativo sobre la transcripción de *Adf1*, que corroboraba los resultados obtenidos por análisis de Northern, como se ha descrito en el Ejemplo 3. Este resultado constituye una verificación significativa para el planteamiento estadístico en el que los valores de diferencia promedio por debajo de 10 se suprimen del conjunto de datos.

Ejemplo 7 reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Un grupo dado de moscas se somete a un protocolo de entrenamiento particular (espaciado o en masa) y se almacenó en viales de alimento regular después de entrenamiento. Veinticuatro horas después de entrenamiento, moscas de diferentes grupos de un protocolo de entrenamiento dado (espaciado o en masa) se recogen en un único tubo de 50 ml Falcon y se congelaron rápidamente en nitrógeno. Las cabezas de moscas congeladas se separaron de sus cuerpos mediante agitación mecánica vigorosa. Las partes del cuerpo congeladas y separadas se tamizaron mediante una serie de tamices, por último para obtener una población homogénea de cabezas de moscas.

Las cabezas combinadas de un grupo de entrenamiento (espaciado o en masa) se separaron en ocho grupos. Cada grupo de cabezas se molió después en un polvo con mortero y almirez. El polvo se transfirió a 5 ml de solución de Trizol (Gibco) y se almacenó a -70°C durante toda una noche.

Después la solución de Trizol / polvo de mosca congelados se descongela. Se añaden 2 ml de cloroformo. La mezcla se centrifuga a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El ARN extraído (en fase acuosa) se decanta a un tubo reciente, y se añaden 1,4 ml de isopropanol.

5 Para QPCR, alícuotas de la solución anterior se centrifugaron a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se decanta el isopropanol, y se lava el sedimento 1x en etanol al 70%. El sedimento se vuelve a suspender en 100 µl de H₂O y se añade un volumen igual de fenol/ cloroformo (Gibco). La solución se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La capa acuosa superior se decanta a un tubo reciente. Se añaden 200 µl de etanol enfriado con hielo, junto con 6 µl de acetato de sodio 3 M. La solución se incubó a -20°C durante 20 minutos.

10 Después la solución se centrifuga 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se vuelve a suspender en 20 µl de H₂O y se sometieron a ADNasa sin RQ1 ARNasa (Promega). Se determina la concentración de ARN.

Los ADNc de primera cadena se sintetizan después a partir de 1 µg de las muestras de ARN sin, y se realiza el ensayo de QPCR de acuerdo con protocolos de Perkin Elmer Biosystems, usando el 7700 ABI Prism con detección de fluorescencia ciberverde "CYBR".

Ejemplo 8 gen de memoria estadístico candidato, c/ebp.

15 Se usaron los siguientes cebadores C/EBP, diseñados por Quantagene (Paris, Francia), en experimentos QPCR: 5'-AGACTACCGATGCGAACAAAC-3' (SEQ ID NO:1) y 3'-GTCCCTGAAGTGGTCGTCTA-5' (SEQ ID NO:2), que producen un fragmento esperado de 221 pares de bases de tamaño.

20 Para los datos de C/EBP, 8 extracciones replicadas de ARN se obtuvieron a partir de aproximadamente 10.000 cabezas de moscas 24 horas después de que se sometían a entrenamiento espaciado o en masa. Reacciones de QPCR para cada extracción de ARN se desarrollaron por triplicado de acuerdo con el procedimiento indicado en el Ejemplo 7.

Los resultados para cada reacción de C/EBP se normalizaron para cantidades de ARN contra una reacción de QPCR emparejada para TBPβ, un gen de control que no muestra cambios de transcripción en estos contextos.

25 Analizados de esta manera, el número medio de ciclos requeridos para la amplificación de C/EBP para alcanzar el valor crítico era $21,86 \pm 0,56$ para el grupo espaciado y $23,78 \pm 0,56$ para el grupo en masa. Lleva menos ciclos de amplificación para el grupo espaciado para alcanzar el valor crítico, que indica una mayor concentración de C/EBP al comienzo de la amplificación de PCR.

30 Estos datos indican que los niveles de C/EBP eran 3,78 veces más altos en el grupo de entrenamiento espaciado que en el grupo de entrenamiento en masa (Figura 5). Los resultados experimentales que existe una diferencia significativa para transcripciones de C/EBP (llamadas células de borde *lentas*, *slobo* en *Drosophila*) aisladas de moscas entrenadas espaciadas contra en masa. La manipulación genética de C/EBP en ratones potencia la memoria a largo plazo (Sterneck et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 95 (18): 10908 - 10913 (1998)), y la manipulación molecular de C/EBP en *Aplysia* bloquea la facilitación a largo plazo (un sustrato celular para la memoria a largo plazo de sensibilización) (Alberini et al., Cell, 76: 1099 - 1114 (1994)). Por lo tanto, la confirmación de C/EBP como un CMG en el presente documento constituye una verificación significativa de que este planteamiento del procesador de ADN se puede usar en la identificación de transcripciones implicadas en la memoria.

Ejemplo 9 aparato de entrenamiento.

