

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ROL DEL CANAL DE POTASIO *SLOWPOKE* EN EL CONTROL DE LA
RITMICIDAD COMPORTAMENTAL EN *DROSOPHILA*

AUTOR: MARÍA DE LA PAZ FERNÁNDEZ

DIRECTOR: DRA. MARÍA FERNANDA CERIANI

DIRECTOR ASISTENTE: DRA. LIDIA SZCZUPAK

CONSEJERO: DR. LUIS QUESADA ALLUÉ

LUGAR DE TRABAJO: FUNDACIÓN INSTITUTO LELOIR

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

AÑO 2007

ROL DEL CANAL DE POTASIO *SLOWPOKE* EN EL CONTROL DE LA RITMICIDAD
COMPORTAMENTAL EN *DROSOPHILA*

AUTOR

Lic. María de la Paz Fernández

DIRECTOR

Dra. María Fernanda Ceriani

DIRECTOR ASISTENTE

Dra. Lidia Szczupak

CONSEJERO

Dr. Luis Quesada Allué

ROL DEL CANAL DE POTASIO *SLOWPOKE* EN EL CONTROL DE LA RITMICIDAD
COMPORTAMENTAL EN *DROSOPHILA*

JURADO:

Dr. Arturo Romano

Dr. Pablo Wappner

Dr. Marcelo Yanovsky

ROL DEL CANAL DE POTASIO *SLOWPOKE* EN EL CONTROL DE LA RITMICIDAD COMPORTAMENTAL EN *DROSOPHILA*

RESUMEN

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la actividad del canal de potasio *slowpoke* es esencial en la propagación de la información río abajo del reloj circadiano en *Drosophila*. Una línea con una mutación nula en *slo* que presenta un severo grado de arritmicidad comportamental se utilizó para estudiar los efectos de la falta del canal en los distintos grupos neuronales que están involucrados en el control rítmico del comportamiento. Los experimentos presentados demuestran que las alteraciones en la función neuronal originadas por la mutación en *slo* no alteran el funcionamiento del grupo más importante de neuronas marcapasos, las NLVps, pero provocan la desincronización de los osciladores dorsales en ausencia de claves ambientales, lo que sugiere que el canal es un factor esencial en la salida de información desde el reloj. Además, la falta de *slo* afecta no sólo la acumulación del único factor sincronizador conocido, el neuropéptido PDF, sino la morfología de las terminales axonales de las neuronas del reloj. Mediante la utilización de distintas líneas transgénicas se demuestra que la expresión del canal en sistema nervioso es suficiente para rescatar los defectos circadianos de la mutación en *slo*. Más aún, que la alteración de la excitabilidad neuronal mediada por SLO específicamente en las neuronas del reloj provoca arritmicidad comportamental.

Palabras clave: ritmos circadianos, *Drosophila*, canal de potasio, osciladores moleculares, comportamiento.

ROLE OF THE POTASSIUM CHANNEL *SLOWPOKE* IN THE CONTROL OF
BEHAVIORAL RHYTHMICITY IN *DROSOPHILA*

ABSTRACT

This work shows that activity of the potassium channel *slowpoke* is essential for transmitting information downstream of the *Drosophila* circadian clock. Flies exhibiting a distinctive arrhythmic phenotype due to a null mutation in *slo* were used to study the effects of the lack of this channel in specific neuronal populations involved in circadian control of behavior. Experiments presented along this thesis show that although altered neuronal function associated with the null mutation does not impair the functioning of the most important pacemaker neurons, sLN_vs, it does result in loss of synchronization of dorsal oscillators in the absence of environmental cues, strongly suggesting that *slo* is involved in clock output pathways. Furthermore, *slo* mutation not only impairs the accumulation of the only known synchronizing factor, PDF, but the structure of the underlying circuit. Using different transgenic lines circadian defects triggered by the *slo* mutation are rescued by expression of the channel restricted to the CNS. Moreover, SLO mediated alterations in neuronal excitability restricted specifically to clock neurons also result in behavioral arrhythmicity.

Keywords: circadian rhythms, *Drosophila*, potassium channel, molecular oscillators, behavior.

*a mamá,
por la generosidad infinita.*

*a Sebastián,
por el refugio.*

*por haber celebrado como propios
los momentos buenos
y desdramatizado tanto
y tan efectivamente los malos.*

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que en estos años ayudaron, directa o indirectamente, a que esta historia haya logrado llegar a algo parecido a *un final feliz* que es imposible que no me olvide de mencionar a alguien. Empiezo por la gente del laboratorio, los que compartieron conmigo las largas, a veces infinitas, cotidianidades de estos cinco años. Los que se alegraron conmigo cuando las cosas salieron bien y me apoyaron cuando mi relación con la ciencia indicaba que lo más adecuado hubiera sido dedicarme a hacer origami, bailar polca o fotografiar camarones en cautiverio.

A Fernanda, por haberme ayudado a encontrar mi lugar en el mundo. Por el desafío constructivo, por enseñar con inteligencia mediante palabras y acciones. Por la empatía, propiedad asombrosa, indefinible e infrecuente de algunas relaciones humanas que en este caso increíblemente logró sobrevivir a los embates del tiempo y los experimentos.

A los miembros del 109 presentes pero también a los pasados, como Carmencita y Santi, que estuvieron siempre. A Marta, Jimena, Ezequiel y Lorena, por las ayudas varias y variadas en estos años. A Caro, por la paciencia y la ternura, por haber tenido más confianza en mí de la que yo jamás me tuve. Por las catarsis mutuas, reincidentes y efectivas. A Esteban, por la ayuda desinteresada, y, sobre todo, por darme ánimo hasta el último segundo. A Ana y Axel, por la generosidad y el apoyo, por teñir de humor los momentos oscuros. Por el redescubrimiento colectivo del sentido común.

A los vecinos del 112 presentes y pasados. A Pablo, por los innumerables consejos. A Lachi, sin cuya maravillosa presencia el pasillo del primer piso nunca volverá a ser lo que fue. A Maxi, por ayudarme infinidad de veces, por escuchar y entender. A tanto habitué del pasillo que me salvó de apuros o me dio consejos en el momento oportuno. A Eduardo Castaño, por la lucidez. A Alejandro Schinder por leer y releer y siempre aportar algo interesante. A Diego Golombek, eterno *hado madrino* que a pesar de su sobrehumana agenda de público conocimiento encontró o inventó el tiempo para socorrerme todas y cada una de las veces en que lo necesité.

A mis amigas, por ser una prueba viviente de que ni el tiempo ni la distancia erosionan las cosas que valen la pena. A Julieta, Natalia y Pilar, por el humor y la paciencia, por

recordarme permanentemente el orden de prioridades de las cosas. A Clara, sin cuya compañía inmemorial no me imagino la vida.

A mi familia. A los tíos y Juli; Naná, Felipe y la Tata, por entender lo implícito, por recibirme siempre con algo rico y los brazos abiertos. Por la incondicionalidad, porque la verdad les hubiera dado igual que me dedicara al origami o la polca si eso me hacía feliz (no así a los camarones en cautiverio).

A Fede, por ayudarme tanto tantas veces y haberse transformado en hermano mayor. Por arreglar siempre todo lo que rompo, lo tangible y lo intangible, y quererme igual.

A Guada, por la ayuda con Sofi y con la vida. Por el reservorio de anécdotas maravillosas y el lenguaje en común. Por el viaje a España en el peor momento de la tesis que resultó ser el mejor posible.

A mamá, especie milagrosa de meta-madre transgeneracional que comparto con varios cientos de marplatenses pequeños y no tanto que literalmente la ovacionan por las calles. Por ser la materialización de la integridad, el amor y la coherencia, bálsamo reparador entre tanto disparate que uno ha heredado. Porque quienes tienen el placer de conocerla saben bien que la sola enumeración de los motivos por los que le estoy agradecida me tomaría, al menos, otros largos cinco años.

A Seba, por soportar estoicamente tantas charlas de ciencia cuando hubiera preferido hablar de cine. Por darme una copa de vino y hacerme llorar de la risa cada vez que me desmoronaba. Por recordarme todos los días cuales son las cosas que importan en la vida y disfrutarlas conmigo.

A Sofi, por la paciencia ante los cientos de horas de juegos y dibujos adeudadas. Por la ternura, el humor y la complicidad. Por ser tan increíblemente maravillosa. Porque su risa puede conjurar hasta los momentos más sombríos, y su existencia llena de magia la mía.

They who dream by day are cognizant of many things that escape those who dream only by night.

Edgar Allan Poe

I know the night is not the same as the day: that all things are different, that the things of the night cannot be explained in the day, because they do not then exist, and the night can be a dreadful time for lonely people once their loneliness has started.

"A Farewell To Arms," Ernest Hemingway

ÍNDICE

ÍNDICE	12
GLOSARIO y ABREVIATURAS	16
1.- Glosario de términos de genética de <i>Drosophila</i>	16
2.- Abreviaturas	17
INTRODUCCIÓN	19
El reloj circadiano.....	19
El descubrimiento del reloj	22
El círculo virtuoso.....	25
El sistema circadiano de <i>Drosophila</i>	28
Del núcleo a la membrana.....	32
La actividad eléctrica como componente del sistema circadiano.....	33
Los canales de potasio y su rol en la célula	35
Los canales de potasio dependientes de calcio y voltaje -BK-	37
<i>slo</i> se encuentra bajo el control del reloj circadiano.....	42
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVOS.....	45
RESULTADOS	46
CAPÍTULO 1.- Las más importantes <i>salidas</i> del reloj circadiano están alteradas en ausencia de <i>slowpoke</i>	47
1.1.- Un mutante nulo en <i>slowpoke</i> es arrítmico en actividad locomotora.	47
1.2.- El defecto comportamental es específico de la mutación en el canal.....	50
1.3.- La falta de expresión de <i>slo</i> en el sistema nervioso central (SNC) es responsable de la arritmicidad comportamental.....	55
1.4.- El ritmo de emergencia del pupario también esta afectado en <i>slo</i> ⁴	60
CAPÍTULO 2.- La mutación en <i>slo</i> afecta diferencialmente los osciladores circadianos.	64

PARTE I.- El funcionamiento del reloj molecular no está alterado en ausencia de <i>slo</i>	65
2.1.- La mutación en <i>slo</i> no afecta al oscilador M	65
2.2.- La sincronización bilateral no está afectada en <i>slo</i> ⁴	69
2.3.- Las oscilaciones moleculares persisten aún tras varios días en libre curso.....	70
PARTE II.- Las manifestaciones comportamentales de los osciladores M y E están afectadas diferencialmente.....	73
2.1.- La mutación en <i>slo</i> impide la consolidación de la actividad en la fase diurna.....	73
2.2.- En condiciones de fotoperíodo ampliado se evidencia la existencia del oscilador E .	81
PARTE III.- Los grupos neuronales que componen el oscilador E están desincronizados en ausencia de claves ambientales.	86
CAPÍTULO 3.- El circuito PDF.....	93
PARTE I.- La señal de PDF está disminuida en ausencia de <i>slo</i>	94
PARTE II.- Las alteraciones en la señal de PDF se deben a aberraciones en la estructura del circuito.	103
CAPÍTULO 4.- El circuito PDF presenta cambios plásticos regulados circadianamente.	105
4.1.- Existen cambios plásticos en la morfología del circuito circadiano.	107
4.2.- La plasticidad estructural persiste en condiciones constantes.	110
4.3.- La remodelación circadiana del circuito depende de la presencia de un reloj funcional.	112
CAPÍTULO 5.- Expresión y desregulación de <i>slowpoke</i> en el circuito circadiano.....	115
PARTE I.- SLO se expresa en estructuras relevantes para el control del comportamiento...117	
5.1.- Localización del canal.....	117
5.2.- El silenciamiento de <i>slo</i> afecta la ritmicidad en actividad locomotora.....	125
PARTE II.- La sobreexpresión de <i>slo</i> altera específicamente las manifestaciones comportamentales de los osciladores M y E	128
5.1.- La expresión de <i>slo</i> restringida a las NLvps no rescata el fenotipo de <i>slo</i> ⁴	128
5.2.- La sobreexpresión de <i>slo</i> en una línea silvestre provoca arritmicidad.	129
ANEXOS	141

ANEXO 1.-	142
ANEXO 2.-	143
ANEXO 3.-	144
ANEXO 4.-	146
ANEXO 5.-	148
MATERIALES Y MÉTODOS	150
1.- Líneas de <i>Drosophila</i> empleadas	150
1.1.- Mantenimiento de <i>stocks</i>	150
1.2.- El sistema GAL4/UAS	150
1.3.- Líneas recombinantes	151
1.4.- Líneas de moscas utilizadas.	152
2.- Generación de líneas transgénicas.....	153
3.- Análisis de actividad locomotora	154
3.1.- Análisis automatizado de actividad locomotora	154
3.2.- Eclosión	157
3.3.- Análisis Estadísticos	157
4.- Inmunohistoquímica y análisis de imágenes	158
4.1.- Inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas.....	158
4.2.- Curvas de tiempo	160
4.3.- Cuantificación de las ramificaciones axonales de las NLvps	161
4.4.- Microscopía y procesamiento de imágenes	162
BIBLIOGRAFÍA.....	165

GLOSARIO y ABREVIATURAS

1.- Glosario de términos de genética de *Drosophila*

- ❖ Alelo hipomorfo: Alelo con una mutación que ocasiona una pérdida parcial de la función del gen.
- ❖ Alelo nulo: Alelo con una mutación que ocasiona una inactivación funcional de un gen (sinónimo: *alelo amorfo*).
- ❖ Balanceador: Cromosoma que contiene marcadores de simple detección y múltiples inversiones que inhiben la recombinación homóloga.
- ❖ Deficiencia: Rearreglo genético en el que una porción del cromosoma es escindida.
- ❖ Entrenamiento: Acoplamiento de un oscilador autónomo al *Zeitgeber*.
- ❖ Inversión: rearreglo genético en donde parte de la secuencia normal del cromosoma es invertida.
- ❖ Rescate de un fenotipo: Restauración del fenotipo salvaje en una línea mutante.
- ❖ Semiletal: Alelo que se caracteriza por generar alta mortalidad en la población cuando se encuentra en homocigocis.
- ❖ *Zeitgeber*: palabra alemana que significa “dador de tiempo”.
- ❖ ZT: Tiempo del *Zeitgeber*. Indica la cantidad de horas transcurridas desde el inicio de la señal ambiental

- ❖ CT: Tiempo circadiano. Escala temporal que cubre un período completo en una oscilación circadiana. El punto inicial se define arbitrariamente, aunque en *Drosophila* habitualmente indica la cantidad de horas transcurridas desde el inicio del día subjetivo, normalizadas al período endógeno de cada individuo.

2.- Abreviaturas

NLvps: neuronas laterales ventrales pequeñas.

NLvgs: neuronas laterales ventrales grandes.

ND1: neuronas dorsales 1.

ND2: neuronas dorsales 2.

ND3: neuronas dorsales 3.

NLds: neuronas laterales dorsales.

PI: *pars intercerebralis*.

LO: lóbulo óptico.

GAP: gráfico de actividad promedio.

FFT: *fast fourier transformation*.

PL: *pars lateralis*.

PDF: *pigment dispersing factor*.

SLO: *slowpoke*.

INTRODUCCIÓN

El reloj circadiano

De las adaptaciones de los seres vivos a las variaciones ambientales del planeta, la aparición de un reloj endógeno capaz de acoplarse a la alternancia entre el día y la noche es una de las más antiguas y conservadas a través de la evolución. Estos *osciladores biológicos*, diversos y similares a la vez, proveen a los organismos de una estructura temporal que les permite optimizar su energía y recursos en función del momento del día, ese fragmento de tiempo caprichosamente establecido por la velocidad de rotación de la Tierra.

Organismos tan diversos como procariotas (Johnson and Golden, 1999), hongos (Brunner and Schafmeier, 2006), plantas (Yanovsky and Kay, 2002), moscas (Hall, 2005), roedores (Reppert and Weaver, 2002) y seres humanos (Aschoff, 1976) comparten los engranajes básicos de este mecanismo interno de medición del paso del tiempo. Mientras que los unicelulares representan *relojes autocontenidos*, la diversificación del sistema circadiano en los multicelulares permite una respuesta coordinada que se ajusta a las funciones y necesidades específicas de los distintos tejidos (Bell-Pedersen et al., 2005). En estos organismos el sistema se organiza sobre la base de múltiples niveles interrelacionados que van desde los mecanismos bioquímicos que componen las oscilaciones moleculares hasta la ritmicidad comportamental, atravesando una enorme variedad de funciones fisiológicas que poseen un patrón temporal.

Los relojes biológicos pueden manifestarse en *ritmos* de distintos *períodos*. Aquellos que evolucionaron como una adaptación a los ciclos de día y noche tienen un período de 24 horas y se denominan *ritmos circadianos*. Existen, sin embargo, relojes biológicos que controlan procesos cuyos períodos son extremadamente distintos. Los *ritmos infradianos* tienen un período menor a 24 horas, como el ritmo cardíaco, cuyo período es aproximadamente un segundo. Los ritmos *ultradianos* son aquellos con períodos mayores a 24 horas, como el ciclo menstrual o el ciclo de hibernación. De

todos ellos, los ritmos circadianos son los más ampliamente distribuidos en la naturaleza. La ventaja adaptativa que representa el poseer un reloj funcional ha sido demostrada experimentalmente en cianobacterias (Ouyang et al., 1998) y en *Drosophila* (Beaver et al., 2002).

Dentro de las propiedades que definen a estos ritmos la más fundamental es el hecho de que son *endógenos*: su período persiste prácticamente inalterable aún en ausencia de claves ambientales. En estas condiciones el período no es exacta sino aproximadamente de 24 horas, *cercano a un día* (lat. *circa*, casi; *dies*, día). En general, los organismos tienen períodos que varían entre 23,5 y 24,5 horas según la especie, y existen incluso pequeñas variaciones entre distintos individuos de la misma especie (Aschoff, 1960; Pittendrigh and Caldarola, 1973; Pittendrigh and Daan, 1974) . Actualmente se sabe que esta ritmicidad persiste días, semanas e incluso meses en ausencia de factores sincronizadores.

Dado que otra de las propiedades esenciales del reloj circadiano es su capacidad de oscilar en fase con los factores sincronizadores, mientras están sometidos a los ciclos ambientales los organismos tienen un período de *exactamente* 24 horas. Cualquier factor ambiental capaz de sincronizar al reloj se llama *Zeitgeber*, que significa *dador de tiempo*. El más importante de todos ellos es la luz, aunque también otros factores, como la temperatura, pueden establecer una dicotomía día/noche capaz de *entrenar* al reloj circadiano. Se sabe, además, que el entrenamiento mediado por luz habitualmente prevalece sobre los demás cuando los organismos se exponen a claves contradictorias.

El sistema circadiano tiene tres componentes principales; las *vías de entrada* de información desde el ambiente, el *oscilador*, formado por células marcapasos que generan y mantienen las señales circadianas y las *vías de salida* desde el oscilador a los distintos sistemas efectores (Eskin, 1979; Moore, 1996; Morin et al., 1994; Morin and Allen, 2006). Todos estos componentes pueden ser localizados tanto en células individuales, como fue demostrado tanto en unicelulares (Golden et al., 1997) y plantas (Thain et al., 2000), como en varios tejidos animales, donde se encontraron relojes celulares que funcionan de manera autónoma (Balsalobre, 2002; Giebultowicz, 2001; Plautz et al., 1997; Schibler et al., 2003; Whitmore et al., 2000) existen *centros*

marcapasos en el cerebro que coordinan tanto los relojes periféricos como la ritmicidad comportamental (Hall, 2005; Reppert and Weaver, 2001). Tal como se describirá mas adelante, en todos los organismos el mecanismo de los osciladores, sean *centrales* o *periféricos*, se basa en el acoplamiento entre ciclos de regulación negativa de la transcripción génica. En la figura I.1 se muestran algunas de las múltiples salidas del reloj circadiano en distintas especies.