40 Ratas macho Sprague-Dawley experimentalmente vírgenes (300-350 g) se entrenaron y ensayaron en cinco jaulas de Plexiglas idénticas y de malla de alambre (8 x 15 x 15 cm) alojadas en una cámara atenuada de sonido (Cassella y Davis, Physio. Behav., 36: 377 - 383 (1986)). El estímulo que provoca la evasión era una explosión de 105 dB, 50 ms de ruido blanco (tiempo crecimiento - relajación 5 ms), contra un ruido blanco de fondo de 55 dB. Se produjo una luz CS de 3,7-s mediante una bombilla fluorescente de 8-W (tiempo crecimiento - relajación, 100 µs; intensidad pie - Lambert BCO). El suelo de cada jaula constaba de cuatro de cuatro barras de acero inoxidable, a través de las cuales se podía administrar un estímulo de alteración de orden a las patas 0,5 s 0.6 ó 0.3 mA.

Ejemplo 10 procedimientos de entrenamiento de comportamiento .

Cada dos días antes de todo entrenamiento, las ratas se colocaron en las cámaras de evasión y 15 minutos más tarde se presentaron con 15 estímulos de evasión. En único día de entrenamiento para Exp. 1, los animales se colocaron en la cámara de evasión y 5 minutos más tarde recibieron 4 estímulos eléctricos emparejados con uno de los siguientes intervalos de entre pruebas (ITI) (3 segundos, 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 2 minutos u 8 minutos). Cinco minutos después del último estímulo de luz emparejado, los animales se devolvieron a las jaulas de hogar. El entrenamiento apareado en masa y espaciado se llevó a cabo de manera similar excepto que el ITI entre 4 emparejamientos de estímulos luminosos era 10 segundos y 8 minutos, respectivamente. Explícitamente las pruebas de entrenamiento en masa no apareadas constaba de presentaciones en masa de la luz (4, ITI de 10 segundos) seguido de 4 minutos más tarde por presentaciones en masa de estímulo (4, ITI de 10 segundos).

Ejemplo 11 ensayo de memoria a largo plazo.

Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento, se colocaron las ratas en el aparato de evasión y recibieron 30 estímulos provocadores de evasión solo seguido de 60 estímulos provocadores de evasión, la mitad de los cuales 3,2 segundos después de la aparición de 3,7 segundos de luz (prueba de Luz-Ruido) y la mitad de los cuales se presentó en oscuridad (Prueba de Ruido Solo). El orden de los dos tipos de prueba era irregular. Todos los estímulos de evasión se presentaron en un intervalo de estímulo de 30 segundos. La puntuaciones de diferencias de evasión potenciadas por miedo, usadas como un índice de LTM, se calcularon restando las amplitudes de evasión promedios producidas por las 30 pruebas de Ruido solo del las amplitudes de evasión promedio producidas por las 30 pruebas Luz - Ruido.

Ejemplo 12 ensayo de memoria a corto plazo.

El ensayo de memoria a corto plazo (STM) era similar al ensayo de LTM excepto que se produjo 15 ó 40 minutos después de entrenamiento. A veinte estímulos de Ruido Solo siguieron 15 estímulos de Luz - Ruido y 15 estímulos de Ruido Solo entremezclados. Las puntuaciones de evasión potenciada por miedo se calcularon restando la puntuación de Ruido solo promedio de la puntuación de Luz - Ruido promedio y se usó como un índice de STM.

Ejemplo 13 cirugía.

Ratas se trataron previamente con sulfato de atropina (0,4 mg/kg, ip), se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, ip) y se colocaron en un instrumento estereotáxico estándar. Una microjeringa de Hamilton (10 µl) montada en una bomba de infusión se usó para las infusiones. Se administraron microinyecciones bilaterales (2 µl) durante 10 minutos mediante unas cánulas de calibre 30 dirigida al núcleo lateral de la amígdala (coordenadas AP = - 2.8, L = ± 5,2, DV = - 8,5 por debajo de la superficie del cráneo) o núcleo caudado (coordenadas AP = + 0.2, L = ± 3,0, DV = - 6,0) de acuerdo con Paxinos y Watson, El cerebro de rata en las coordenadas estereotáxicas, Academic, Sydney, Australia (1986). Las cánulas de infusión se dejaron en el sitio 10 minutos adicionales para asegurar la disusión.

Ejemplo 14 preparación de virus.

Los ADNc de CREB y mCREB (obtenidos de M.E. Greenberg, Universidad de Harvard) y LacZ se insertaron en el amplicón HSV-PrpUC de HSV y se empaquetaron usando el auxliar 5dl 1.2 (Lim et al., Biotechniques, 20: 460 - 469 (1996); Keve et al., Neuroscience, 79: 435 - 447 (1997)). Se purificó el virus en un gradiente de sacarosa; se sedimentó y se volvió a suspender en sacarosa al 10%. El título promedio de las reservas de virus recombinantes era $4,0 \times 10^7$ unidades infecciosas/ml y era similar para HSVCREB y HSV-mCREB. La expresión transgénica se regulo por el promotor constitutivo para el gen IE 4/5 temprano inmediato de HSV.

Ejemplo 15 inmunquímica.

Se sobredosificaron las ratas con hidrato de cloral y se profundió con 50 ml de PBS seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros se crioprotegieron y se cortaron en un microtomo (secciones de 40 µm), y se realizó inmunquímica sobre las secciones no flotantes. Los cerebros infectados con HSV-LacZ se hicieron reaccionar con β-galactosidasa y se tiñeron por contraste con rojo neutro (de acuerdo con Lim et al., Biotechniques, 20: 460 - 469 (1996); Keve et al., Neuroscience, 79: 435 - 447 (1997)). En resumen, para detector la actividad de β-galactosidasa, las rodajs de cerebro se dejó que reaccionaran durante 2 horas en una solución que comprendía 3,1 mM de ferrocianuro de potasio, 3,1 mM de ferrocianuro de potasio, 20 mM de MgCl₂, 0,1 M PBS y 0,2 mg/ml X-gal (Boehringer-Mannheim).

Se llevó a cabo el análisis de expresión transgénica en cerebro infectado con HSV-CREB. En resumen, se incubaron las secciones con 1% de H₂O₂ y 0,3% de Triton-X durante 20 minutos, se bloquearon con 1% albúmina sérica bovina, 2% de suero de cabra normal y 0,3% de Triton-X durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario, CREB (1:1000; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) durante toda una noche a 4°C con agitación constante. Se incubaron las secciones con antisueros secundarios de IgG de conejo anti-cabra biotinilado (dilución

1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron las secciones y se incubaron con complejo de reactivo avidina-biotina peroxidasa (ABC) (Vector Laboratories). La inmunorreactividad se visualizó usando la reacción de diaminobenzidina (DAB).

Ejemplo 16 efecto del intervalo entre pruebas entre pruebas condicionantes del medio en los niveles posteriores de memoria a largo plazo.

5 El valor de la media de LTM (\pm SEM; determinado como puntuaciones de diferencia de evasión potenciada por miedo), se determinó 48 horas después de entrenamiento que constaba de 4 emparejamientos de estímulo luminoso con los ITI de 3 segundos, 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 2 minutos y 8 minutos ($n = 10, 10, 10, 5, 5, 15$, respectivamente), variaba con los diferentes ITI ($F_{1,49} = 3,04, p < 0,05$). El nivel de LTM es una función lineal del valor de ITI con valores más largos de ITI producen LTM más robustos como se muestra por una tendencia lineal significativa ($F_{1,49} = 7,99, p < 0,05$). Entrenamiento en masa (3 segundos, 5 segundos, 10 segundos) produce un valor muy débil de LTM (aproximadamente 50 unidades). El incremento del intervalo de descanso de 10 segundos a 8 minutos produce un incremento en LTM como comparaciones Duncan post-hoc revela que 8 min ITI (espaciado) produjo LTM significativamente mayor que 10 segundos, 5 segundos y 3 segundos (en masa). Los resultados se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 17 efecto de infusión de vectores hsv en la amígdala basolateral y las áreas de amígdala extra.

20 Ratas administradas por infusión con HSV-CREB en la amígdala basolateral ($n = 17$) mostró LTM significativamente mayor que las ratas administradas por infusión de manera similar con PBS ($n = 7$), HSV-LacZ ($n = 10$), o HSV-mCREB ($n = 11$) o ratas administradas por infusión con HSV-CREB en las regiones de cerebro que rodean el complejo basolateral de la amígdala ($n = 8$) o en una región control (la caudada; $n = 5$) ($F_{5,52} = 4,99, p < 0,001$). El análisis Post-hoc reveló que el nivel de LTM en ratas que recibían la infusión de HSV-CREB en la amígdala basolateral era significativamente mayor que todos los otros grupos.

25 La reactividad para el cloque de pata no era diferente para los animales a los que se les administró HSV-CREB ($n = 17$), HSV-mCREB ($n = 11$), HSV-LacZ ($n = 10$) o PBS ($n = 7$) infusión en la amígdala basolateral antes de entrenamiento en masa ($F_{3,41} = 1,41, p > 0,05$). El valor de reactividad de estímulo promedio se determinó por desplazamiento de jaula para el período de 200 ms después de cada uno de los 4 estímulos de las patas.

La explicitad del condicionamiento no alterado (en la que CS (estímulo condicionado) y US (estímulo no condicionado) no están asociados) no producían LTM para la asociación en ratas control ($n = 10$) e infusión intra amígdala de PBS ($n = 5$) o HSV-CREB ($n = 5$) no cambiaron esto ($F_{2,17} = 0,44, p > 0,05$).

30 Animales que recibían HSV-CREB 3 días antes del entrenamiento en masa (3d HSV-CREB, $n = 10$) mostraron mayor LTM cuando se vuelve a ensayar 14 días después de la infusión que los animales tratados de manera similar con HSV-LacZ (3d HSV-LacZ, $n = 3$) o animales administrados con HSV-CREB 14 días antes de entrenamiento en masa y se ensayaron 48 h después (14d HSV-CREB, $n = 4$) ($F_{2,14} = 6,05, p < 0,05$).