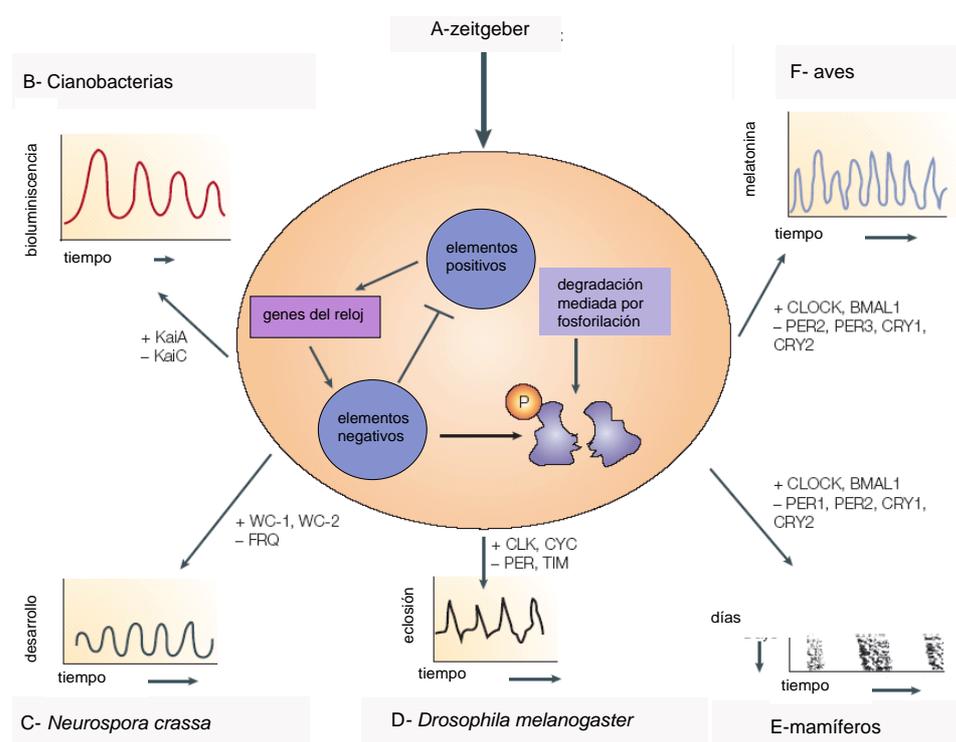


Figura I.1. Las distintas salidas de los relojes circadianos se basan en un mecanismo común.

La mayor parte de los osciladores circadianos consiste en ciclos positivos y negativos de transcripción génica. En ellos, los “elementos positivos” activan la expresión de los genes del reloj. A su vez, algunos de estos codifican para “elementos negativos” que inhiben la acción de los elementos positivos. (B-F) Ejemplos de componentes positivos (indicados con +) en algunos organismos modelo son: KaiA, WHITE-COLLAR-1 (WC-1), WHITE COLLAR-2 (WC-2), CLOCK (CLK), CYCLE (CYC) and “brain and muscle Arnt-like protein” (BMAL1). Ejemplos de elementos negativos (indicados con -) son: KaiC, FREQUENCY /FRQ, *period* (PER), *timeless* (TIM) y *cryptochrome* (CRY). En cada organismo se muestra un ejemplo de una *salida* del reloj circadiano. Los osciladores moleculares reciben información del ambiente y envían señales sincronizadoras mediante vías efectoras aún no conocidas al resto del organismo. En cianobacterias (B) el registro se obtiene fusionando promotores de genes del reloj a un gen reportero (en este caso luciferasa) para monitorear al patrón de bioluminiscencia. En *Neurospora crassa* (C) se monitorea la ritmicidad en el desarrollo de conidiosporas asexuales. En moscas (D), mamíferos (E) y aves (F) la ritmicidad comportamental se puede estudiar utilizando un dispositivo automatizado. Además, en moscas se puede analizar el ritmo de emergencia del pupario (Bell-Pedersen et al., 2005).

El descubrimiento del reloj

Existen reportes sobre el estudio de los ritmos biológicos que se remontan al tiempo de Alejandro Magno, en los que se describe cómo las plantas de tamarindo elevan sus hojas hacia la luz durante el día y las retraen por la noche. Un astrónomo francés del siglo XVIII, J. de Mairan, retomó estas observaciones y profundizó el estudio de este fenómeno trabajando con la planta *Mimosa pudica*. De Mairan comprobó que el movimiento de las hojas en ciclos de luz y oscuridad persistía cuando dejaba a las plantas por algunos días en “condiciones constantes”, al encerrarlas en un armario donde no podían percibir la luz. Estos resultados fueron publicados en 1729, en una publicación que es considerada como el primer artículo científico sobre ritmos circadianos. En este trabajo ya se sugería que debía existir *un reloj endógeno* con un período cercano a 24 horas.

En los años ´60, cuando la cronobiología era aún un campo joven y pequeño, el principal motivo de debate era precisamente si la persistencia de la ritmicidad en condiciones constantes obedecía realmente a un mecanismo endógeno o a factores aún no identificados relacionados con la rotación de la Tierra (Brown, 1960). En una conferencia llevada a cabo en Cold Spring Harbor, Colin Pittendrigh sentó las bases teóricas del estudio de los ritmos circadianos enumerando las que consideró como sus propiedades esenciales, entre las cuales el ser un proceso endógeno ocupaba un lugar fundamental (Pittendrigh, 1960). Sin embargo, a pesar de que ya en ese momento sus argumentos resultaban convincentes para la mayoría de los investigadores del campo, la denominación *circadianos* prevaleció sobre la de *endógenos* precisamente para evitar esta controversia original respecto del origen endógeno u exógeno de la persistencia de la ritmicidad en condiciones constantes (Roenneberg y Merrow, 2005).

A través de una serie de elegantes experimentos realizados a lo largo de varias décadas, Pittendrigh estableció los conceptos teóricos fundamentales que hoy permiten hablar de la cronobiología como una *teoría científica*. Al definir las propiedades de los ritmos circadianos determinó que además de ser endógenos y

sincronizables, son ubicuos y tienen oscilaciones autosustentables, lo que significa que las células o tejidos que componen el reloj circadiano deben tener propiedades de *marcapasos*. Además, estableció que estos ritmos son innatos, se encuentran en todos los niveles de organización de un organismo (Pittendrigh, 1960) y están compensados por temperatura, ya que el reloj sigue funcionando normalmente en un rango que en la mayoría de los organismos va de 18°C a 28°C (Pittendrigh, 1960).

El consenso respecto de la naturaleza endógena del reloj circadiano inevitablemente derivaba en una pregunta fundamental: ¿dónde, si es que en algún lugar discreto, se ubicaba físicamente el sistema circadiano? Aunque a principios del siglo XX, lesionando o extirpando porciones del cerebro de ratas, Curt Ritche había sugerido que existían regiones hipotalámicas responsables de la ritmicidad circadiana, no fue hasta la década del '70 que pudo demostrarse experimentalmente que el reloj residía en una región específica del cerebro. Basándose en la hipótesis de que la luz ingresaría a esa región a través de una vía proveniente de los ojos, se les inyectó un marcador y se comprobó la existencia de una conexión neuronal directa hasta el hipotálamo, en particular a dos núcleos muy pequeños que se ubican encima del quiasma óptico y se denominan núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Posteriormente se demostró que la lesión de estos núcleos provoca la pérdida de la ritmicidad comportamental (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). Sin embargo, la demostración más clara de la función circadiana de los NSQ fue la restauración de la ritmicidad mediante su trasplante a animales cuyos núcleos habían sido lesionados (Ralph et al., 1990).

Fue también en los años '70 que el trabajo de Seymour Benzer y sus colaboradores posibilitó uno de los saltos conceptuales más importantes dentro de la cronobiología, ya que es en gran medida gracias al resultado de sus investigaciones que actualmente se acepta que existen mecanismos genéticos que subyacen al comportamiento animal en general, y a los ritmos circadianos en particular. Benzer y sus colaboradores llevaron a cabo un *screen* en el que comparaban el período en el ritmo de emergencia del pupario de distintas líneas de *Drosophila pseudoobscura*. Este trabajo representa un ejemplo paradigmático de cómo el azar puede en ocasiones determinar el devenir de una disciplina científica, ya que en este *screen* se identificaron tres líneas cuyos fenotipos representaban cada una de las alteraciones comportamentales esperables al mutagenizar un *gen del reloj*: una línea de período mayor a 24 horas (τ :29), una de

período menor (τ :19), y una completamente arrítmica (Konopka y Benzer, 1971). Trabajos posteriores localizaron la alteración genética de estas mutantes en las bandas 3B1-2 del cromosoma X y permitieron determinar que estas tres líneas portaban alelos diferentes del mismo gen, que fue denominado *period* (*per*) (Bargiello et al., 1984; Rosbash y Hall, 1985; Young et al., 1985). Al aislar el ADN de esa región y traducirlo *in vitro*, se obtuvo la proteína PER, que actualmente se considera uno de los componentes esenciales del reloj molecular (Jackson et al., 1986).

El artículo seminal de Konopka y Benzer demostró por primera vez que la función de un único gen podía modular la ritmicidad comportamental. La noción de que debía existir una interrelación de componentes moleculares capaces de generar un oscilador había sido formulada varios años atrás (Wever, 1964). Según este modelo, denominado *hipótesis del oscilador biológico*, debían existir proteínas cuya función oscilara cada 24 horas, posiblemente alcanzando umbrales a partir de los cuales comenzaba su actividad. Incluso Pittendrigh consideraba que la síntesis de proteínas debía jugar un rol fundamental en un ciclo de regulación negativa que constituyera un oscilador¹. Sin embargo, no fue hasta que *period* fue encontrado y caracterizado que se materializó un modelo molecular concreto basado en ciclos de regulación transcripcional y traduccional.

Este trabajo, sumado al conjunto de experimentos comportamentales realizados por Pittendrigh, colaboró en la consolidación de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para estudiar los mecanismos genéticos que subyacen al reloj circadiano. La utilización de líneas de *Drosophila* había comenzado a principios del siglo XX, cuando Thomas Hunt Morgan (Morgan, 1910) decidió emplearlas para estudiar el fenómeno de la herencia. Desde entonces, su intensivo uso como modelo genético en los más diversos campos de la biología ha dado como resultado el enorme repertorio de herramientas disponibles en la actualidad. La disponibilidad de líneas mutantes en bancos de *stocks* abiertos a toda la comunidad científica, la facilidad para generar líneas transgénicas mediante el método de transformación de la línea germinal (Rubin

¹-The Darwinian Demon has certainly had plenty of physiologic oscillations to work with, because his commonest device in installing regulators –from the control of heartbeat to that of protein synthesis- is negative feedback. And one of the tendencies of such feedback systems is to oscillate. (Pittendrigh, The Harvey Lectures, 1961).

y Spradling, 1982; Spradling y Rubin, 1982) y la implementación del sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993) (ver materiales y métodos) hacen que en *Drosophila* sea posible, por ejemplo, expresar en forma específica de tejido un gen de interés, silenciar su expresión, eliminar grupos de células mediante sobreexpresión de genes proapoptóticos, generar nuevos alelos por movilización o escisión de transposones e incluso estudiar la actividad de una subpoblación neuronal mientras un animal realiza un ensayo comportamental (Venken y Bellen, 2005).

El círculo virtuoso

El reloj molecular, conformado por ciclos antifásicos de transcripción génica, es el nivel más fundamental al cual se generan las oscilaciones circadianas. Los componentes básicos que lo integran están altamente conservados, y la mayor parte de lo que actualmente se sabe sobre los mecanismos del oscilador molecular en mamíferos proviene de estudios en *Drosophila* (Allada et al., 2001; Dunlap et al., 1999; Reppert y Weaver, 2000; Stanewsky, 2003; Young y Kay, 2001). Este mecanismo se basa en el acoplamiento entre dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa que se regulan en forma cruzada (FIGURA I.2). Inicialmente, un heterodímero formado por los factores de transcripción dCLOCK (CLK) y CYCLE (CYC) activa la transcripción de los genes *period* (*per*) y *timeless* (*tim*). Los ARN mensajeros de *per* y *tim* comienzan a acumularse en el citoplasma, y alcanzan una concentración máxima al anoecer (ZT 14-16) (Hardin et al., 1992; Reddy et al., 1984; Sehgal et al., 1995). Durante las horas de luz, a pesar de que la cantidad de ARNm aumenta gradualmente, las proteínas PER y TIM no se acumulan debido a que la unión de TIM con el criptocromo CRY, que es sensible a la luz, resulta en su degradación (Ceriani et al., 1999; Myers et al., 1996; Yang et al., 1998). PER es inestable mientras no se encuentra heterodimerizado con TIM, y es en esta condición cuando su fosforilación por parte de la kinasa DOUBLETIME (DBT) resulta en su degradación por el proteosoma (FIGURA I.2.A) (Price et al., 1998).

En las primeras horas de la noche se alcanzan niveles de PER y TIM tales que permiten su dimerización, y el complejo PER-TIM-DBT es entonces translocado al núcleo en un proceso dependiente de fosforilación (FIGURA I.2.B) (Saez y Young,

1996). Una vez allí, el dímero PER-TIM se une a dCLK e inhibe a este activador transcripcional, con lo cual PER y TIM reprimen su propia transcripción (aunque existen evidencias que sugieren que sólo PER cumple un rol esencial en este proceso) (Darlington et al., 1998; Nawatheatan y Rosbash, 2004). Este ciclo concluye en las primeras horas del día siguiente, cuando la presencia de luz determina la degradación de TIM mediada por CRY.

El segundo ciclo de retroalimentación está compuesto por los genes *vri* y *pdp1* (Blau y Young, 1999; Glossop et al., 1999; McDonald y Rosbash, 2001). Hacia el final del día y comienzo de la noche, el heterodímero formado por dCLK y CYC activa la transcripción de los genes *vri* y *pdp1*. Inicialmente, VRI se acumula y al translocarse al núcleo inhibe la transcripción de *dClk*. Hacia el final de la noche, PDP1, cuya acumulación ocurre más lentamente, es translocado al núcleo y compite con *vri* por el sitio de unión con *dClk*, resultando en la liberación de la represión y consiguiente activación de la transcripción de CLK. Finalmente, una vez que termina la represión mediada por PER, el dímero CLK/CYC es capaz de iniciar la transcripción tanto de *per*, y *tim* como de *vri* y *Pdp1* y el ciclo comienza nuevamente (Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003). En la figura **I.2.C** se muestran las oscilaciones antifásicas entre algunos de los componentes esenciales del reloj molecular.

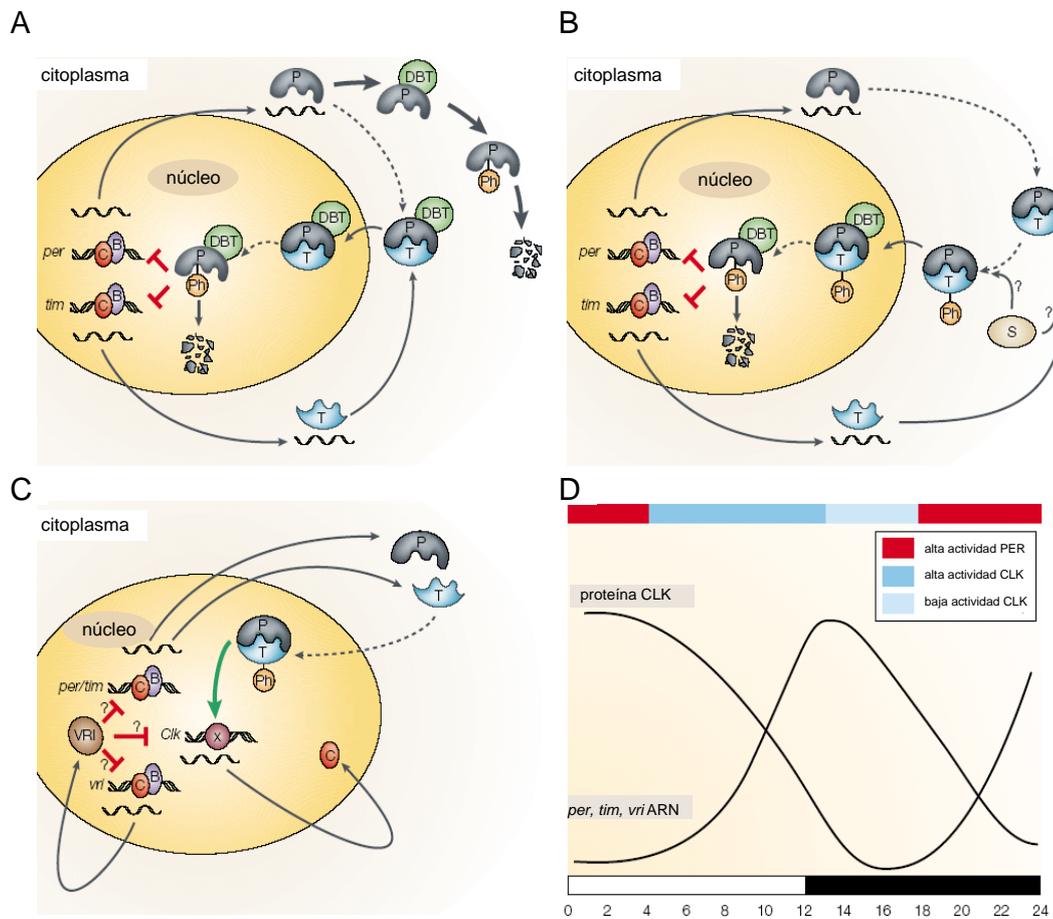


Figura 1.2. El reloj molecular de *Drosophila*. Los distintos paneles de la figura representan diferentes aspectos del reloj molecular. Las líneas punteadas indican los pasos en los que suelen ocurrir retrasos. (A) Modelo de la acumulación, función y degradación de PER, procesos dependientes tanto de DBT como de TIM. A pesar de que *per* y *tim* se activan coordinadamente a través de la unión de los factores de transcripción dCLK (C) y CYC (B, por su homólogo en mamíferos BMAL) a los elementos E-box que contienen sus promotores, los procesos de acumulación de PER (P) y TIM (T) no siguen la misma cinética. PER es inicialmente fosforilada por DBT, el ortólogo de *Caseína Kinasa 1*, y posteriormente degradada por el proteosoma. A pesar de esto, los niveles de PER aumentan gradualmente y comienza a acumularse en el citoplasma, uniéndose a TIM que bloquea la fosforilación mediada por DBT. Una vez en el núcleo TIM es eliminado del complejo PER/TIM/DBT permitiendo la represión transcripcional de *per* y *tim*. La fosforilación de PER por parte de DBT en el núcleo la degrada y de este modo vuelve a iniciarse el ciclo. (B) La translocación al núcleo del dímero PER/TIM es controlada por la actividad kinasa de SHAGGY (SGG) sobre TIM. (C) El segundo ciclo transcripcional de retroalimentación negativa. Las proteínas dCLK y VRI son producidas rítmicamente. En el núcleo, PER, o el dímero PER/TIM, promueven la transcripción de CLK mientras que *vri* es activado por CLK/CYC y reprimido por PER. Elevados niveles de VRI bloquean la expresión de *per* y *tim*. (D) Durante el día, *dClk* disminuye tanto a nivel de ARNm como de proteína, mientras que *vri* se acumula. Esto podría estar causando la acumulación máxima de *per*, *tim* y *vri* en la noche temprana, cuando las cantidades de *vri* son máximas y las de *dClk* mínimas. Luego de un tiempo el dímero PER/TM entra al núcleo y estimula la transcripción de *Clk* (Young y Kay 2001).