35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que identifica un gen o genes candidatos implicados en la memoria dependiente de la transcripción de aprendizaje asociativo que comprende las etapas de:
- 5 (a) entrenar animales no humanos para inducir la formación de memoria dependiente de la transcripción en dichos animales;
- (b) extraer ARN de tejido cerebral de dichos animales entrenados en la etapa (a);
- (c) sintetizar sondas de ADN usando el ARN extraído en la etapa (b);
- 10 (d) hibridar las sondas de ADN sintetizadas en la etapa (c) a secuencias de ADN complementarias sobre procesadores de microdisposiciones que contienen secuencias de ADN a partir de genes del genoma de dichos animales, en el que una señal se produce tras la hibridación de dichas sondas a secuencias de ADN complementarias;
- (e) detectar la señal producida en la etapa (d); y
- (f) realizar una comparación estadística entre la señal detectada en la etapa (e) y la señal detectada en un control para cada gen usando un algoritmo de transformación de señal,
- 15 en el que dicho control se obtiene de acuerdo con un procedimiento que comprende las etapas de:
- (i) extraer ARN de tejido cerebral de animales control no humanos entrenados para inducir formación de memoria independiente de la transcripción pero no formación de memoria dependiente de la transcripción asociada a dichos animales control;
- (ii) sintetizar sondas de ADN que usan el ARN extraído en la etapa (f) (i); e
- 20 (iii) hibridar las sondas de ADN sintetizadas en la etapa (f) (ii) a secuencias de ADN complementarias sobre procesadores de disposiciones que contienen secuencias de ADN de los genes del genoma de los animales control, en el que se produce una señal tras la hibridación de dichas sondas a secuencias de ADN complementarias; y
- en el que la formación de memoria en el animal de la etapa (a) se induce usando un protocolo de entrenamiento espaciado y la formación de memoria en los animales control se induce usando un protocolo de entrenamiento en masa; y tanto el protocolo de entrenamiento espaciado como el protocolo de entrenamiento en masa usan procedimientos de condicionamiento pavloviano con un estímulo condicionado y un estímulo no condicionado que están temporalmente emparejados; y
- 25 en el que una diferencia estadísticamente significativa entre la la señal detectada en la etapa (e) y la señal detectada en un control para cada gen indica un gen de memoria candidato implicado en la memoria asociativa dependiente de la transcripción.
- 30
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos animales no humanos son mamíferos no humanos y ARN se extrae del tejido cerebral de dichos mamíferos.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el dicho tejido cerebral es amígdala o hipocampo.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento de condicionamiento Pavloviano es un protocolo de entrenamiento de condicionamiento de miedo contextual.
- 35
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el protocolo usado para entrenamiento en masa y espaciado induce memoria de una tarea experimental específica.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que procedimiento de condicionamiento Pavloviano es condicionamiento Pavloviano olfativo.
- 40
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dichos animales no humanos son Drosophila y ARN se extrae de tejido de cabezas de dicha Drosophila.

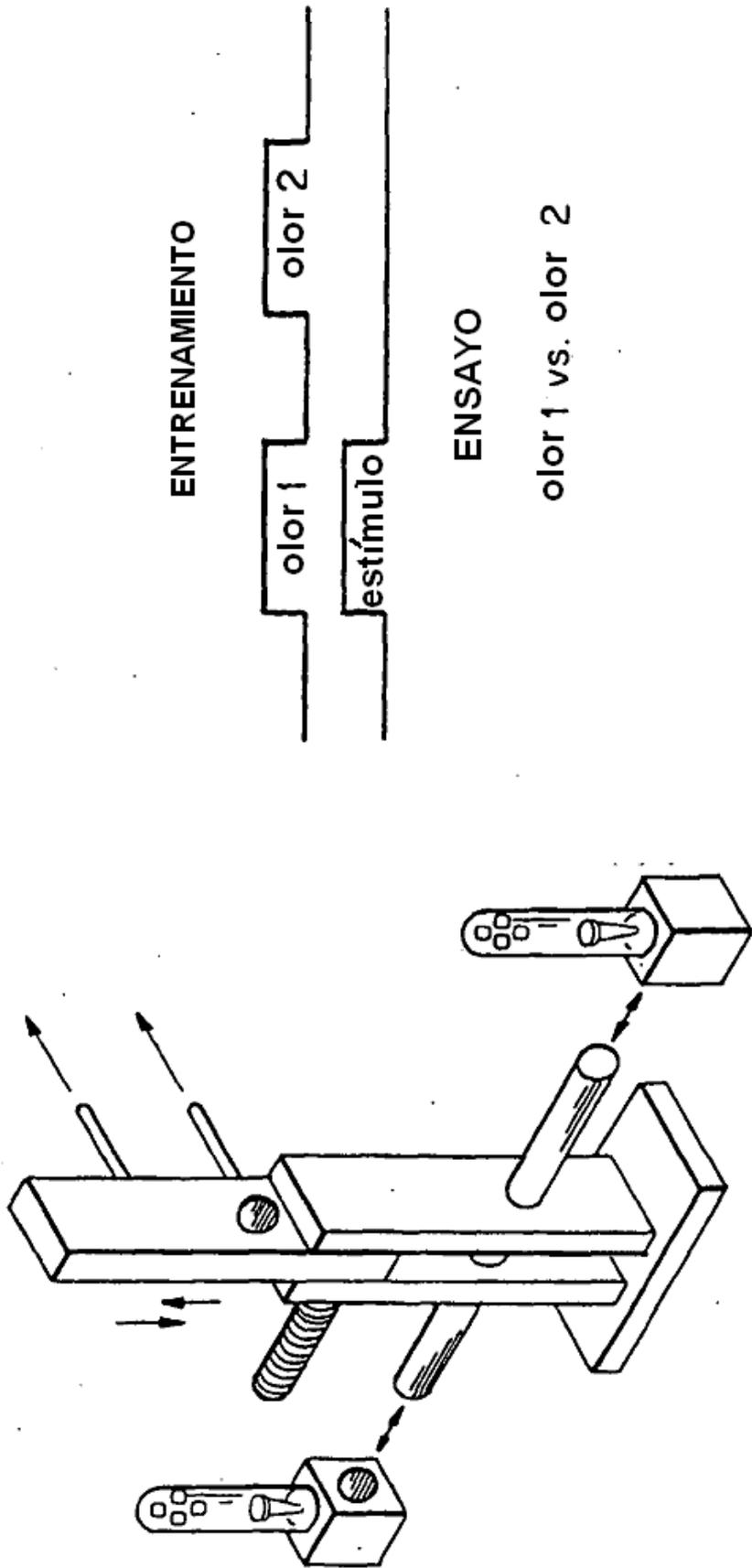
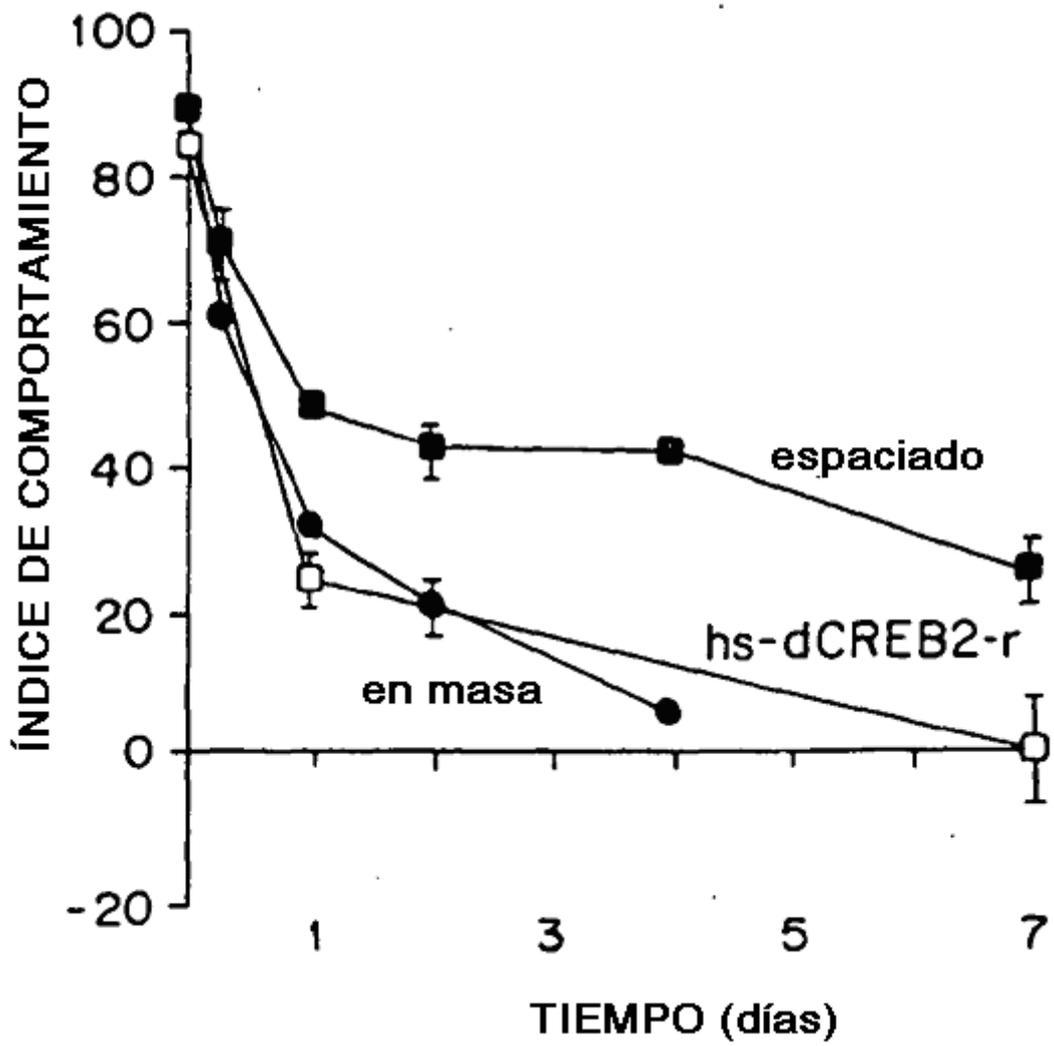