El sistema circadiano de *Drosophila*

El mecanismo molecular descrito anteriormente está presente en cada una de las células marcapasos que componen el sistema circadiano en las distintas especies. El clonado de *per* y *tim* (Myers et al., 1995; Zehring et al., 1984) y el desarrollo de anticuerpos contra las proteínas para las que estos genes codifican (Ederly et al., 1994; Myers et al., 1996) permitió detectar su expresión no solamente en varios grupos de neuronas del sistema nervioso de *Drosophila* sino también en otros tejidos, como los ojos, los ocelos, las antenas y las quetas del cuerpo y las patas (Hall, 1998; Helfrich-Forster, 1995; Helfrich-Forster et al., 1998; Helfrich-Forster, 2004). Si bien inicialmente se consideró que la expresión de *per* en la cabeza era esencial (Konopka et al., 1993), estudios posteriores revelaron que tanto los ojos como los ocelos eran prescindibles (Helfrich y Engelmann, 1987; Vosshall y Young, 1995; Zeng et al., 1994), demostrando que en realidad la ritmicidad comportamental depende exclusivamente de la expresión de *per* en el cerebro. En individuos adultos, *per* y *tim* se expresan tanto en células de la glía como en varios grupos neuronales. Las células gliales en general se encuentran en la proximidad de las arborizaciones de las neuronas del reloj y aunque parecen contribuir (Helfrich-Forster, 1995) no son suficientes para sostener la ritmicidad comportamental (Ewer et al., 1992).

Las cerca de 100 neuronas que integran el circuito circadiano en el cerebro del adulto² se dividen en seis grupos de simetría bilateral, fundamentalmente en base a su localización (FIGURA I.3). En una clasificación inicial se dividen en dos grandes grupos, las neuronas laterales (NLs), y neuronas dorsales (NDs)³ (Ewer et al., 1992; Frisch et al., 1994; Zerr et al., 1990). A su vez, las LNvs se dividen en tres grupos: las neuronas laterales dorsales (NLds), un grupo de aproximadamente 6 células por hemisferio, y las neuronas laterales ventrales, que se dividen en 4 neuronas grandes

²- En el cerebro de la larva, sólo las NLvps, las ND2 y dos de las células de las ND1 expresan PER y TIM (Kaneko et al., 1997; Kaneko and Hall, 2000).

³- Además de las NLs y NDs, se reportó que existen otras tres células en cada hemisferio que expresan TIM, las LPN (Kaneko and Hall, 2000), y recientemente se las involucró en la sincronización a ciclos de temperatura (Yoshii et al., 2002).

(NLvgs) y 4 pequeñas (NLvps) por hemisferio. Las neuronas dorsales consisten de 15 células que integran el grupo 1 (ND1), dos del grupo 2 (ND2) y aproximadamente 40 del grupo 3 (ND3). Recientemente esta clasificación se ha extendido y las ND1 se subdividen en 2 anteriores (ND1a) y 13 posteriores (ND1p) (Shafer et al., 2006). Tanto las neuronas dorsales como las laterales dorsales envían sus proyecciones hacia la *pars intercerebralis* (PI) (FIGURA I.3), una importante área neurosecretoria desde la que se ha propuesto que la ritmicidad se propaga al resto del organismo (Helfrich-Forster, 2005). Además de *per* y *tim*, se detectó expresión de otros genes del reloj en las NLs y NDs. Mediante inmunohistoquímica se encontró que en ambos grupos se expresan VRI (Blau y Young, 1999) y PDP1 (Cyran et al., 2003), y utilizando genes reporteros se detectó expresión de *Clk* (Cyran et al., 2003) y *cyc* (Paul Hardin, datos no publicados).

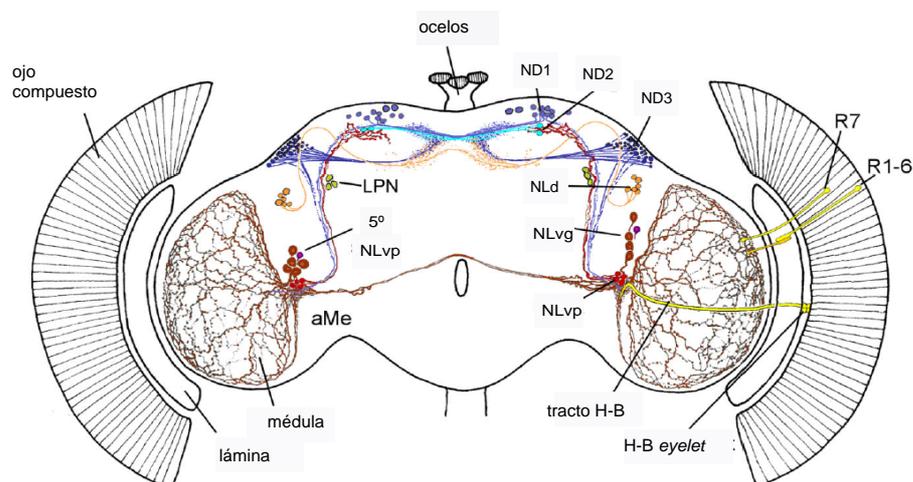


Figura I.3. Mapa de las neuronas del circuito circadiano y sus proyecciones en *Drosophila*. Todos los grupos de neuronas del reloj están indicados (DN1,2 y 3, LNd, NLvgs y NLvps). Además, se incluyen las estructuras de fotopercepción, como los ocelos (Oc), H-B eyelets y fotorreceptores de la retina, R7/8 y R1/6. Las neuronas más importantes en la jerarquía del circuito circadiano son las NLvps, cuyos somas se encuentran en la médula anterior y envían sus proyecciones axonales al protocerebro dorsal. Tanto estas células como las NLvgs están indicadas en rojo, ya que ambas expresan el neuropéptido PDF (Helfrich-Forster et al., 2007).

Aunque existe una jerarquía bien establecida entre los distintos grupos de neuronas marcapasos de *Drosophila*, hay una diferencia importante respecto del sistema circadiano de mamíferos. El núcleo supraquiasmático es el considerado el *reloj central* debido a que todas las oscilaciones en los relojes periféricos están subordinadas a su funcionamiento. En las moscas existe una mayor *diversificación*, ya que cultivos de distintos tejidos aislados pueden ser sincronizados por ciclos de luz y oscuridad y mantienen sus oscilaciones en condiciones constantes en forma autónoma (Hege et al., 1997;Plautz et al., 1997).

Sin embargo, puede afirmarse que uno de estos grupos neuronales, las NLvps, es una estructura en gran medida análoga al NSQ en cuanto a su función. Además de que estas células son esenciales para el control de la ritmicidad comportamental (Blanchardon E, 2001;Helfrich-Forster, 1998;Renn et al., 1999), son capaces de sincronizar algunos osciladores periféricos e inclusive a los grupos de neuronas dorsales⁴ (Stoleru et al., 2005). Existen importantes diferencias entre los dos grupos de NLvs: en primer lugar, envían sus proyecciones axonales a regiones distintas; mientras que las NLvgs proyectan contralateralmente hacia el lóbulo óptico del hemisferio opuesto, las terminales axonales de las NLvps llegan hasta el protocerebro dorsal, a la región donde se encuentran las neuronas dorsales. Además, difieren en el tamaño y ubicación de sus cuerpos celulares (las NLvgs tienen una localización más dorsal y anterior). Pero la diferencia más importante radica en que mientras las NLvgs no son células marcapasos porque sus oscilaciones desaparecen en oscuridad constante (Taghert y Shafer, 2006) y no son necesarias para la ritmicidad comportamental (Grima et al., 2004;Stoleru et al., 2004), las NLvps ocupan el lugar más alto en la jerarquía dentro de los grupos neuronales del circuito circadiano

Distintas evidencias experimentales sugieren que las NLvps son necesarias y suficientes para el control de la ritmicidad en condiciones constantes. Por un lado, eliminando únicamente estas células mediante sobreexpresión de genes pro apoptóticos las moscas se vuelven completamente arrítmicas, mientras que las alteraciones comportamentales como consecuencia de la eliminación de los otros

⁴- En este trabajo se demostró que las NLvps pueden actuar como *Zeitgeber* de otros grupos de neuronas marcapasos, ya que pueden sincronizar su fase (sincronización *no paramétrica*).

osciladores son muy leves (Stoleru et al., 2004), y por otro, el rescate de la expresión de *per* en el *background* genético del mutante nulo *per*⁰¹ específicamente en las NLvps es suficiente para rescatar la ritmicidad comportamental (Grima et al., 2004).

Sin embargo, en ciclos de luz y oscuridad el escenario es diferente, ya que en el comportamiento de una mosca silvestre se evidencian las manifestaciones comportamentales de los distintos grupos de neuronas del reloj. Tanto en *Drosophila* como en la mayoría de los animales, incluso aquellos organismos que no poseen un reloj funcional pueden responder a las transiciones de fase, dando lugar a un fenómeno conocido como *enmascaramiento* (Mrosovsky, 1999). El análisis de sus actogramas en presencia del *Zeitgeber* revela que existe un patrón de actividad rítmica que desaparece apenas son dejados en condiciones constantes. Por eso se dice que se *enmascara* la inexistencia de un reloj circadiano, dando una falsa apariencia de ritmicidad. En *Drosophila*, además de la respuesta directa a las transiciones de fase existen anticipaciones de cada una de ellas, que se manifiestan como un incremento gradual de la actividad hacia el final del día y hacia el final de la noche.

Las anticipaciones a las transiciones de fase sumadas a la respuesta directa a los cambios ambientales provocan que la consolidación de la actividad en *Drosophila* se encuentre al amanecer y al atardecer, fenotipo comportamental que se conoce como *crepuscular* (Wheeler et al., 1993). Recientemente se demostró que las NLvps son responsables no sólo del mantenimiento de la ritmicidad en condiciones constantes sino de la anticipación de la mañana (*morning peak*), mientras que las NLds y parte de las neuronas dorsales –fundamentalmente las ND1s– son prescindibles para la ritmicidad en OO pero necesarias y suficientes para la anticipación de la noche (*evening peak*). En adelante nos referiremos a las NLvps también como OSCILADOR M y a las neuronas dorsales y laterales dorsales en conjunto como OSCILADOR E⁵.

Si bien en ciclos de luz y oscuridad las oscilaciones en cada una de las neuronas que integran el circuito circadiano están sincronizadas, en ausencia de claves ambientales

⁵-Recientemente se demostró que las células que integran el oscilador E son capaces de sostener la ritmicidad comportamental en condiciones de luz constante, donde las moscas silvestres son arrítmicas. Alterando la degradación de CRY mediante la sobreexpresión de la caseína quinasa 1 ε (*shaggy*) específicamente en estas células se vio que son capaces de sostener la ritmicidad comportamental (Stoleru et al., 2007).

el escenario es diferente: a partir de la observación de que las oscilaciones en las NLds y ND1 están alteradas en el mutante *pdf⁰¹*, se ha sugerido que la señalización por parte de las NLvps sería necesaria para mantener en fase al resto de las neuronas marcapasos (Lin et al., 2004; Peng et al., 2003). Además, se sabe que la fase de las oscilaciones de las NLds y las neuronas dorsales puede ser sincronizada por las NLvps, que en este caso actuarían como *Zeitgebers* del resto de los osciladores (Stoleru et al., 2005). En este sentido, en condiciones constantes el oscilador **E** estaría subordinado al oscilador **M**⁶.

Del núcleo a la membrana

Si bien los mecanismos bioquímicos que subyacen al funcionamiento del reloj molecular están bien caracterizados, poco se sabe sobre el modo en que las neuronas que lo integran se comunican con los circuitos que se encuentran río abajo. La notable superposición existente entre las neuritas de los distintos grupos de neuronas del circuito circadiano sugiere que estos están conectados funcionalmente (Helfrich-Forster, 2005). Además, se reportó que existen proyecciones axonales que *vuelven* hacia las NLvps desde prácticamente todos los grupos dorsales (Helfrich-Forster et al., 2007). Las hipótesis actuales respecto de la dirección del *flujo de información* desde los distintos grupos neuronales se basan principalmente en evidencias anatómicas: tanto las proyecciones de las NLvps como de las NLds y los tres grupos de NDs se dirigen hacia el protocerebro dorsal, que posee conexiones con todas las áreas del cerebro y donde reside el sistema neurosecretorio de *Drosophila* (Shiga, 2003), por lo que se cree que a través de esta región podrían transmitirse señales eléctricas o humorales hacia los órganos efectores (Helfrich-Forster, 2005).

⁶- Actualmente el modelo **M/E** está bien establecido, aunque algunos autores señalan que aún no es completamente satisfactorio al momento de explicar algunas evidencias experimentales y proponen que ambos osciladores, **M** y **E**, contribuyen a la anticipación de la noche (Taghert y Shafer, 2006). Según esta interpretación, las NLvps conforman tanto el oscilador **M** como el **E**, y las NLds el conforman el oscilador **E**. En este sentido es relevante mencionar que si bien las moscas en las cuales se eliminan las NLvps mediante sobreexpresión de genes pro apoptóticos carecen de anticipación de la mañana, su actividad durante el período de OO está consolidada a partir de la anticipación de la tarde. Resulta al menos llamativo que si las NLvps están involucradas exclusivamente en la manifestación de la anticipación de la mañana, el “pico” que prevalece en su ausencia sea precisamente el de la noche.

Hasta el momento se identificó un único factor potencialmente liberado por las neuronas del reloj, el neuropéptido *pigment dispersing factor* (PDF) (Helfrich-Forster, 1995; Kaneko et al., 1997) que es expresado tanto por las NLvps como por las NLvgs (la señal que se obtiene con un anticuerpo específico contra PDF está esquematizada en rojo en la figura I.3). PDF es considerado un *factor sincronizador* porque la línea *pdf⁰¹*, que porta un alelo nulo, se vuelve gradualmente arrítmica en ausencia de claves ambientales (Helfrich-Forster y Homberg, 1993; Renn et al., 1999). A partir de experimentos de inmunohistoquímica en los que se detectó una oscilación en la señal de PDF en las proyecciones dorsales de las NLvps se propuso que la acumulación y/o liberación de este neuropéptido se encuentra regulada circadianamente (Park et al., 2000). Trabajos recientes en los que se reportó que las oscilaciones moleculares en los grupos de neuronas dorsales de *pdf⁰¹* están desincronizadas en condiciones constantes apoyan la noción de que PDF actúa como factor sincronizador del circuito circadiano (Lin et al., 2004; Peng et al., 2003).

Sin embargo, hasta el momento no se ha podido identificar ningún neurotransmisor involucrado en la transferencia de información río abajo de neuronas del reloj, aunque se ha reportado que éstas expresan receptores de glutamato (Hamasaka et al., 2007), acetilcolina (Wegener et al., 2004) y serotonina (Hamasaka y Nassel, 2005; Yuan et al., 2005). Muy recientemente han comenzando a realizarse experimentos electrofisiológicos para determinar si existe una regulación circadiana de las propiedades de membrana de las NLvps, ya que el tamaño y la ubicación de estas células hicieron hasta ahora muy difícil el acceso mediante microelectrodos. En otros organismos, sin embargo, existe una gran cantidad de información respecto del control circadiano de la actividad eléctrica en distintas neuronas marcapasos.

La actividad eléctrica como componente del sistema circadiano

Los primeros experimentos orientados a determinar si existían oscilaciones en propiedades eléctricas se realizaron en dos moluscos marinos, *Bulla gouldiana* y *Aplysia californica*, y se encontró que existía un patrón rítmico en la frecuencia de disparo de neuronas no fotorreceptoras del nervio óptico, en la base de la retina, que

podía ser registrado tanto *in vivo* como en cultivos de tejido (Block, 1981;Block y Wallace, 1982;Jacklet, 1969;Roberts y Block, 1983). En estos experimentos se encontró, además, que la conductancia de la membrana en condiciones constantes es mayor durante la noche subjetiva, cuando las células están más hiperpolarizadas y decrece a medida que avanza el día, cuando las células comienzan a despolarizarse (Michel et al., 1993;Ralph y Block, 1990). Las neuronas marcapasos de *Bulla* continúan exhibiendo un ritmo circadiano en la conductancia de membrana aún cuando están completamente disociadas del ojo y cultivadas como células aisladas (Michel et al., 1993).

En mamíferos, se ha reportado que las neuronas del NSQ exhiben ritmos circadianos en la frecuencia espontánea de disparo (FED) *in vivo*, en rodajas de cerebro, en cultivos de tejido e incluso en neuronas disociadas (Bos y Mirmiran, 1990;Gillette y Reppert, 1987;Green y Gillette, 1982;Groos y Hendriks, 1982;Herzog et al., 1997;Quintero et al., 2003;Shibata et al., 1982;Welsh et al., 1995). La persistencia de los FED (aunque con fases independientes) en células del NSQ disociadas sugiere que como en *Bulla*, el oscilador circadiano de mamíferos es un proceso autónomo de célula (Welsh et al., 1995). Experimentos electrofisiológicos revelaron que las neuronas del NSQ poseen una corriente entrante transiente de sodio sensible a tetrodotoxina (TTX), otra corriente de sodio de inactivación lenta, tres corrientes de potasio de salida diferentes (transiente, rectificadora demorada y dependiente de calcio), una corriente catiónica inespecífica activable por hiperpolarización tardía (*afterhyperpolarization*, AHP), una corriente de calcio de tipo L y una corriente de potasio entrante de rectificación demorada (Akasu et al., 1993;Cloues y Sather, 2003;de Jeu y Pennartz, 1997;Kononenko et al., 2004;Pennartz et al., 2002;Teshima et al., 2003;Walsh et al., 1995). El hecho de que también en el NSQ tanto la frecuencia y amplitud de los potenciales de acción como la resistencia de la membrana es mayor durante el día (De Jeu et al., 1998;Pennartz et al., 2002) es consistente con la observación de que es en esta fase cuando la membrana está más despolarizada (Pennartz et al., 2002).

En conjunto, todos estos datos sugerían que al menos una de las corrientes descritas anteriormente se encontraba modulada por el reloj circadiano. En el caso de *Bulla*, se demostró que la *variación circadiana en la amplitud de una corriente de potasio* era

responsable de la oscilación en la conductancia de la membrana (Michel et al., 1999). Resultados similares reportados en mamíferos dieron lugar a la hipótesis de que las corrientes de potasio podrían ser elementos clave en la modulación de la actividad espontánea del NSQ (Itri et al., 2005; Kuhlman et al., 2003; Kuhlman y McMahon, 2004; Walsh et al., 1995). Experimentos posteriores demostraron que existe una variación circadiana en una corriente de potasio en particular, *la corriente de larga conductancia dependiente de calcio y voltaje*, y que esta oscilación ocurre específicamente en neuronas del NSQ (Pitts et al., 2006).

Los canales de potasio y su rol en la célula

A partir de sus secuencias aminoacídicas, se pudo establecer que los canales de sodio, calcio y potasio son proteínas homólogas que descienden de un ancestro común, un canal iónico bacteriano (Hille, 1989). En todos los genomas secuenciados hasta el momento, eucariotas, procariotas y arqueobacterias, existe al menos un gen que codifica para un canal de potasio (Littleton y Ganetzky, 2000). Ningún otro canal iónico presenta tal ubicuidad. Varias patologías humanas, como las arritmias cardíacas, algunos tipos de sorderas, diabetes, epilepsia y disfunciones relacionadas con la regulación de la presión sanguínea están relacionadas con alteraciones en su funcionamiento o expresión (Jentsch et al., 2004).