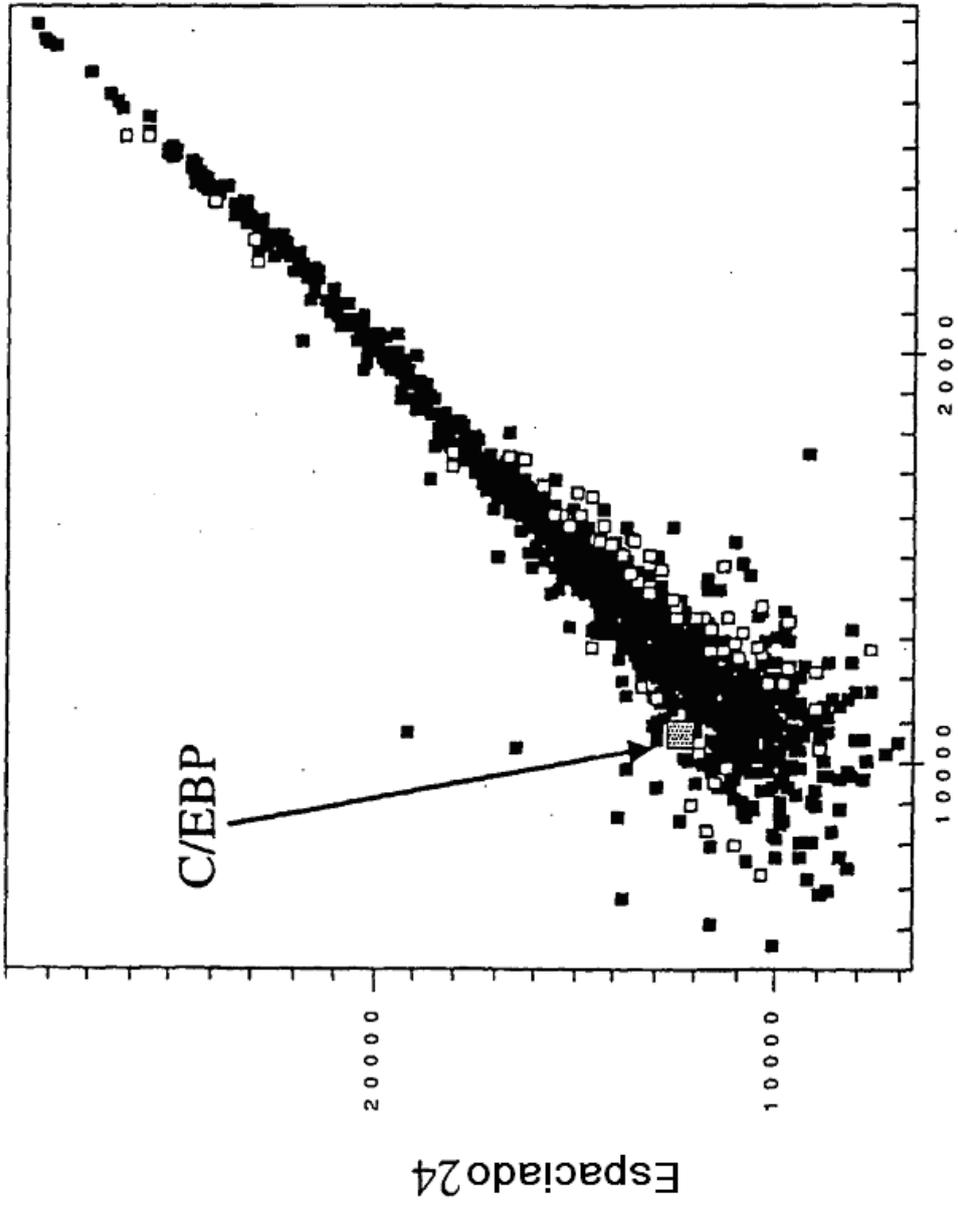


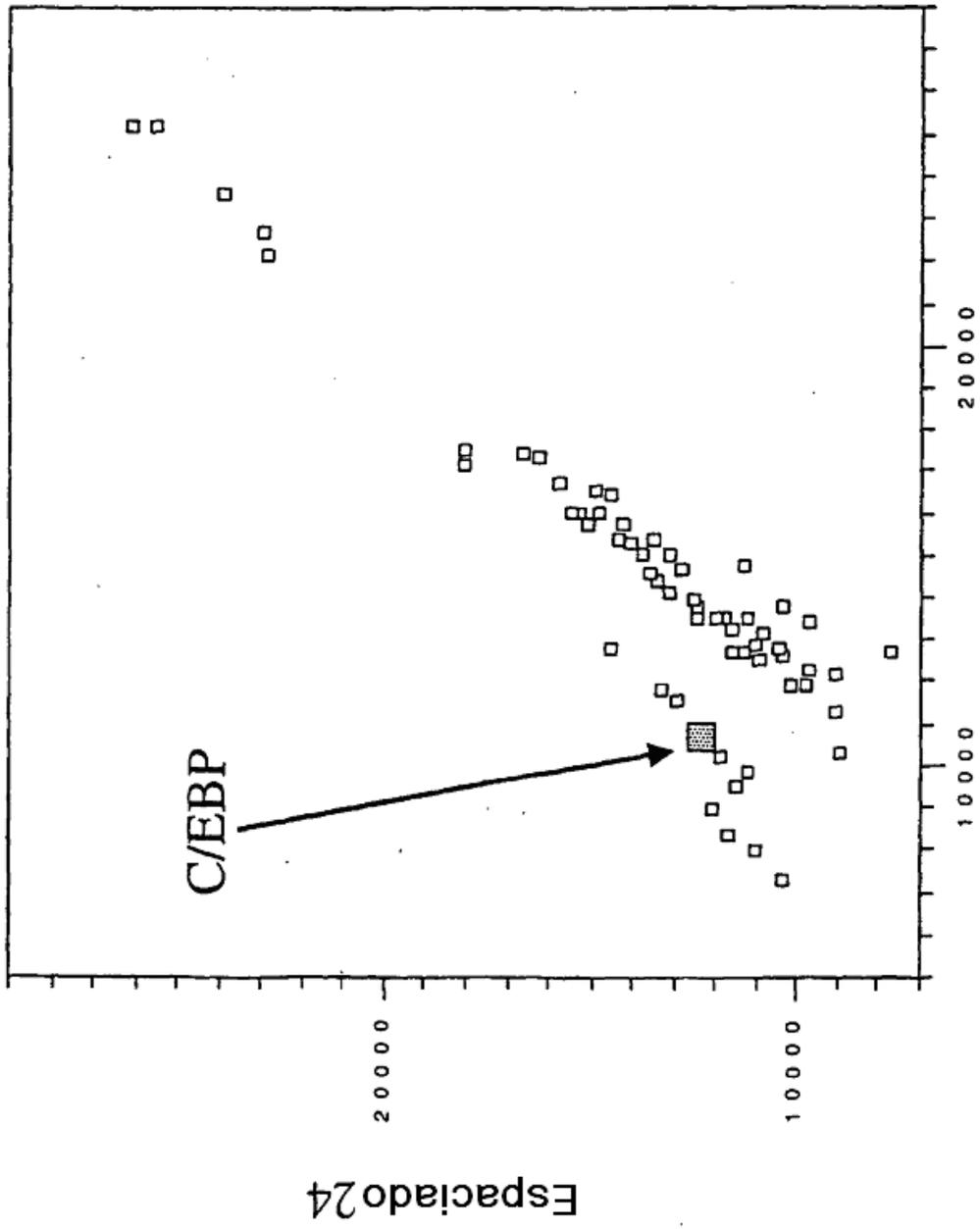
FIG. 1





En masa 24

Fig. 4A



En masa 24

Fig. 4B

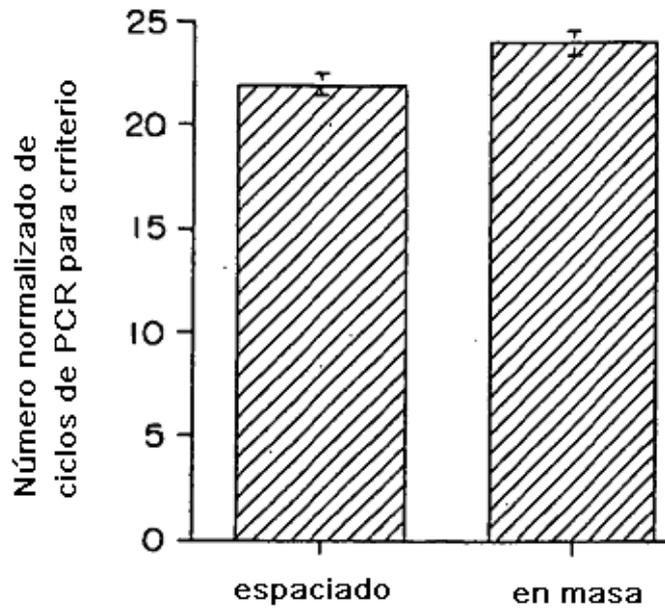


FIG. 5