Los canales de potasio *estabilizan* el potencial de membrana, ya que lo acercan al potencial de equilibrio para el potasio, lejos del umbral de disparo de la célula. En las células excitables, los roles de todos los tipos de canales de K⁺ están relacionados con esta estabilización⁷. Cuando una neurona “dispara” un potencial de acción, se produce una rápida despolarización de la membrana provocada por el ingreso masivo de sodio a través de canales de sodio dependientes de voltaje, que lleva a la célula de los -70mV del reposo a cerca de +50mV. Es entonces cuando la actividad de los distintos tipos de canales de potasio provoca la salida de este ion de la célula, a favor de su gradiente de concentración (típicamente 140mM en el medio intracelular y 2mM en el exterior),

⁷ En las células de la glía, estos canales ayudan a transportar el exceso de K⁺ extracelular para alejarlo de las neuronas activas (Miller, 2000).

causando una inmediata repolarización de la membrana y contribuyendo así a la rapidez de los potenciales de acción. Estos canales terminan períodos de actividad intensa, establecen el tiempo entre disparos y generalmente disminuyen la efectividad de un *input* excitatorio cuando se encuentran abiertos⁸ (Miller, 1992; Miller, 2000). La apertura de canales de K⁺ subyace a algunos tipos de anestesia clínica, ya que lleva a un estado de pérdida de conciencia. Por otro lado, su cierre mediante el sistema de segundos mensajeros es una estrategia que permite aumentar la excitabilidad neuronal.

En mamíferos se han identificado más de 80 genes que codifican para subunidades de canales de K⁺ (Salkoff et al., 2006). Aunque tienen distintas propiedades estructurales pueden reconocerse por algunas características distintivas, como la secuencia -TXXTXGYGD- (thr-x-x-tr-x-gly-tyr-gly-glu) que se considera la “firma” de los canales de K⁺ (Heginbotham et al., 1992). Su arquitectura más simple consiste en dos pasos transmembrana, y es probablemente una forma primitiva de estos canales (Gulbis y Doyle, 2004). Las principales subunidades tienen además de los dos dominios comunes cuatro segmentos transmembrana que les otorgan sensibilidad al voltaje. En este sentido, el más importante de ellos es el dominio S4, que contiene secuencias repetitivas de un aminoácido cargado positivamente mas dos aminoácidos hidrofóbicos que se cree que constituyen el *sensor de voltaje* (Bezanilla y Perozo, 2002; Cui y Aldrich, 2000; Diaz et al., 1998; Horn, 2004) (FIGURA I.4).

El secuenciamiento del genoma de *Drosophila* reveló 27 genes que codifican para canales de potasio (Littleton y Ganetzky, 2000). Los canales de invertebrados pueden organizarse según las mismas clasificaciones estructurales que los de mamíferos (ANEXO 1) lo cual indica que su gran diversidad no es una especialización de los animales superiores. El primer canal de K⁺ en ser clonado fue *Shaker* de *Drosophila*, que fue identificado debido a que las líneas de moscas mutantes en este canal agitaban

⁸- Es tal la diversidad de tipos celulares donde se expresan canales de K⁺, y tan variadas sus funciones que es imposible recopilarlas todas en el contexto de esta tesis, por lo que se mencionan únicamente aquellas relacionadas con su actividad en el sistema nervioso (Jentsch et al., 2004)

vigorosamente sus patas en respuesta a la anestesia⁹ (Papazian et al., 1987). Análisis electrofisiológicos revelaron que estas moscas carecían de una corriente transiente rápida en las terminales presinápticas, de modo que la repolarización de la membrana luego del disparo de un potencial de acción estaba retrasada y la liberación evocada de neurotransmisor por un único potencial aumentaba drásticamente (Hoshi et al., 1990; Pongs et al., 1988).

Los canales de potasio dependientes de calcio y voltaje -BK-

En 1958, G. Gardós describió por primera vez una corriente de K^+ activada por Ca^{2+} en eritrocitos. La primera caracterización electrofisiológica de la corriente de estos canales se realizó a través de experimentos con microelectrodos en neuronas de moluscos (Meech y Standen, 1974), pero la mayor parte de lo que se sabe actualmente proviene de estudios donde se utilizó la técnica de *patch clamp* en neuronas de vertebrados (Sah y Davies, 2000). Los canales involucrados en su transmisión se denominan Maxi K o BK (*Big K⁺*) debido a la inusual magnitud de su conductancia unitaria (en promedio, > 250 pS para una distribución simétrica de 100mM K^+) y se expresan ubicuamente en las terminales presinápticas de varios tipos neuronales (Knaus et al., 1996; Meir et al., 1999; Robitaille et al., 1993; Sakaba et al., 1997). La corriente amplia y unitaria de los BK era tan fácil de registrar que tomó muchos años identificar que también había otros canales, con distintas propiedades, los SK (*small K⁺*) e IK (*intermediate K⁺*) (Hille, 2001).

El canal BK de *Drosophila* fue el primer canal de K^+ dependiente de calcio y voltaje en ser clonado y caracterizado (Atkinson et al., 1991). Previamente se había identificado una línea de moscas mutantes que carecía de una corriente de potasio dependiente de calcio y daba lugar a un fenotipo “letárgico”, de donde proviene la denominación *slowpoke* (Elkins et al., 1986). Pocos años más tarde clonó su homólogo en mamíferos y se demostró que *slowpoke* de *Drosophila* es homólogo a la subunidad α de *mslo*¹⁰

⁹- También en esta rama de la biología Seymour Benzer aportó una idea innovadora, ya que fue el primero en proponer que defectos en canales iónicos deberían reflejarse en defectos comportamentales. Esta noción condujo a la identificación del primer canal de K, *Shaker*, y a su clonado y caracterización.

¹⁰- Además, en mamíferos existe una subunidad β regulatoria (FIGURA I.4) (Orio et al., 2002).

(Butler et al., 1993; Pallanck y Ganetzky, 1994), donde existen cuatro genes que codifican para canales *slo*: *slo*₁, dos parálogos, *slo*_{2.1} y *slo*_{2.2}, y *slo*₃ (Salkoff et al., 2006).

Este gen se encuentra altamente conservado tanto en cuanto a su secuencia como a su función (Butler et al., 1993; Piskorowski y Aldrich, 2006; Schreiber et al., 1999; Schreiber y Salkoff, 1997). El secuenciamiento de los genomas de diversos organismos modelo permitió la identificación de todos los genes que codifican para las distintas subunidades de *slo* (Adams et al., 2000; Bhattacharjee et al., 2003; Butler et al., 1993; Joiner et al., 1998; Pallanck y Ganetzky, 1994; Schreiber et al., 1998; Yuan et al., 2000), contribuyendo a un mejor entendimiento de cómo la evolución de estos canales ocurrió a través de un diseño modular, esencialmente acoplando un módulo equivalente a un canal dependiente de voltaje con uno que responde a factores intra y extra celulares (Salkoff et al., 2006). La versatilidad de este diseño permite que propiedades eléctricas de la membrana sean moduladas por un gran repertorio de eventos celulares.

Aunque estructuralmente son muy similares a los canales de potasio dependientes de voltaje, los BK presentan una topología de 7 dominios transmembrana ya que poseen un dominio adicional, S0 (Meera et al., 1997; Toro et al., 1998; Wallner et al., 1996) (FIGURA 1.3), que precede al S1 y provoca que el extremo N-terminal se encuentre en el espacio extracelular. El largo extremo C-terminal (contiene aproximadamente el doble de aminoácidos que la región comprendida entre S0 y S6) contiene cuatro dominios hidrofóbicos (S7-S10). El grupo de Salkoff identificó los dos módulos de la proteína, el central (S0-S8) y la “cola” (S9-S10), que al ser coexpresados dan lugar a canales funcionales (Wei et al., 1994). El módulo central del canal (S0-S6) posee una alta similitud con los canales de potasio canónicos, del tipo de *Shaker* (Atkinson et al., 1991; Butler et al., 1993) excepto por la presencia del extremo amino terminal (S0). La regulación por voltaje está asociada a este dominio, y proviene del mecanismo compartido por todos los canales de K⁺, llevado a cabo por el sensor de voltaje (S4). La parte distal (S9-S10) es la más conservada dentro de los canales *slo*, y es donde se encuentra el sitio de unión a calcio (*calcium bowl*) (Bao et al., 2004; Schreiber et al., 1999; Schreiber y Salkoff, 1997; Shi et al., 2002; Xia et al., 2002; Zeng et al., 2005). Esta “cola” está separada del resto de la proteína por una región conectora no conservada (entre S8 y S9) que presenta grandes diferencias entre especies.

Existe una gran cantidad de variantes de *splicing* de *slo* (Atkinson et al., 1991; Butler et al., 1993; Chang et al., 2000; Rosenblatt et al., 1997) algunas de las cuales producen canales con sensibilidades al Ca^{2+} y cinéticas muy diferentes (Navaratnam et al., 1997; Rosenblatt et al., 1997; Tseng-Crank et al., 1994). Se ha reportado que existe una regulación hormonal de la expresión de distintas variantes que podría estar involucrada en la modulación de la excitabilidad de células involucradas en diversas respuestas a stress (Miller, 2000).

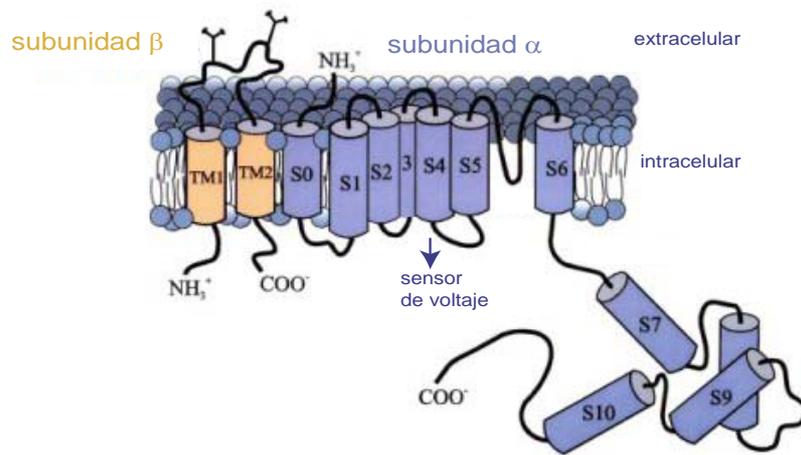


Figura I.4. Estructura de un canal BK. En el esquema se indican todos los dominios básicos de los canales BK, a los que pertenece *slowpoke*. El dominio S0 es característico de *slo* y lo distingue de otros canales de potasio. Se cree que en la “cola” formada por los dominios S9-10 se encuentra el sitio de unión a calcio. En *Drosophila* no se ha encontrado ninguna secuencia que codifique para una subunidad β putativa (dominios TM1 y TM2, en naranja). *dslo* corresponde a la subunidad α de *mslo* (dominios S0-S10, en azul).

La función de los canales codificados por el locus *slowpoke* es crucial en la determinación del patrón de disparo de potenciales de acción y en la eficacia de la transmisión sináptica en el sistema nervioso. Además, estos canales juegan un rol muy importante en el control de la presión sanguínea en el músculo liso y el transporte de

iones en células epiteliales¹¹ (Atkinson et al., 1991;Elkins et al., 1986;Hanaoka et al., 1999;Morita et al., 1997). Están ampliamente distribuidos en el SNC, donde se localizan en somas, dendritas y terminales presinápticas (Knaus et al., 1996;Marrion y Tavalin, 1998). En dendritas, se cree que ayudan a terminar potenciales de acción de calcio, como es el caso de las células de Purkinje (Swensen y Bean, 2005;Womack y Khodakhah, 2004). En el soma, se cree que contribuyen a la fase rápida de la hiperpolarización tardía observada en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Lancaster et al., 1991;Lancaster et al., 2001). Esta fase es determinante en la duración del período refractario de una neurona y por lo tanto determina su máximo índice de disparo de potenciales de acción. En las terminales presinápticas, proveen un mecanismo homeostático de regulación de la transmisión sináptica limitando la entrada de calcio (Hu et al., 2001;Robitaille et al., 1993;Wang et al., 2001) y regulando la duración de los potenciales de acción.

El rol de *slo* en la liberación de neurotransmisores es aún controversial. Dado que la activación de este canal hiperpolariza la célula, se esperaría que su bloqueo aumente la liberación de neurotransmisores. Esto es consistente con lo reportado en algunos sistemas (Marshall et al., 1994;Robitaille et al., 1993;Wang et al., 2001), pero sin embargo en otros casos se encontró el efecto contrario (Pattillo et al., 2001;Skinner et al., 2003;Warbington et al., 1996). El hecho de que SLO_1 haya sido el único canal iónico encontrado en un *screen* genético donde se buscaban moléculas involucradas en la regulación de la liberación de neurotransmisores sugiere que este canal juega un rol importante, si no único, en este proceso (Wang et al., 2001). La prolongación de la repolarización de la membrana después de un potencial de acción es el mecanismo propuesto por el cual el bloqueo de los canales BK afecta la transmisión de neurotransmisores (Hu et al., 2001). Esta prolongación provoca el “ensanchamiento” del potencial de acción que se observó cuando *slowpoke* fue identificado (Elkins et al., 1986). En la figura **I.5** se muestra la curva obtenida al estimular a 20 y 33 Hertz el músculo de vuelo en moscas adultas (Atkinson et al., 2000). Mientras que en la línea

¹¹-Recientemente se ha reportado que estos canales modulan la sensibilidad a etanol (Pietrzykowski et al., 2004). Además, en *Drosophila* se demostró que la presencia de *slo* otorga mayor sensibilidad a la anestesia y que cambios en sus niveles de expresión en el SNC están correlacionados con la adquisición de tolerancia a distintos solventes orgánicos sedantes (Ghezzi et al., 2004).

control los potenciales de acción repetidos presentan formas y duración similares, en el mutante nulo en *slo* se vuelven gradualmente más anchos debido a su incapacidad para repolarizar adecuadamente la membrana.

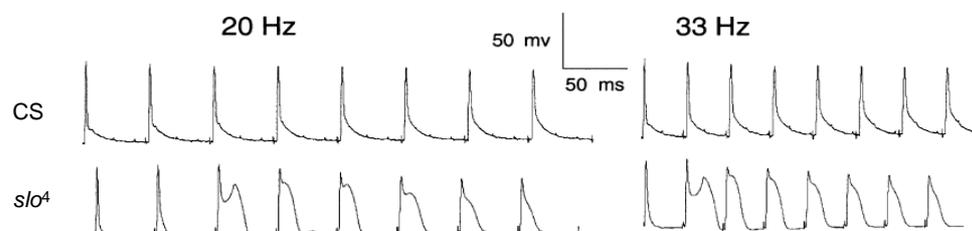


Figura 1.5. Potenciales de acción evocados en el músculo de vuelo en moscas silvestres y mutantes en *slo*. La estimulación de una mosca inmovilizada utilizando electrodos de tungsteno resulta en la generación de potenciales de acción en el músculo de vuelo, que se registran con electrodos de vidrio con 1M NaCl. En el panel izquierdo se muestran los potenciales de acción producidos al estimular el músculo a 20 Hertz y en el derecho a 30 Hertz. El gráfico superior corresponde a los potenciales generados en un individuo silvestre y en el inferior los generados por *slo⁴* (Atkinson 2000).

Debido al rol fundamental de estos canales en procesos tan esenciales para el funcionamiento neuronal, su actividad está regulada por múltiples eventos intracelulares. Las propiedades de *gating* de SLO están moduladas por la función de distintas kinasas y fosfatasa que fosforilan al canal en forma reversible (Esguerra et al., 1994; Salkoff, 2006). En particular, estos canales son habitualmente modulados por varias serina/treonina kinasas, como es el caso de PKA, PKG y PKC (Schubert y Nelson, 2001; Tian et al., 2001; Tian et al., 2004) (Weigert 02.). Éstas pueden aumentar o disminuir la actividad del canal regulando su probabilidad de apertura, a menudo en complejas combinaciones que varían dependiendo del tejido. En *Drosophila* se han descrito varios reguladores importantes de la función de SLO, como la proteína *slowpoke binding protein*, SLOB, (Zhou et al., 1999) que modula positivamente la probabilidad de apertura del canal, o Leonardo, LEO, que se une a *slob* dando como efecto una modulación negativa de la actividad del canal (Schopperle et al., 1998; Zhou et al., 1999; Zhou et al., 2003). Mediante inmunoprecipitación se

demonstró que SLO, SLOB y LEO colocalizan en botones sinápticos en la placa neuromuscular de la larva (Zhou 99).

La exquisita selectividad al potasio de los BK, que son prácticamente impermeables al sodio y conducen potasio con una efectividad que llega a ser 200 veces mayor a la que tienen para otros cationes, como Rb^+ y Cs^+ resultaba impensable para canales de tan alta conductancia (Blatz y Magleby 84, Eisenman 86, Stefani 97). Dado que además su activación depende tanto del voltaje de la membrana como de los niveles de calcio intracelular, estos canales se consideran el nexo ideal para la integración de señales eléctricas y bioquímicas (Meech 1978, Yazejian 1997, Lundkvist y Block, 05).

slo se encuentra bajo el control del reloj circadiano

Una de las estrategias empleadas para identificar potenciales moléculas involucradas en la cascada de eventos río abajo del oscilador molecular en *Drosophila* fue la comparación de los patrones temporales de expresión génica entre líneas silvestres y mutantes para genes canónicos del reloj mediante experimentos de *microarrays* (Ceriani et al., 2002; Claridge-Chang et al., 2001; McDonald y Rosbash, 2001; Ueda et al., 2002).

En experimentos realizados por la Dra. M. Fernanda Ceriani, donde se comparó el patrón de expresión a lo largo de los dos primeros días en condiciones constantes entre una línea silvestre, y *w*, y *Clk^{trk}*, que porta un alelo dominante negativo para *Clk*, se encontró que de los 120 genes que oscilan en condiciones constantes en *w*, 116 dejaban de oscilar en la línea mutante (Ceriani et al., 2002). Esto implica que la expresión de estos genes se encuentra directa o indirectamente regulada por CLK, un potente activador transcripcional (Allada et al., 1998). En este trabajo se identificó un amplio rango de moléculas con diversas funciones celulares, ya que entre los genes cuya expresión depende de la función de CLK se encontraron por ejemplo, genes que codifican para factores de transcripción, kinasas y componentes del proteosoma.

Entre las moléculas cuya oscilación desaparece en el background mutante para *Clk* se encontró a *slob*, el principal regulador de la probabilidad de apertura de *slowpoke*.

Este resultado es consistente con lo reportado en los otros trabajos, en los que se utilizaron estrategias ligeramente distintas (Claridge-Chang et al., 2001; McDonald y Rosbash, 2001; Ueda et al., 2002). El hecho de que *slob* oscilara sugería que la modulación circadiana de la actividad del canal podría ser una estrategia de la célula para regular diferencialmente las propiedades de la membrana.

A continuación se buscó determinar si la oscilación encontrada en *slob* indicaba una regulación circadiana de la expresión del propio canal. Dado que en los experimentos de *microarrays* los niveles de expresión de *slo* eran muy bajos, su oscilación no se pudo detectar mediante el algoritmo utilizado para encontrar genes que ciclaban (COSOPT). Sin embargo, al estudiar el patrón obtenido se encontró que *slo* oscila tanto en ciclos de luz y oscuridad como en condiciones constantes, y en fase con la oscilación obtenida para *slob* (FIGURA I.6). Esta oscilación se confirmó mediante la técnica de RT-PCR (M.F. Ceriani, datos no publicados). Además, mediante *western blots* se encontró que SLO también oscila a nivel de proteína (Ceriani et al., 2002). Posteriormente se reportó que el homólogo de *slo* en mamíferos, BK (*slo-1*), también oscila circadianamente a nivel de ARN, y esta oscilación ocurre *específicamente en el núcleo supraquiasmático* (Panda et al., 2002).

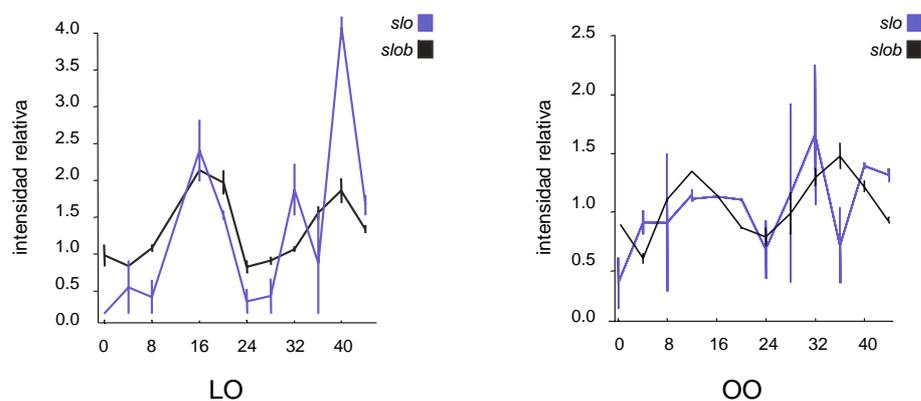


Figura I.6. Oscilación circadiana de los niveles de RNA de *slo* y *slob*. Niveles de intensidad relativa de RNA mensajero de *slo* y *slob* obtenidos de cabezas de moscas adultas de la línea *y w*. La figura de la izquierda corresponde a los resultados obtenidos en ciclos de luz y oscuridad, mientras que la de la derecha corresponde al patrón temporal de expresión obtenido durante los dos primeros días en condiciones constantes (Ceriani et al., 2002).

La oscilación de *slowpoke*, una molécula que se considera esencial en la integración del metabolismo celular con las propiedades de membrana, sugería que la regulación de su función es una estrategia utilizada por el reloj circadiano para modular diferencialmente la actividad de las neuronas marcapasos en distintos momentos del día.

HIPÓTESIS

La regulación diferencial de la actividad del canal de potasio *slowpoke* es un mecanismo clave en la *salida* de información desde el reloj circadiano en *Drosophila*. Dado que en ausencia del canal se pierde la consolidación de la actividad, proponemos que SLO es un componente esencial para la propagación de la sincronización que en última instancia regula la ritmicidad comportamental.

OBJETIVOS

- ❖ Determinar si los defectos comportamentales del mutante nulo en *slowpoke* se deben específicamente a la falta del canal, y cuáles son los tejidos en los que su expresión es necesaria y suficiente para el rescate de los fenotipos asociados a esta mutación.
- ❖ Evaluar el efecto comportamental de la desregulación de los niveles de *slo*, tanto silenciando su expresión como sobreexpresándolo en forma específica de tejido.
- ❖ Analizar el efecto de la falta de *slo* en el funcionamiento de los distintos osciladores circadianos del cerebro, tanto de las *neuronas laterales ventrales pequeñas* (NLvps), la estructura análoga al “reloj central” de mamíferos, como de los osciladores subordinados a su función.
- ❖ Estudiar el patrón de expresión de SLO en relación con el circuito circadiano.
- ❖ Determinar si la ausencia del canal altera propiedades estructurales o funcionales del circuito circadiano.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1.- Las más importantes *salidas* del reloj circadiano están alteradas en ausencia de *slowpoke*.

1.1.- Un mutante nulo en *slowpoke* es arrítmico en actividad locomotora.

En resultados preliminares del laboratorio se demostró que un mutante nulo en *slowpoke*, la línea *slo⁴*, es severamente arrítmico en actividad locomotora. De hecho, su porcentaje de ritmicidad en condiciones constantes de oscuridad y temperatura es similar al de los mutantes en los genes clásicos del reloj (Allada et al., 1998; Allada et al., 2003; Konopka y Benzer, 1971; Liu et al., 1991; Rutila et al., 1998; Sehgal et al., 1994). Este resultado, sumado a la observación de que el canal se encuentra circadianamente regulado tanto a nivel de ARN como de proteína (Ceriani et al., 2002), sugería que *slo* podía ser una molécula clave dentro del mecanismo celular que acopla las oscilaciones moleculares con las propiedades eléctricas de la membrana. Esta integración de procesos celulares, esencial para la transmisión de las señales río abajo del reloj molecular, es uno de los aspectos menos caracterizados dentro del campo de los ritmos circadianos. Dado que al ser regulados tanto por voltaje como por los niveles de calcio intracelular los canales BK son considerados factores ideales como potenciales nexos entre señales bioquímicas y eléctricas, *slo* aparecía como un candidato especialmente atractivo como puerta de entrada para estudiar el acoplamiento entre osciladores circadianos que subyace a la propagación de la ritmicidad río abajo del reloj.

En la fase inicial de este trabajo se repitieron los experimentos de actividad locomotora para caracterizar en mayor profundidad el fenotipo de *slo⁴* (FIGURA 1.1). Para ello se emplearon condiciones de entrenamiento estándar: ciclos de cinco días alternando 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (LO), luego de los cuales las moscas fueron dejadas en condiciones de oscuridad y temperatura constantes (25°C). Éste es el *paradigma comportamental básico* al que en adelante nos referiremos como "LO/OO". Tal como se describió en la introducción, es precisamente la persistencia de la ritmicidad en condiciones constantes, cuando ya no existen claves ambientales, lo que pone en evidencia la existencia de un reloj endógeno. En la figura 1.C se muestra la diferencia en el porcentaje de ritmicidad en OO de *slo⁴* respecto de la línea silvestre, Canton S. La penetrancia de este fenotipo, mayor al 90% en todos los experimentos realizados, es particularmente llamativa teniendo en cuenta que

mutantes nulos en dos de los genes que codifican para proteínas pertenecientes a las otras grandes familias de canales de potasio, *shaker* y *ether-a-go go*, no presentan defectos en su ritmicidad comportamental (Ceriani, resultados no publicados).

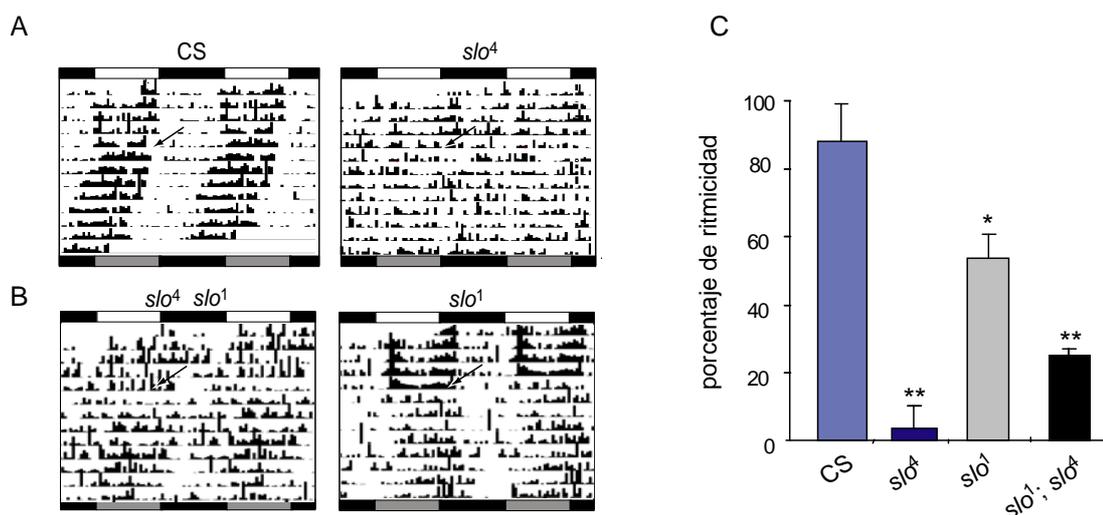


Figura 1.1.- Una mutación en el canal *slo* provoca arritmicidad en actividad locomotora. Machos jóvenes (0-5 días) fueron sincronizados en ciclos de LO durante 5 días y luego dejados en condiciones constantes (las flechas indican el momento de la transferencia a OO). Los experimentos se repitieron entre 3 y 9 veces. El número de individuos se detalla en la tabla 1.1. (A) Actogramas representativos de la línea control, CS, y el mutante nulo en *slo*, *slo⁴*. Las barras blancas corresponden al día, las negras a la noche, las rayas grises al día subjetivo y las rayas negras a la noche subjetiva. (B) Actogramas correspondientes al mutante *slo⁴* y a la combinación alélica *slo⁴/slo¹*. (C) Porcentaje de ritmicidad de las líneas presentadas en el panel izquierdo. El análisis estadístico realizado fue ANOVA con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. *slo⁴*, *slo¹* y *slo⁴/slo¹* son significativamente distintas de CS (un asterisco indica una probabilidad $p < 0.05$; dos asteriscos, $p < 0.005$).

La inspección visual de los actogramas revela que también existen alteraciones en el comportamiento de *slo⁴* durante el ciclo de LO. Las moscas silvestres tienen un fenotipo denominado *crepuscular*, porque si bien son animales diurnos, su actividad está consolidada predominantemente en torno al amanecer y al atardecer. En ausencia de *slo*, la actividad se encuentra distribuida de un modo mucho más irregular. El comportamiento

del mutante durante el ciclo de luz: oscuridad será analizado en el capítulo 2, tanto bajo condiciones estándar como bajo distintos paradigmas de entrenamiento.

Un parámetro importante al evaluar la regulación circadiana de la actividad locomotora es la *fuera* de la ritmicidad, que se puede determinar mediante una transformada de Fourier - FFT, *Fast Fourier Transformation*- aplicada a la distribución de períodos (ver materiales y métodos). Dado que la ritmicidad en actividad locomotora es un comportamiento complejo, como consecuencia de la convergencia de varios fenómenos biológicos en general resulta insuficiente el clasificar a los distintos individuos a "todo o nada" en rítmicos y arrítmicos. Por este motivo se ha establecido una tercera categoría para aquellas moscas que presentan una *ritmicidad débil*. Este parámetro, el *FFT*, que permite evaluar que tan rítmico es cada individuo, también se ha utilizado como un parámetro para clasificar a las moscas en rítmicas, arrítmicas y débilmente rítmicas¹² (Yang y Sehgal, 2001). Si bien en el laboratorio no se utiliza únicamente este criterio por considerarlo insuficiente (ver materiales y métodos), la comparación del valor de FFT obtenido para cada una de las líneas brinda información adicional al porcentaje de ritmicidad. Tal como puede verse en la tabla 1.1, donde se muestran estos valores para cada una de las líneas mencionadas a lo largo de este capítulo, si bien el FFT de la línea *slo⁴* permite clasificarlo como una línea arrítmica (alrededor de 0.05) existe un porcentaje importante de moscas que presentan una ritmicidad débil (TABLA 1.1). Este dato sugiere que podría existir cierta ritmicidad subyacente en este mutante, que es indetectable para el *software* de análisis.

¹² En este trabajo se incorporó por primera vez la categoría de *ritmicidad débil*. Se analizaron moscas clasificadas como rítmicas (n=699), débilmente rítmicas (n=63) o arrítmicas (n=181) en función del análisis visual de sus actogramas y periodogramas y se obtuvieron los valores promedio de FFT de 0.147, 0.0796 y 0.0442, respectivamente. En el mismo análisis se determinó que la línea control y *w* tiene un FFT promedio de 0.117 y mutantes nulos en genes del reloj, *per⁰¹* y *tim⁰¹*, tienen 0.0267 y 0.0168 respectivamente.

Genotipo	n	LO	OO			Período (hs)	FFT
		%R	%R	%DR	%AR		
CS	68	96.1	85.3	8.8	5.9	23.69 ± 0.05	0.103 ± 0.005
<i>slo</i> ⁴	141	25.9	1.4	39.7	58.9	24.50 ± 0.50	0.049 ± 0.003
<i>slo</i> ¹	48	60.0	55.0	30.0	15.0	24.00 ± 0.06	0.079 ± 0.004
M131; <i>slo</i> ⁴	50	10.4	1.2	15.6	83.2	24.25 ± 0.35	0.083 ± 0.007
B52H; <i>slo</i> ⁴	81	74.7	66.7	30.9	2.5	23.92 ± 0.04	0.090 ± 0.003
<i>ash2</i> ¹⁸ / <i>slo</i> ⁴	49	30.2	14.2	62.9	22.8	23.60 ± 0.22	0.091 ± 0.056
<i>ash2</i> ¹⁸ /+	15	100	100	0	0	23.77 ± 0.05	0.940 ± 0.083
<i>slo</i> ⁴ /+	56	89.3	100	0	0	23.78 ± 0.40	0.117 ± 0.048
<i>slo</i> ¹ /+	100	100	100	0	0	24.00 ± 0.00	0.072 ± 0.023
<i>slo</i> ⁴ / <i>slo</i> ¹	56	41.2	26.4	44.1	29.4	24.14 ± 0.48	0.048 ± 0.035

Tabla 1.1.- Los valores de período se asignan sólo a los individuos rítmicos. El FFT (*Fast Fourier Transform*) es una medida de la fuerza de la ritmicidad (ver materiales y métodos)

1.2.- El defecto comportamental es específico de la mutación en el canal.

El alelo *slo*⁴ contiene una inversión en el cromosoma III denominada *In3R(slo4)*, que abarca varios otros genes además de *slowpoke* (FIGURA 1.2). Esta inversión fue generada mediante irradiación por rayos γ , en un *screen* cuyo objetivo era identificar componentes celulares involucrados en las corrientes de potasio (Atkinson et al., 1991). El resultado de la irradiación fue que un fragmento del cromosoma se deletionó y reinsertó en dirección contraria, provocando que el marco abierto de lectura de *slo* se alejara de sus promotores, razón por la cual la inversión dio origen a un alelo *nulo*. Si bien el hecho de que los demás genes involucrados en la inversión también hayan quedado insertos en dirección opuesta no significa necesariamente que su transcripción se vea afectada, era importante descartar que alguno de ellos contribuyera al fenotipo comportamental de *slo*⁴.

severo, especialmente obvio en LO (FIGURA 1.1.B, TABLA 1.1). La clara diferencia entre estos dos potenciales alelos nulos sugería dos escenarios posibles; o bien slo^1 no era un verdadero alelo nulo sino un alelo *hipomorfo* (ver glosario), o slo^4 tenía mutaciones adicionales que contribuían a la severidad del fenotipo. La observación de que las moscas con la combinación alélica slo^1/slo^4 tienen un porcentaje de ritmicidad intermedio entre el observado para cualquiera de las líneas en homocigocis apoya la primera posibilidad (FIGURA 1.3), especialmente teniendo en cuenta que la compleja regulación del locus *slo*, y la observación que el heterocigota $slo^4/+$ no tiene defectos comportamentales. Además, como puede verse en la tabla 1.1, incluso el porcentaje de ritmicidad en LO y el valor de FFT de slo^1/slo^4 son intermedios entre el de slo^1 y slo^4 .

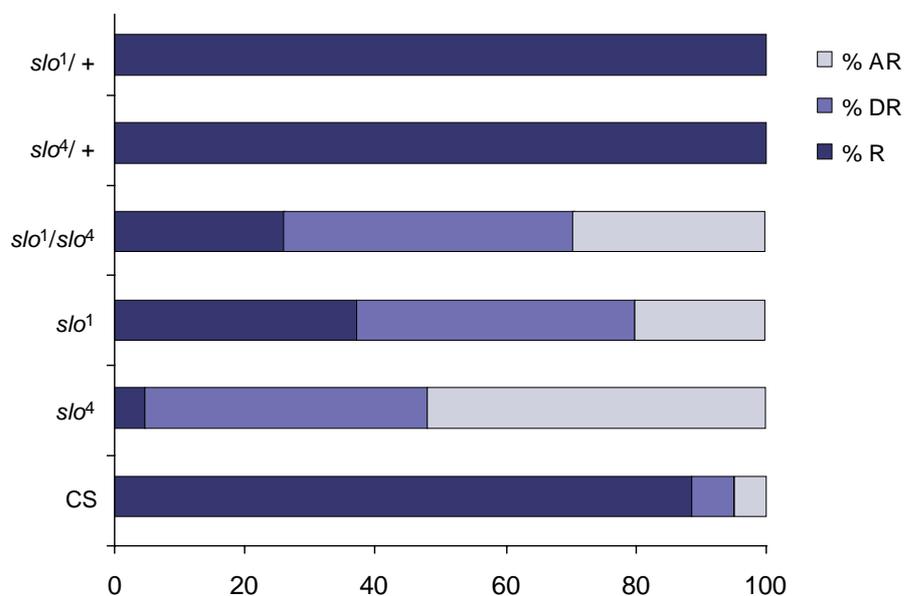


Figura 1.3.- El defecto comportamental de slo^4 es específico de la mutación en *slo*. Las líneas transheterocigotas slo^1/slo^4 presentan fenotipos intermedios respecto de los homocigotas slo^1 y slo^4 respecto de su porcentaje de ritmicidad. El número de individuos analizados se indica en la tabla 1.1.

En caso de que mutaciones adicionales a la existente en *slo* contribuyeran a la arritmicidad de *slo⁴*, el porcentaje de ritmicidad de *slo¹/slo⁴* debería ser similar al de *slo¹*, ya que sería equivalente a analizar una línea homocigota para un alelo nulo. Teniendo en cuenta que tanto *slo¹* como *slo⁴* en heterocigocis son indistinguibles del control en cuanto a su porcentaje de ritmicidad en OO y a su valor de FFT, se puede descartar que cualquiera de las otras mutaciones pueda afectar la ritmicidad en heterocigocis. Sin embargo, en la figura **1.3** puede verse que en la línea que posee la combinación alélica de *slo*, además de aumentar el porcentaje de individuos rítmicos con respecto a *slo⁴* disminuye el porcentaje de arrítmicos. Por lo tanto, para todos los parámetros analizados, esta línea presenta un fenotipo intermedio con respecto a cada una de las líneas en homocigocis. Los resultados obtenidos con la línea *slo¹/slo⁴* apoyan la noción de que la diferencia de intensidad del fenotipo de *slo¹* respecto del de *slo⁴* se debe a que *slo¹* no es un verdadero alelo nulo sino un alelo *hipomorfo*. Para corroborar que la severa arritmicidad de *slo⁴* no se deba a un efecto de background genético se analizó el comportamiento de esta mutación en el contexto genético de la línea silvestre *w* (en lugar de CS), y se determinó que presenta el mismo fenotipo. Sin embargo, en estas líneas el cromosoma III es el original de la línea parental *slo⁴* y todavía podría acarrear mutaciones en genes cercanos al locus *slo*, potencialmente afectados por la inversión *In3R(slo4)*.

Asimismo, esta inversión podría afectar la transcripción del gen que se encuentra en el extremo opuesto, *enhancer of split -E(spl)-*. Dado que este locus codifica para un factor de transcripción involucrado en desarrollo del sistema nervioso (Preiss et al., 1988) (Hartley et al., 1988) podría ser un factor adicional contribuyendo al fenotipo de *slo⁴*. En la figura **1.2** se muestra la posición de *E(spl)* en el cromosoma 3R. Para descartar la contribución de alguno de los otros genes potencialmente afectados por *In3R(slo4)*, utilizamos líneas con deleciones en distintos fragmentos del cromosoma III, en la región lindante a esta inversión, denominadas *deficiencias -Df-* (ver glosario). Existen varios cientos de *deficiencias* disponibles a partir de centros repositorios internacionales, las cuales han sido mapeadas a regiones precisas del genoma.