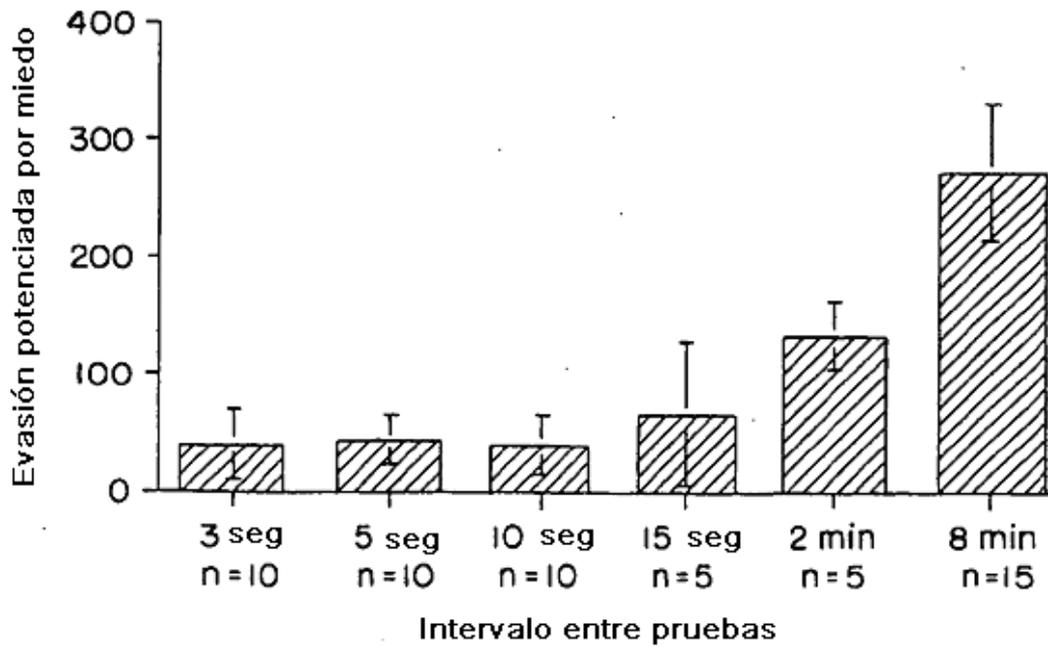


FIG. 6

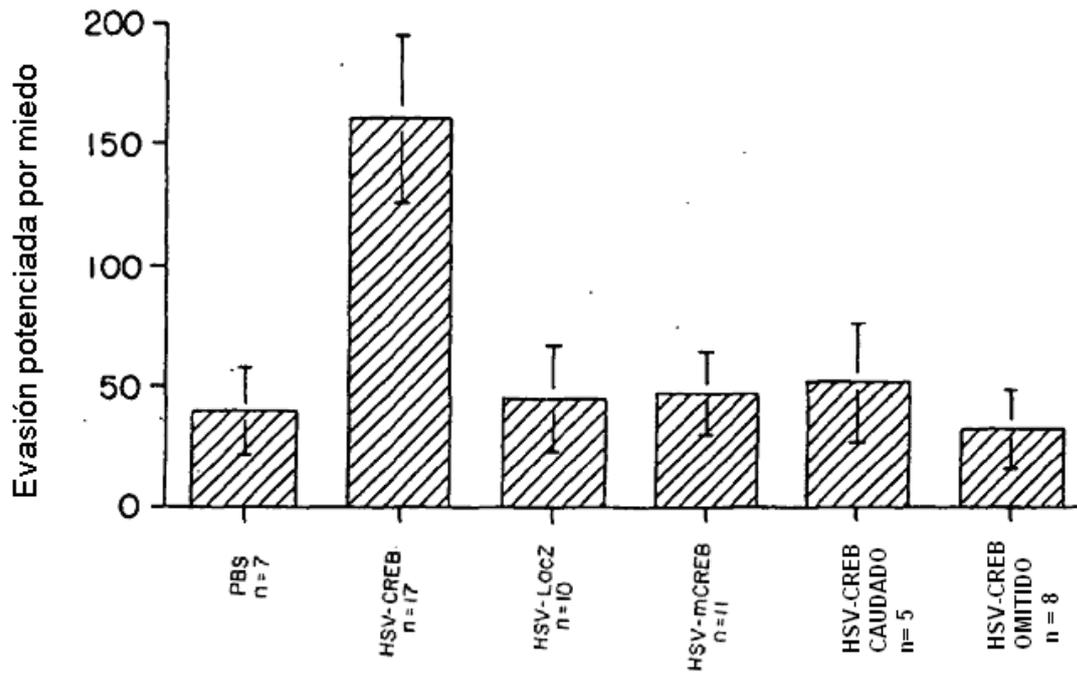


FIG. 7

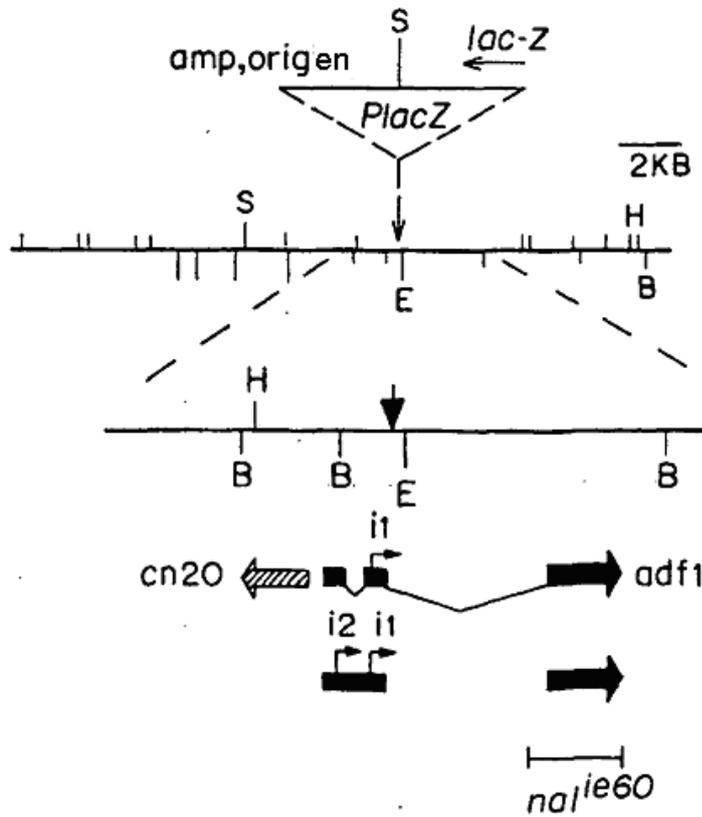


FIG. 8