Como se ve en la figura **1.4**, donde se muestra un esquema de las regiones cromosómicas afectadas por cada una de las seis *Df* utilizadas, sólo la línea 1972 remueve por completo el locus *slo*. Las líneas 3345 y 5601 abarcan la región 96F, donde se ubica *E(spl)*. Si bien ninguna de las otras líneas se encuentra lo suficientemente cerca de los límites de la

inversión como para afectar a *slo* o E(*spl*), existe cierta indeterminación en cuanto a los límites exactos de las líneas 2366 y 2363. Las indeterminaciones en las deleciones se indican con líneas punteadas en la figura 1.4.

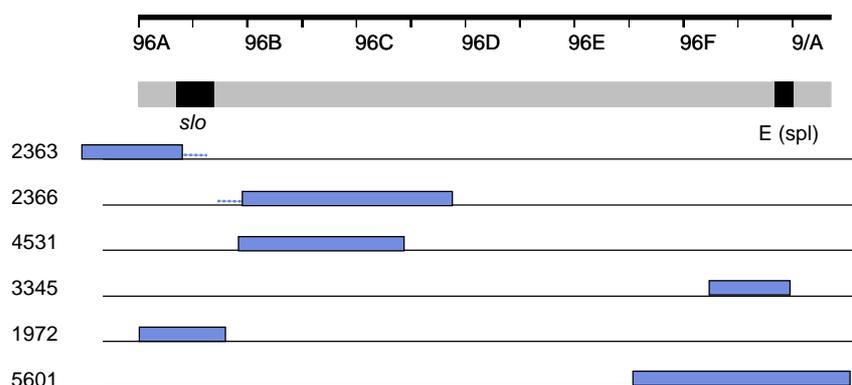


Figura 1.4.- Regiones del cromosoma 3R afectadas por cada una de las Deficiencias (Df) cercanas a la inversión *In3R(slo4)*. La región 96 del cromosoma 3R se divide en las áreas 96 A-F, flanqueadas por la región 95F y 97A. Dado que el gen *slowpoke* se encuentra en la región 96A 17-20, la única *Df* que lo remueve completamente es la línea 1972. El extremo opuesto de la inversión involucra al gen E(*spl*), que es removido por las *Df* 3345 y 5601. Las líneas punteadas adyacentes a cada *Df* representan zonas de indeterminación de sus límites.

Dado que entre las distintas líneas cubren casi la totalidad de la región abarcada por la *In3R(slo4)*, la contribución de cualquier otro gen de esta región en la arritmicidad de *slo⁴* debería manifestarse al analizarlas en transheterocigosis. Los porcentajes de ritmicidad de cada una de estas líneas cruzadas por *slo⁴* permiten descartar la contribución de alguno de los genes comprendidos en la inversión, ya que únicamente la línea 1972 presenta un fenotipo comparable al de *slo⁴* (FIGURA 1.5). La línea 2362, la única otra *Df* que presenta un porcentaje de ritmicidad en OO menor al 50%, muy probablemente está afectando la transcripción de *slo*, ya que la imprecisión reportada está precisamente en la región 96A 14, donde se encuentra la región regulatoria de este locus.

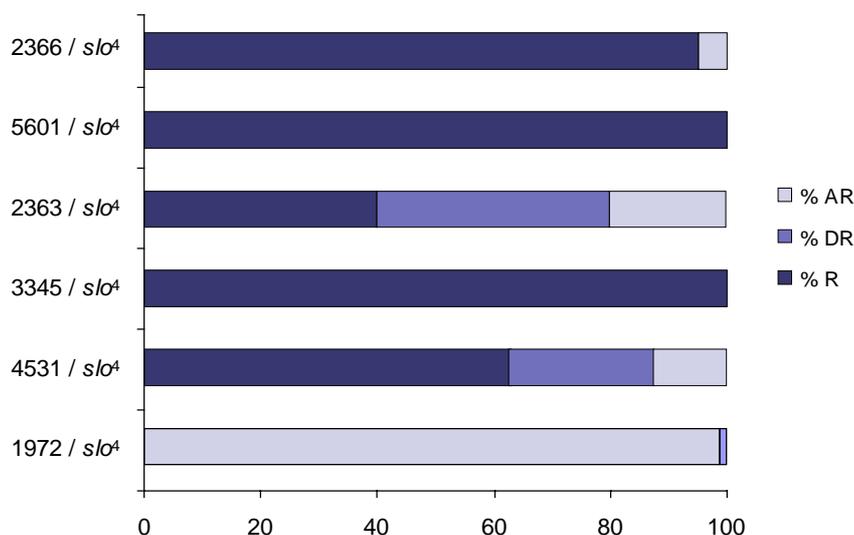


Figura 1.5.- Ninguna de las *Df* que no afectan al gen *slo* presenta alteraciones en su ritmicidad comportamental. Las barras corresponden a las categorías indicadas en la figura 1.3. Todas las líneas fueron analizadas en transheterocigocis con *slo*⁴. La línea 1972, la única que remueve por completo el gen *slo*, presenta un porcentaje de ritmicidad similar al de *slo*⁴. Las líneas que afectan *E(spl)* son indistinguibles de la línea control, CS. Entre 8 y 16 individuos se analizaron en tres experimentos independientes.

Por otro lado, las líneas que abarcan la región donde se encuentra ubicado *E(spl)*, 3345 y 5601, son completamente rítmicas, lo que demuestra que aún en caso de que la inversión genere una deleción en este gen, ésta no contribuye al defecto comportamental. Estos resultados, junto con el análisis de las líneas *slo*¹ y *slo*¹/*slo*⁴, permiten corroborar que la arritmicidad de *slo*⁴ se debe específicamente a la mutación en el gen que codifica para el canal.

1.3.- La falta de expresión de *slo* en el sistema nervioso central (SNC) es responsable de la arritmicidad comportamental.

El patrón general de expresión de *slowpoke* se determinó utilizando anticuerpos específicos, hibridización *in situ* y distintas construcciones con genes reporteros (Becker et al., 1995; Brenner et al., 1996; Chang et al., 2000). Fue detectado en sistema nervioso central y periférico, además de músculos, tráqueas y en menor medida el ojo y parte del aparato digestivo. La región de control transcripcional de *slo* abarca un fragmento de 11 kb de ADN genómico y su organización es extremadamente compleja (Brenner et al., 1996). En la última década se identificaron múltiples promotores específicos de tejido; la expresión neuronal y en el sistema digestivo proviene de promotores independientes mientras que la expresión muscular y traqueal proviene de un promotor común (Atkinson et al., 1998; Bohm et al., 2000; Brenner et al., 1996; Brenner y Atkinson, 1996; Thomas et al., 1997).

En la figura 1.6 se muestra un esquema de la región de control transcripcional del locus *slo*. Los dos primeros promotores, C0 y C1, dirigen la expresión del canal en el sistema nervioso del adulto y también en estadios larvales y embrionarios. El promotor C2 es suficiente para la expresión en músculos y tráqueas, mientras que los promotores C1 B y C dirigen la expresión en el intestino.

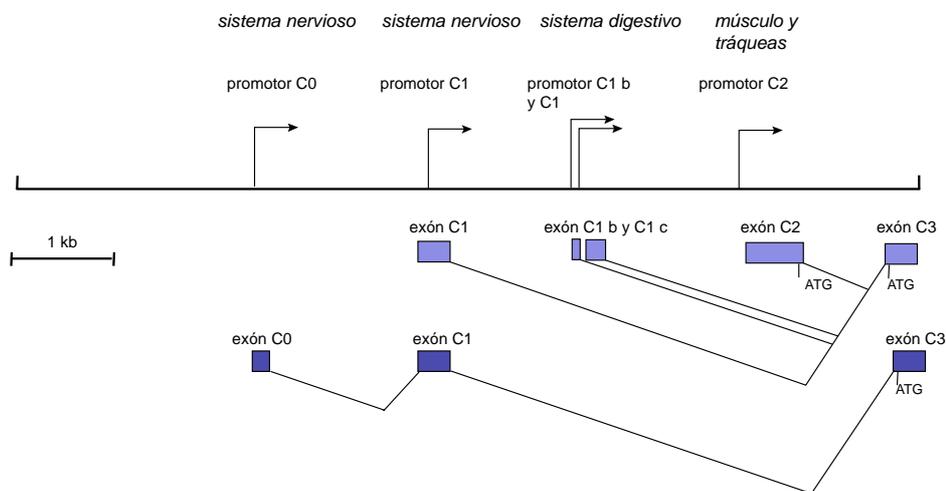


Figura 1.6.- Mapa de la región transcripcional de *slowpoke*. La línea negra horizontal representa ADN genómico y los guiones verticales los sitios de corte de enzimas de restricción comunes. Cada una de las flechas representa un promotor tejido específico. Los cuadros azules de la región inferior representan cada uno de los exones alternativos usados por los distintos promotores, y las líneas conectivas indican patrones de *splicing* (adaptado de Atkinson et al. 2000).

Para determinar la contribución relativa de la expresión neuronal y no neuronal de *slo* a la arritmicidad comportamental se utilizó una delección que remueve por completo los promotores neuronales del canal, Co y C1. Esta línea fue aislada originalmente como una mutación en un gen contiguo conocido como *Ash* (absent, small or homeotic eyes) (Shearn et al., 1971). Ni la función de *Ash* ni los fenotipos que ocasiona su mutación están en absoluto relacionados con la función del canal¹³; sin embargo, el hecho de que esta mutación remueva parte de su región promotora (Adamson y Shearn, 1996) hace de este alelo, *Ash2*¹⁸, una herramienta sumamente útil para estudiar los efectos diferenciales de la expresión de *slo* en distintos tejidos.

La presencia del promotor C2 y el intrón que se encuentra río abajo (FIGURA 1.6) ha demostrado ser suficiente para la expresión del canal en músculo y tráqueas (Brenner et al., 1996; Brenner y Atkinson, 1996). Esta es la única región conservada en *Ash2*¹⁸, y se demostró que la expresión del canal obtenida a partir de los promotores conservados en esta línea mutante es suficiente para rescatar un fenotipo comportamental asociado al defecto muscular de *slo*⁴. Por el contrario, al analizar estas líneas en un paradigma comportamental que pone en evidencia el defecto que provoca la falta del canal en sistema nervioso, el desempeño de la línea *Ash2*¹⁸/*slo*⁴ fue indistinguible del de *slo*⁴ (Atkinson et al., 2000).

Dado que los experimentos mencionados demuestran que la línea *Ash2*¹⁸/*slo*⁴ es una herramienta sumamente útil para determinar la contribución de la expresión neuronal y no neuronal de *slo* a distintos fenotipos comportamentales, se analizó su patrón de actividad locomotora (FIGURA 1.7.A). Mientras que *Ash2*¹⁸ en heterocigocis presenta un porcentaje de ritmicidad similar al del control (FIGURA 1.7.C), *Ash2*¹⁸/*slo*⁴ no es significativamente distinto de *slo*⁴. Si bien tanto el valor de FFT de esta línea como la proporción de individuos clasificados como débilmente rítmicos es mayor que en *slo*⁴ homocigota, el porcentaje de individuos con un patrón de ritmicidad normal es extremadamente bajo respecto del control. Estos resultados demuestran que la expresión del canal a partir de sus promotores musculares no es suficiente para rescatar la arritmicidad de *slo*⁴.

¹³ *Ash* es uno de los miembros del grupo de genes *Tritorax*, y fue identificado en un *screen* genético donde se buscaban mutaciones involucradas en discos imaginales en la larva (Adamson and Shearn, 1996).

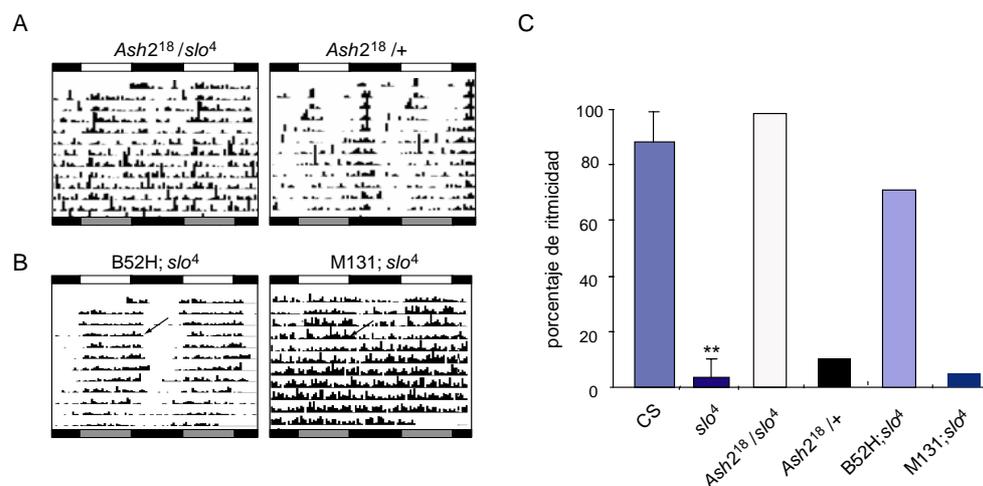


Figura 1.7.- La expresión de *slo* en SNC es necesaria y suficiente para rescatar la arritmicidad del mutante nulo. Los experimentos se realizaron tal como se describe en materiales y métodos. Las flechas indican el momento del pasaje a condiciones constantes (A) Actogramas representativos de la línea *Ash2¹⁸* tanto en heterocigocis con la línea salvaje, CS, y como en transheterocigocis con *slo⁴*. La expresión de *slo* en el transheterocigota a partir de sus promotores no neuronales no es suficiente para rescatar la arritmicidad de *slo⁴*. (B) Actogramas correspondientes a las líneas transgénicas, M131 y B52, que expresan las variantes de *slo* más comunes en tejido muscular y neuronal, respectivamente, en el *background* genético de *slo⁴*. (C) Porcentajes de ritmicidad en condiciones constantes. El número de individuos analizados se describe en la tabla 1.1.

Además de la diversidad que le otorga al locus *slo* la posibilidad de utilizar distintos promotores específicos de tejido, posee una enorme cantidad de variantes alternativas de procesamiento. Este procesamiento diferencial del gen afecta principalmente el extremo carboxiterminal de la proteína, el cual se ha involucrado en la sensibilidad a los niveles de calcio intracelular (Schreiber et al., 1999). Además, provee a la célula de un modo de expresar canales con un ajuste fino a sus necesidades específicas y se ha mostrado que afecta la conductancia, sensibilidad a calcio y distribución de los sitios de fosforilación (Lagrutta et al., 1994). En mamíferos, se ha demostrado que el procesamiento alternativo de *slo-1* está regulado en respuesta a stress u hormonas (Erxleben et al., 2002; Lovell y McCobb, 2001; Xie y McCobb, 1998).

En *Drosophila*, se ha demostrado que *slowpoke* tiene al menos cinco sitios de procesamiento diferencial del mRNA (Adelman et al., 1992; Atkinson et al., 1991; Atkinson et al., 1998; Chang et al., 2000; Lagrutta et al., 1994) dando potencialmente origen a 1536 polipéptidos distintos, de las cuales sólo se han identificado 132 variantes específicas de tejido (Yu y Atkinson, datos no publicados), y la utilización diferencial de muchas de esas variantes en distintos momentos del desarrollo (Yu et al., 2006).

A partir de las distintas variantes se generaron en el laboratorio de Nigel Atkinson (Atkinson et al., 1998; Brenner et al., 2000) dos líneas transgénicas que expresan las variantes de procesamiento de ARNm más comunes en tejido neuronal y muscular. Estas líneas, denominadas B52 y M131 respectivamente, difieren en los sitios de edición alternativa 3,4 y 5 (FIGURA 1.8)¹⁴. Estos cambios alteran 64 aminoácidos de los aproximadamente 1.200 que tiene la proteína. Todos ellos se encuentran en el extremo carboxi terminal, cercanos al sensor de calcio putativo (Wei et al., 1994).

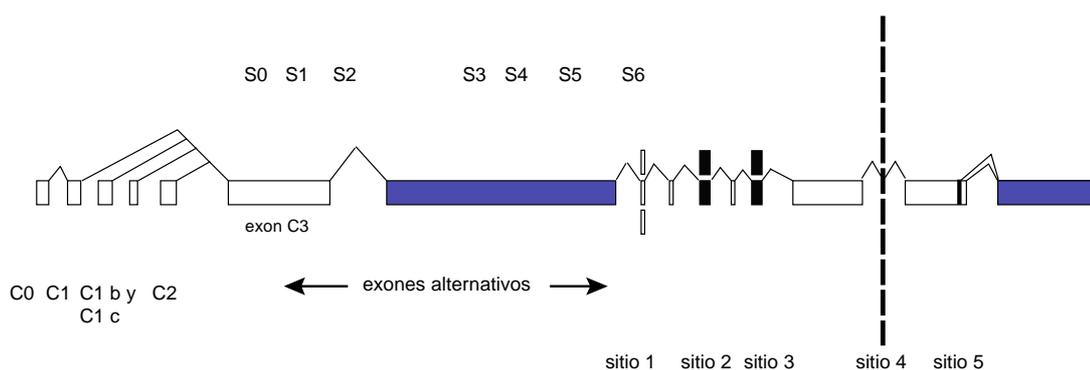


Figura 1.8.- Mapa de *splicing* de *slowpoke*. La gran diversidad del canal *slo* proviene de sus múltiples posibilidades de *splicing* alternativo. Los cuadros blancos y azules representan exones utilizados en todas las variantes de ARNm. Los cuadros negros son exones alternativos que provienen de un uso diferencial de los promotores, tal como se muestra en la figura 1.5. (exones C0, C1, C1b, C1c y C2) o de *splicing* alternativo (exones en los sitios 1,2,3,4 y 5). La línea punteada en el sitio 4 representa 11 distintos patrones de *splicing* producidos por combinaciones de seis exones pequeños. Los cuadros en azul representan regiones en las que no ocurre *splicing* alternativo pero cuyo número exacto de exones no está determinado con certeza. Las líneas conectivas representan patrones de *splicing*. Los rótulos S1 a S6 indican áreas que codifican para dominios transmembrana putativos (adaptado de Atkinson et al. 2000)

¹⁴ Además, la línea B52 es una fusión entre el cDNA que codifica para la variante neuronal de *slo* río abajo de un promotor que puede ser inducido por temperatura (Hsp70) mientras que la línea M131 es una construcción en la que el cDNA de la variante muscular del canal fue clonado río abajo del promotor completo de *slo* (Chang et al., 2000).

Registros electrofisiológicos en músculo de vuelo muestran que mientras que la expresión de la variante muscular del canal es capaz de complementar el fenotipo de *slo^Δ* (ensanchamiento del potencial de acción evocado en músculo de vuelo) para todas las frecuencias de estimulación, la expresión de la variante neuronal sólo puede complementarlo para frecuencias muy bajas (Brenner et al., 2000). Además, se encontró que únicamente M131, y no B52, es capaz de rescatar el fenotipo (Atkinson et al., 1998; Brenner et al., 2000), lo cual es consistente con la falta de función de este canal en forma específica de tejido (en este caso, músculo).

Al analizar estas líneas en actividad locomotora se encontró que sólo la línea B52, que expresa la versión neuronal de *slo*, es capaz de rescatar la arritmicidad de *slo^Δ*. Los actogramas de B52 y M131 revelan que el defecto comportamental de *slo^Δ* persiste al restaurar a esta línea la expresión de la versión muscular, tanto en LO como en OO (FIGURA 1.1.B). La expresión de la versión neuronal, por el contrario, es suficiente para complementar el fenotipo. Mientras que su porcentaje de ritmicidad en OO no es significativamente distinto del de la línea control, el de la línea M131 es tan bajo como el de *slo^Δ* (FIGURA 1.8).

La observación de que la expresión de la variante de splicing muscular del canal no logra complementar el defecto apoya, junto al resultado obtenido con la línea *Ash2¹⁸/slo^Δ*, la noción de que la expresión de *slo* en músculo no contribuye al fenotipo comportamental. Además, la ritmicidad de la línea B52 demuestra que la expresión de la variante del canal más común en sistema nervioso es suficiente para restaurar la arritmicidad comportamental del mutante en *slo*.

1.4.- El ritmo de emergencia del pupario también está afectado en *slo^Δ*.

Además de la actividad locomotora, la única otra manifestación comportamental importante del reloj circadiano en *Drosophila* es la ecdisis -*eclosión* del adulto-. Aunque esto sucede una sola vez en la vida de un individuo, los múltiples eventos que ocurren a lo largo de los días en una población son considerados un *ritmo* (Skopik y Pittendrigh, 1967).

Los primeros experimentos que describen este comportamiento fueron reportados hace más de cuarenta años, y se realizaban manualmente. Aunque actualmente en algunos trabajos todavía se utiliza este método, existe un sistema automatizado para monitorear el ritmo de eclosión que se basa en un mecanismo similar al de actividad locomotora (ver materiales y métodos). Se sabe que el ritmo de eclosión de una línea silvestre también tiene un período cercano a 24 horas, y que la mayor parte de los eventos ocurre durante el día (o el día subjetivo). Se considera que la *fase* del ciclo circadiano en la cual las células marcapasos reciben un estímulo determina en momento de la eclosión¹⁵ (Pittendrigh y Skopik, 1970). En *Drosophila*, la estructura que está involucrada en este comportamiento es la glándula protorácica (PG).

Además de que mantiene un período circadiano en condiciones constantes, el ritmo de eclosión desaparece en ausencia de un oscilador circadiano funcional, como es el caso de los mutantes en los genes canónicos del reloj *per* (Konopka y Benzer, 1971) o *tim* (Sehgal et al., 1994). Por otra parte, las moscas *disconnected*, que carecen en su mayoría de las neuronas laterales ventrales, también son arrítmicas en eclosión (Dushay et al., 1989; Helfrich-Forster, 1998), aunque la presencia de estas células no es suficiente para generar ritmicidad en este comportamiento¹⁶ (Dushay et al., 1989).

Dado el severo fenotipo que presenta la línea *slo⁴* en actividad locomotora, se estudió la posibilidad de que también el ritmo de eclosión estuviera afectado por esta mutación (existen mutaciones que afectan diferencialmente las salidas del reloj, como la línea *ebony*, que es arrítmica en actividad locomotora pero rítmica en eclosión (Newby y Jackson, 1991), o *lark*, que tiene el fenotipo opuesto). Para ello se sincronizaron los adultos en ciclos de LO

¹⁵ -El modelo propuesto originalmente (Pittendrigh, 1954) consistía en dos osciladores; uno que funciona como marcapasos, el oscilador "A", compensado para temperatura y sincronizable por luz, y otro, el oscilador "B" que es controlado por A y no es compensado para temperatura ni sincronizable por luz. El oscilador B mantendría una relación de fase estable con el ambiente porque estaría controlado por el oscilador A, que sí es sensible a la luz y capaz de sincronizarlo. Es la fase del oscilador B la que en última instancia controlaría el momento de la eclosión

¹⁶ - Sin embargo, son necesarias, ya que tanto la sobreexpresión del gen pro apoptótico *hid* bajo el promotor del neuropéptido *pdf*, que se expresa específicamente en las LNvs, como una mutación nula en este neuropéptido, provocan arritmicidad en actividad locomotora y eclosión (Myers et al., 2003). Este conjunto de datos dio origen a un modelo muy similar al propuesto por Pittendrigh, donde el oscilador A serían las NLvps y el oscilador B sería la PG. Otros osciladores "periféricos", como los presentes en las antenas (Krishnan et al., 1999) o los túbulos de Malpighi (Giebultowicz et al., 2000; Hege et al., 1997), no dependen de la función de las sLNvs. Por otro lado, existen evidencias anatómicas que sugieren que los axones de las NLvps inervarían indirectamente la PG (Siegmund and Korge, 2001).

durante una semana, y luego colocamos prepupas, pupas y larvas de tercer estadio (ANEXO 2) en los monitores de eclosión, en oscuridad constante. Esto permitió registrar el patrón de eclosión durante cinco días, intervalo mínimo de tiempo necesario para poder obtener un periodograma mediante el software comercial *clocklab* (ver materiales y métodos).

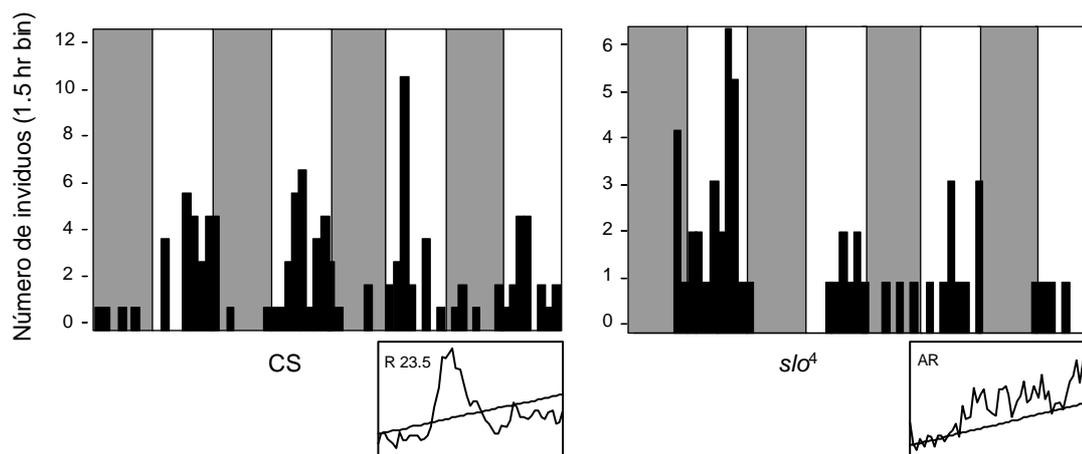


Figura 1.9- El ritmo de eclosión también está alterado en *slo4*. Pupas y larvas de tercer estadio sincronizadas desde estadios embrionarios fueron colocadas en monitores de eclosión (ver materiales y métodos) durante el último día del ciclo de LO, a 25°C, e inmediatamente transferidas a condiciones constantes, donde se monitoreó el patrón de eclosión durante cuatro días. Los datos se obtienen cada 30 minutos. Los experimentos fueron repetidos entre 3 y 5 veces, y en cada caso se monitorearon entre 300 y 400 individuos. Los gráficos muestran patrones de eclosión de un experimento representativo para las líneas CS y *slo4*. Las barras grises indican la fase de la noche subjetiva, las blancas la fase del día subjetivo. Los periodogramas se obtienen por un análisis de Chi cuadrado, mediante el software *clocklab*.

El patrón de eclosión obtenido para cada genotipo revela que mientras que la línea control eclosiona durante las primeras horas del día subjetivo durante todos los días que duró el experimento, las moscas mutantes en *slo* presentan un patrón sumamente irregular (FIGURA 1.9). Si bien durante el primer día en OO parecen salir en las primeras horas, el resultado global es que son arrítmicas. Mientras que para CS el período que se obtiene es

similar al de actividad locomotora (FIGURA 1.9.C), en el caso de *slo*⁴ el programa no puede detectar ningún período asociado al patrón de eclosión.

Estos resultados demuestran que el ritmo de eclosión también está alterado en ausencia de *slo*. El que esta mutación afecte las dos manifestaciones comportamentales más importantes del reloj circadiano sugiere que el defecto probablemente ocurra a nivel de las oscilaciones moleculares.

CAPÍTULO 2.- La mutación en *slo* afecta diferencialmente los osciladores circadianos.

En el capítulo anterior se describió el efecto de la mutación en *slo* sobre las dos manifestaciones comportamentales más importantes del reloj circadiano en *Drosophila*, la ritmicidad en actividad locomotora y eclosión. En general, cuando se identifica una línea que presenta el severo grado de arritmicidad que se observa en *slo*⁴, se trata de una mutación en uno de los genes que componen la maquinaria molecular del reloj¹⁷, por lo que la causa de las alteraciones comportamentales es la incapacidad por parte de las neuronas marcapasos de mantener las oscilaciones moleculares en condiciones constantes.

Si bien es precisamente la capacidad de sostener la ritmicidad en condiciones constantes lo que es característico de la presencia de un reloj funcional, es posible identificar en ciclos de luz y oscuridad las manifestaciones de los distintos osciladores. Como se describió en la introducción general, el comportamiento de *Drosophila* bajo ciclos de LO es la resultante de la respuesta directa a la luz más el efecto del reloj circadiano. La capacidad de responder a las transiciones de oscuridad a luz y de luz a oscuridad depende fundamentalmente de la integridad de las estructuras de fotopercepción (Rieger et al., 2003), mientras que la capacidad de *anticipar* estas transiciones es inherente al funcionamiento de los osciladores circadianos.

Los experimentos que se describen en este capítulo tienen como objetivo determinar a que nivel se encuentra el defecto que provoca la ausencia de *slo* en la integridad de los osciladores circadianos.

¹⁷- Sin embargo, se han encontrado mutantes arrítmicos donde lo que está afectado no es el reloj molecular sino la *salida* de información desde el reloj (Dockendorff et al., 2002; Williams et al., 2001). El problema es que en algunos de estos casos se miraron las oscilaciones en la cabeza entera, y esto no permite distinguir específicamente cuales de los osciladores que componen las mas de 100 neuronas marcapasos del cerebro siguen funcionando y cuales no. Un claro caso de *desacoplamiento* entre lo que ocurre a nivel de la cabeza entera y del reloj central es el mutante en *cry* (Emery et al., 2000a; Emery et al., 2000b; Stanewsky et al., 1998). Estas moscas son rítmicas en actividad locomotora, pero cuando se estudiaron las oscilaciones de *per* y *tim* mediante *western blots* en cabezas se encontró que estaban alteradas. Sin embargo, las oscilaciones moleculares en las NLvps estaban en fase, y eso resultó ser suficiente para el control de la ritmicidad comportamental.

PARTE I.- El funcionamiento del reloj molecular no está alterado en ausencia de *slo*

2.1.- La mutación en *slo* no afecta al oscilador **M**.

La hipótesis más plausible ante una mutación que genera el severo grado de arritmicidad comportamental que presenta *slo⁴* es que ésta altera el funcionamiento de las células marcapasos. En particular, de las NLvps, el oscilador **M**, cuyo funcionamiento adecuado es esencial para la ritmicidad en condiciones constantes. Para determinar si las oscilaciones moleculares en estas células están preservadas en *slo⁴*, se analizó el patrón temporal de localización subcelular de PER y TIM a lo largo del tercer día después de que las moscas fueran transferidas a condiciones constantes. En la figura **2.1.A** se muestra un esquema del diseño experimental. Las horas transcurridas durante el ciclo de LO se indican como ZT (tiempo dado por el sincronizador ambiental, *Zeitgeber time*) y las horas transcurridas desde el inicio del *día subjetivo* –el momento en que se hubiera encendido la luz de haber estado aún en LO- como CT (tiempo circadiano, *circadian time*)¹⁸.

Dado que tal como se describió en la introducción existen varios cientos de células en el cerebro del adulto que expresan *per* y *tim*, se realizó una doble tinción con un anticuerpo específico para el neuropéptido PDF para identificar unívocamente las NLvs. Este neuropéptido se expresa únicamente en dos de los grupos de neuronas del

¹⁸-En esta figura y en todos los experimentos posteriores de curso temporal en OO se utiliza la nomenclatura ZT/CT para referirse a la cantidad de horas desde el inicio del día. En este sentido corresponde hacer algunas aclaraciones: mientras que en LO el tiempo esta dado indefectiblemente por la fase del *Zeitgeber*, en condiciones constantes se hace referencia a un tiempo “interno” y por eso éste debería normalizarse al período endógeno de cada uno de los genotipos. “CT₅” no representa el mismo momento para una línea con un período endógeno de 24 horas que para una línea con un período de 21 horas, y lógicamente esta diferencia aumenta a medida que pasan los días en OO. En el caso de *slo⁴*, como en toda línea arrítmica, no correspondería la utilización de la nomenclatura CT dado que no existe un período endógeno respecto del cual normalizar la actividad. Por razones de simplicidad en la representación de las figuras se conservó esta nomenclatura, pero es importante tener en cuenta que en realidad corresponde a cantidad de horas transcurridas en OO. De este modo, el tiempo “CT₀” para el tercer día en OO representa en realidad que para cada genotipo transcurrieron 72 horas desde la última vez que se encendió la luz.

circuito circadiano¹⁹: las *neuronas laterales ventrales pequeñas* (LNvps) y las *neuronas laterales ventrales grandes* (LNvgs) (FIGURA 2.1.B). A su vez, éstas pueden distinguirse entre sí por su tamaño, forma, y la posición de sus somas. En los casos en los que se estudió simultáneamente el perfil de PER y TIM se utilizó un anticuerpo específico contra PAP, el pro péptido que da origen a PDF mediante el clivaje de su extremo amino terminal. Ambos péptidos se expresan en las mismas células²⁰, y sólo difieren levemente en su localización en el citoplasma, más discontinua en el caso de PAP.

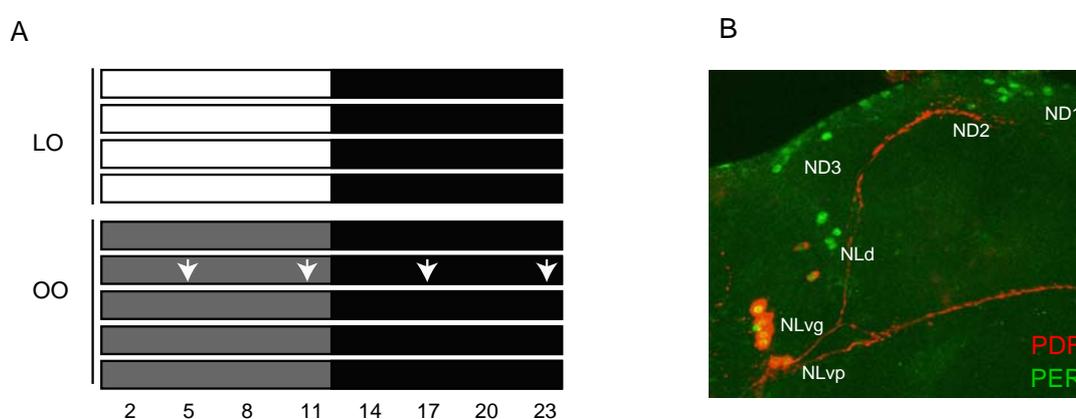


Figura 2.1.- Esquema de los experimentos de curso temporal. (A) Representación esquemática de los experimentos de curso temporal. Moscas jóvenes (0-5 días) se sincronizan en ciclos de LO durante 5 días y luego se transfieren a condiciones constantes. Las barras blancas corresponden al día, las negras a la noche, las grises al día subjetivo y las negras a la noche subjetiva. Las flechas indican los tiempos en los que las muestras se obtienen. (B) El anticuerpo contra el neuropéptido PDF se utiliza para identificar específicamente a las NLvs dentro de las más de 100 neuronas que expresan los genes del reloj en el cerebro del adulto. La imagen corresponde a un cerebro de un individuo silvestre ($y w$) que fue disecado al final de la noche (ZT 23) luego de 4 días de entrenamiento en LO. Mientras en ésta condición PER (señal verde) puede detectarse en todos los grupos de neuronas del circuito circadiano, LNvs grandes y pequeñas, NLds, ND1,2, y 3, PDF sólo se detecta en las NLvs (señal roja).

¹⁹- En realidad, PDF también se expresa en un grupo de neuronas en el tritocerebro que envían sus proyecciones a lo largo de la línea media hacia la *pars intercerebralis*, pero en estas células no se ha detectado expresión de ninguno de los genes canónicos del reloj.

²⁰- PAP es el pro péptido que da origen a PDF, y ambos anticuerpos han sido usados indistintamente para marcar este circuito.

Al analizar las oscilaciones moleculares no se detectaron diferencias en cuanto a la localización subcelular de PER ni de TIM entre *slo⁴* y la línea control (FIGURA 2.2.A). Típicamente, PER se encuentra exclusivamente localizada en el núcleo en CT5 y su intensidad comienza a disminuir hacia CT11, el final del día subjetivo. En CT17 se localiza predominantemente en el citoplasma, y finalmente se vuelve a encontrar exclusivamente en el núcleo en CT23. En el caso de TIM, como su degradación ocurre mucho más rápidamente que la de PER, no se detecta señal aún en CT5²¹. Para los puntos de la noche subjetiva el patrón de localización subcelular de TIM fue muy similar al de PER; citoplasmático en CT17 y exclusivamente nuclear en CT23. Este experimento fue repetido entre 3 y 7 veces, con resolución temporal igual o mayor a la que se muestra en la figura 2.2 (6 horas), con idénticos resultados.

Para corroborar la observación cualitativa de que no existían diferencias entre CS y *slo⁴* en cuanto a la localización subcelular de las proteínas del reloj, se cuantificó entre la intensidad de la señal nuclear respecto de la citoplasmática para cada uno de los puntos del experimento anterior, utilizando el software *Image J*. Para esto se promediaron los cocientes N/C para cada una de las NLvps para cada cerebro, y se promedió el valor obtenido para todos los cerebros de cada genotipo para cada uno de los tiempos analizados (ver materiales y métodos). Esto permitió confirmar que las oscilaciones en el patrón temporal de expresión tanto de PER como de TIM en el tercer día de OO entre *slo⁴* y la línea control no son significativamente diferentes (FIGURAS 2.2.B y C).

²¹- En condiciones de luz y oscuridad se sabe que TIM es degradado mediante su interacción con el criptocromo de luz azul, CRY (Ceriani et al., 1999; Emery et al., 2000b; Ivanchenko et al., 2001), pero se desconocen los mecanismos que median su degradación en OO. Mientras que en presencia de luz TIM se degrada en 15 minutos, en OO recién desaparece alrededor de CT2.

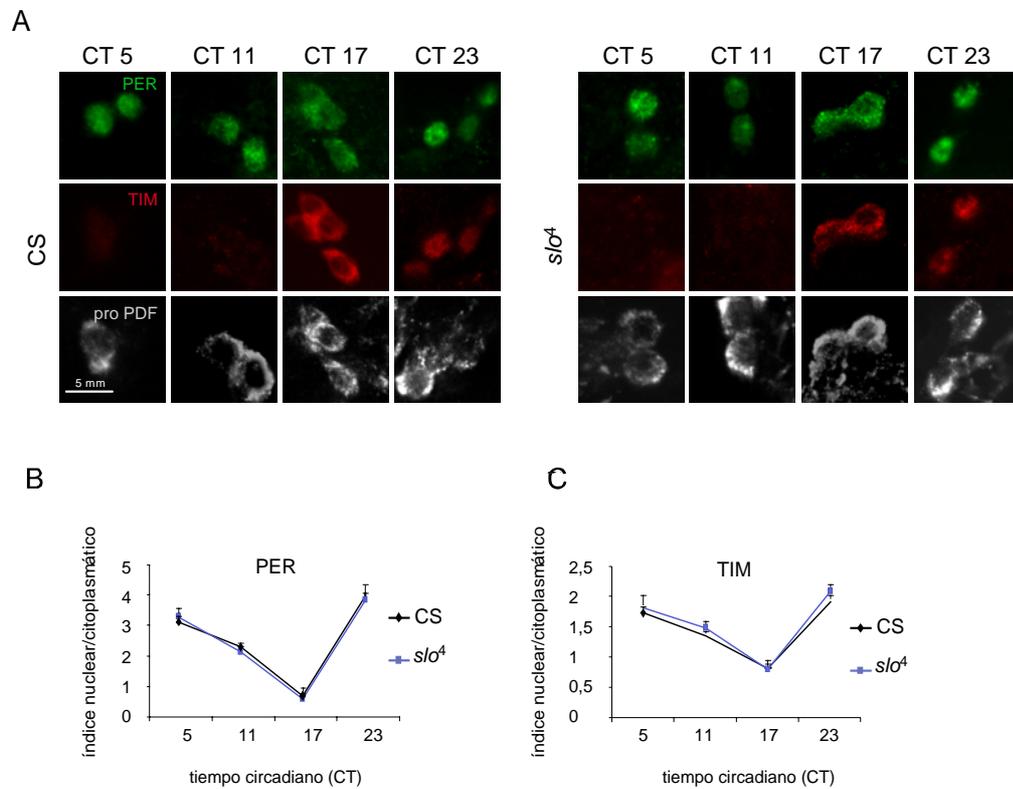


Figura 2.2.- Las oscilaciones moleculares en las principales neuronas marcapasos no están afectadas en *slo⁴*. Moscas recién eclosionadas (0-5 días) fueron sincronizadas en LO y las muestras fueron tomadas en el tercer día en condiciones constantes. Un mínimo de 12 cerebros se analizó por punto y por genotipo. (A) Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de cerebros en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar el patrón de distribución de TIM (rojo) o PER (verde) en los puntos CT5, CT11, CT17 y CT23. PAP (pro PDF, señal gris) se utilizó como marcador para identificar unívocamente las NLvs en los cerebros de moscas CS (panel izquierdo) y *slo⁴* (panel derecho). Los experimentos se repitieron de 3 a 5 veces con idénticos resultados. (B-C) Cuantificación de la localización nuclear/citoplasmática de las proteínas PER (B) y TIM (C) en CC y *slo⁴*. Las barras indican el error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos (ANOVA, $p > 0.05$). Los detalles de la cuantificación se describen en materiales y métodos.

2.2.- La sincronización bilateral no está afectada en *slo*⁴

Si bien el rol del otro grupo de células del sistema circadiano que expresan PDF, las *neuronas laterales ventrales grandes* (NLvgs), no está claramente establecido, evidencias anatómicas sugieren que podrían estar involucradas en la sincronización bilateral, dado que estas células envían sus axones contralateralmente hacia el lóbulo óptico del hemisferio opuesto (Helfrich-Forster, 2005). A partir de la observación de que los axones provenientes de las NLvgs de cada hemisferio potencialmente contactan las NLvps (FIGURA 2.1.B) se ha sugerido que podrían contribuir a la señalización que permite mantener a este último *cluster* oscilando en fase. Además, se ha reportado que las NLvgs también expresan el receptor putativo de PDF, aunque existen divergencias en este sentido²².

Por otro lado, en la línea mutante en el gen *sine oculis* (*so*) se observan alteraciones severas en las proyecciones contralaterales de las NLvgs, y estas moscas son arrítmicas en actividad locomotora (Helfrich-Forster y Homberg, 1993). Llamativamente, incluso en algunos casos se produce una disociación en la consolidación de la actividad denominada *splitting*, que podría explicarse a partir de una alteración en el acoplamiento entre los osciladores presentes en cada hemisferio (Dushay et al., 1989; Helfrich C, 1986). Sin embargo, en general se considera que las NLvgs no tienen un rol relevante en la ritmicidad comportamental en condiciones constantes, ya que ésta no se ve afectada por la sobreexpresión de genes apoptóticos en estas células y la expresión de *per* en las NLvps en el *background* del mutante nulo es suficiente para rescatar la ritmicidad en actividad locomotora²³ (Grima et al., 2004). Respecto de las oscilaciones moleculares, en distintos trabajos se ha reportado que en estas células no existen variaciones temporales en cuanto a la localización

²²- En 2005 tres artículos reportaron simultáneamente la identificación del gen que codifica para el receptor de PDF, pero los datos obtenidos con los distintos anticuerpos utilizados fueron disímiles (Hyun et al., 2005; Lear et al., 2005b; Mertens et al., 2005). Hyun et al. (2005) y Mertens et al. (2005) encontraron colocalización entre PDFR y estructuras circadianas, pero sólo el primer grupo reportó la expresión de PDFR en las NLvgs.

²³- Además, los efectos de las mutaciones en *Clock* y *cycle* en los niveles de ARNm de *pdf* (las NLvps son indetectables tanto con un anticuerpo específico contra PDF como mediante hibridización *in situ* con una sonda específica en estos mutantes) se ven en las neuronas ventrales pequeñas pero no en las grandes (Park et al., 2000).

subcelular de PER ni de TIM en OO (Shafer et al., 2002; Yang y Sehgal, 2001), aunque sí en ciclos de LO (Shafer et al., 2002).

Para descartar la posibilidad de que una alteración en el patrón de expresión de los genes del reloj en estas células “desacopla” los hemisferios cerebrales resultando en los defectos comportamentales observados, se estudió el patrón de expresión de PER y TIM en las NLvgs según un análisis análogo al realizado en las NLvps. En este caso tampoco se encontraron diferencias entre *slo⁴* y CS en la expresión de ninguna de estas proteínas (FIGURA 2.3). En nuestros experimentos pudo detectarse una leve oscilación en cuanto a la intensidad de señal de PER en ambas líneas, aunque esta señal se encontró siempre en el núcleo, lo cual es consistente con lo reportado por Shafer *et al.* (2002).

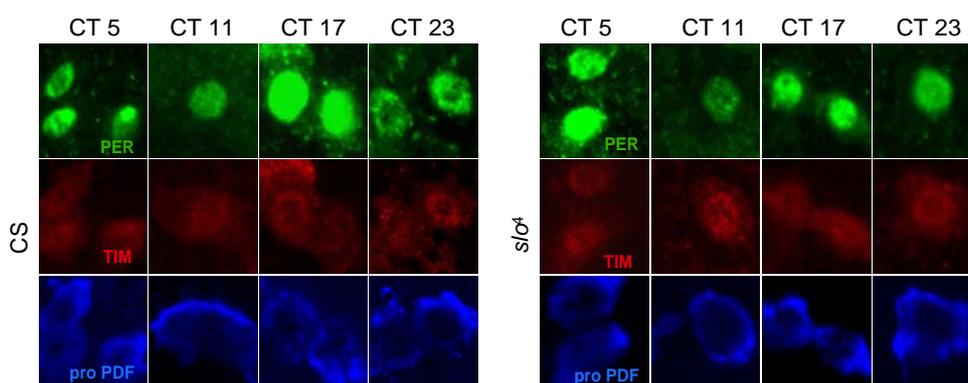


Figura 2.3.- El patrón de distribución de PER y TIM en las NLvgs no está alterado en *slo⁴*. El experimento fue realizado según se describe en la figura 2.2.A. Un mínimo de 12 cerebros se analizó por punto y por genotipo. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de cerebros en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar el patrón de distribución de TIM (rojo) o PER (verde) en los puntos CT5, CT11, CT17 y CT23. PAP (pro PDF, señal azul) se utilizó como marcador. No se encontraron diferencias en el patrón de distribución de PER ni de TIM en estas condiciones.

2.3.- Las oscilaciones moleculares persisten aún tras varios días en libre curso.

El hecho de que a pesar de la arritmicidad comportamental de *slo⁴* no se observaran alteraciones en el funcionamiento del reloj sugería que el defecto ocasionado por la falta del canal podría encontrarse en la *salida* de información hacia las vías eferentes.

Además, el hecho de que las oscilaciones tanto de PER como de TIM se encuentren en la fase establecida por el *Zeitgeber* permite descartar un problema en la *entrada* de información desde el ambiente hacia el reloj molecular.

En este sentido, una hipótesis a contrastar era que la alteración en la *salida* del reloj provocada por la ausencia del canal afectara la capacidad de las células de mantenerse en fase a medida que pasaban los días en ausencia de sincronizadores ambientales. A partir de la observación de que en un mutante nulo en *pdf* la sincronización de las oscilaciones moleculares se pierde gradualmente se propuso que es necesaria una salida apropiada de las NLvs para mantener a largo plazo la sincronización de las oscilaciones en OO (Lin et al., 2004; Peng et al., 2003). En el mutante *pdf⁰¹*, las oscilaciones moleculares de PER están en fase durante los primeros dos días en OO, pero se van desincronizando a medida que pasan los días y no es posible detectar oscilaciones en DD9.

Para evaluar la posibilidad de que la mutación en *slo* afectara paulatinamente la sincronización de las oscilaciones moleculares se analizó la distribución subcelular de PER en las NLvs, pero esta vez a lo largo del octavo día en condiciones constantes. En este caso tampoco se encontraron diferencias entre el patrón de expresión temporal de las proteínas del reloj entre *slo⁴* y CS (FIGURA 2.4).

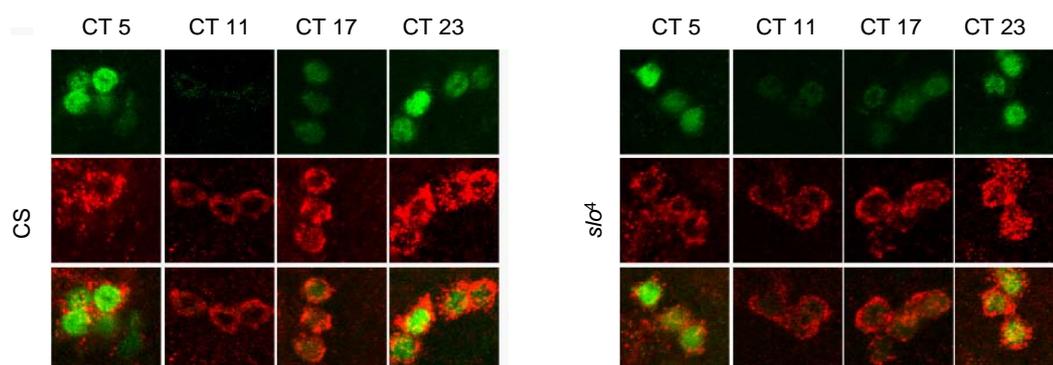


Figura 2.4.- Las oscilaciones moleculares en las NLvs persisten en *slo⁴* aún tras varios días en OO. Moscas recién eclosionadas (0-5 días) fueron sincronizadas en LO y las muestras fueron tomadas en el octavo día luego de ser transferidas a condiciones constantes. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de cerebros en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar el patrón de distribución de PER (verde) en los puntos CT5, CT11, CT17 y CT23 utilizando el anticuerpo anti PDF (rojo) como marcador de las NLvs en los cerebros de moscas CS (panel izquierdo) y *slo⁴* (panel derecho). Los experimentos se repitieron 2 veces con idénticos resultados.

En este caso no se detectaron las variaciones en la localización subcelular de PER características del segundo día en OO, sino que la oscilación se limitó a la intensidad de la señal. Esto puede deberse a una disminución normal en la amplitud de las oscilaciones en condiciones de OO avanzadas, o a que sea necesaria mayor resolución temporal para detectar este cambio en OO9. De cualquier modo, los patrones observados para CS y *slo⁴* fueron idénticos, lo que permite descartar la posibilidad de que la mutación en *slowpoke* afecte gradualmente la capacidad de estas células de mantener sus oscilaciones sincrónicas. Nuevamente, como se ve en la figura **2.4**, no se encontraron células fuera de fase dentro de un mismo grupo, y tampoco desincronización entre hemisferios (datos no mostrados).

Los resultados presentados en esta sección demuestran que el funcionamiento de las neuronas marcapasos que componen el oscilador **M** no está afectado por la mutación en *slo*, y sugieren que los defectos comportamentales que esta mutación genera se deben a alteraciones en la salida de información desde el reloj hacia las vías eferentes que permite el control de la ritmicidad comportamental.

PARTE II- Las manifestaciones comportamentales de los osciladores **M** y **E** están afectadas diferencialmente.

En el primer capítulo de esta tesis, donde se discutieron los defectos comportamentales ocasionados por la falta de *slowpoke*, se presentaron actogramas representativos de *slo⁴* donde podía observarse la desconsolidación de la actividad en condiciones constantes (FIGURA 1.1). Pero la inspección de estos actogramas también revela que el comportamiento de esta línea durante el ciclo de LO dista de ser semejante al del control. A simple vista se puede notar que las respuestas a las transiciones de oscuridad a luz y de luz a oscuridad están atenuadas y que la actividad nocturna es mucho más alta que la de las moscas silvestres. En esta sección se analizan las alteraciones que presenta *slo⁴* en cuanto a la sincronización a ciclos de luz y oscuridad, con el objetivo de distinguir con mayor resolución a qué nivel se encuentran los defectos que esta mutación produce en la estructura del sistema circadiano.

2.1.- La mutación en *slo* impide la consolidación de la actividad en la fase diurna.

Si bien mediante la inspección visual de los actogramas es posible detectar cuando una línea presenta alteraciones comportamentales en ciclos de LO, para estudiar el comportamiento poblacional de un genotipo habitualmente se utilizan *gráficos de actividad promedio* (*average activity plots*, AAPs). En este tipo de análisis se promedia la actividad entre las horas de luz y las de oscuridad, lo cual pone de manifiesto los “saltos” de actividad en respuesta a las transiciones de fase. Además, permite observar los incrementos graduales en la actividad que reflejan las anticipaciones de estas transiciones de fase, una propiedad importante a analizar para evaluar el funcionamiento de los osciladores **M** y **E**, algo generalmente difícil de evaluar a partir de los actogramas.

En la figura 2.5, donde se muestran los gráficos de actividad promedio para las líneas mutantes en *slo*, se puede ver más claramente que la respuesta a la luz se encuentra muy atenuada en *slo⁴*, y que su actividad nocturna es muy alta comparada con la de la

línea control. En el caso del otro alelo mutante en *slo*, *slo¹*, ocurre algo análogo a lo descrito respecto del comportamiento en OO: se observan los mismos defectos que en *slo⁴* pero con menor severidad. La irregular consolidación de la actividad en *slo⁴* hace que resulte difícil determinar a partir de estos datos si existen o no anticipaciones a las transiciones de fase²⁴. El comportamiento de *slo⁴* en LO es llamativo, ya que contrariamente a lo que ocurre con su fenotipo en condiciones constantes, no se asemeja en absoluto al que presentan los mutantes en los genes canónicos del reloj. Tanto las líneas con mutaciones nulas en *per* como en *tim* y *cycle* presentan respuestas normales a las transiciones de fase, aunque carecen completamente de anticipación a ninguna de estas transiciones. En estos casos, la aparente ritmicidad en LO se debe al fenómeno de *enmascaramiento*, ya que se trata simplemente de una respuesta directa a los cambios ambientales y no se relaciona con el funcionamiento del reloj circadiano. El comportamiento de la línea *Clk^{trk}* es un ejemplo de *enmascaramiento paradójico* (Mrosovsky, 1999) ya que su actividad se consolida predominantemente durante la noche²⁵ (Allada et al., 1998) (FIGURA 2.5). El fenotipo de *slo⁴* no se asemeja al de la línea control, pero tampoco a los de las mutaciones en *per*, *tim* ni *cyc*, porque no es capaz de responder normalmente a la luz; ni a *Clk^{trk}* porque su actividad no está consolidada predominantemente a la noche. Es un fenotipo intermedio, en el que la actividad parece distribuida *indistintamente* a lo largo del día, a excepción del leve incremento provocado por el encendido de la luz. En el caso de *slo¹*, la distribución de la actividad se parece más a la de las moscas silvestres: la respuesta a la luz es más pronunciada, y aunque la actividad nocturna es aun más alta de lo normal no llega a los niveles de *slo⁴*, y se puede ver que la consolidación de la actividad es en las horas de luz.

²⁴- En la última sección de este capítulo se analizará esta posibilidad en el contexto de un paradigma de entrenamiento diferente.

²⁵- *Enmascaramiento paradójico*: la luz suprime la actividad en un animal diurno o la estimula en uno nocturno.

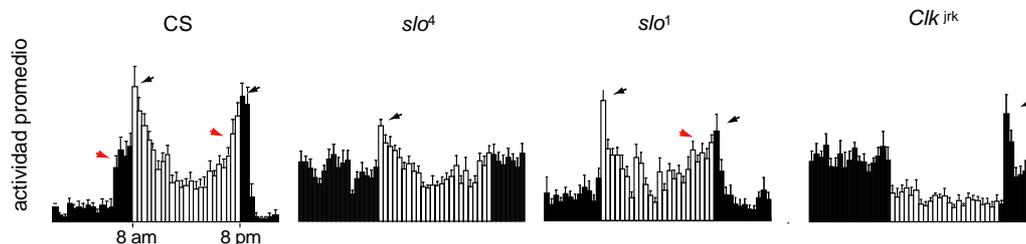


Figura 2.5.-Las mutantes en *slo* son arrítmicas en ciclos de LO. Gráficos de actividad promedio durante los primeros cuatro días del ciclo de LO de las líneas CS, *slo⁴*, *slo¹* y *Clk^{jrk}*. Cada *bin* de actividad está normalizado a la actividad promedio de cada individuo para cada uno de los días del ciclo de entrenamiento. Las barras blancas representan los puntos de la noche y las grises los del día. El gráfico es el resultado del análisis de entre 30 y 50 individuos por genotipo en un experimento representativo. Las flechas negras corresponden a las respuestas directas a la luz y las rojas a las *anticipaciones* circadianas.

En capítulo anterior se demostró que tanto la expresión del canal a partir de sus promotores neuronales como la expresión de la variante de *splicing* más común en sistema nervioso son suficientes para rescatar el fenotipo de *slo⁴* en condiciones constantes. Por lo tanto, se analizaron estas líneas en ciclos de LO para determinar si la expresión del canal en sistema nervioso también era suficiente para rescatar los defectos comportamentales en esta condición. En la figura **2.6.A** se muestran gráficos de actividad promedio representativos de las líneas B52, que expresa la variante neuronal, y M131, que expresa la variante muscular. Mientras que M131 resulta indistinguible de *slo⁴* en todos los experimentos realizados, B52 presenta un patrón de actividad en LO similar al de las moscas silvestres. No solamente se restaura la capacidad de respuesta directa a las transiciones de fase, sino también la anticipación tanto de la mañana como de la noche. Además, la consolidación de la actividad durante las horas de luz es comparable a la de la línea control.

Por otro lado, como puede verse en la figura **2.6.B**, la combinación alélica *Ash2¹⁸/slo⁴* presenta un *rescate parcial* del fenotipo: si bien el salto a la luz es más pronunciado, alcanzando casi los niveles normales, la actividad nocturna promedio es apenas menor

a la diurna y no existe anticipación de la mañana. Sin embargo, el hecho de que respondan mas normalmente a la luz provoca un incremento en la actividad en el primer punto del día seguido del decaimiento gradual como resultado del acostumbramiento a la presencia de luz que otorga un aspecto general mucho más semejante al de la línea control²⁶. La línea *Ash2*¹⁸ en heterocigocis presenta un fenotipo similar al de la línea control tanto respecto de la consolidación de su actividad como de las anticipaciones y respuesta directa a las transiciones de fase (FIGURA 2.6.B). Estos resultados permiten concluir que la expresión del canal en sistema nervioso es suficiente para rescatar el fenotipo de *slo*⁴ en ciclos de LO.

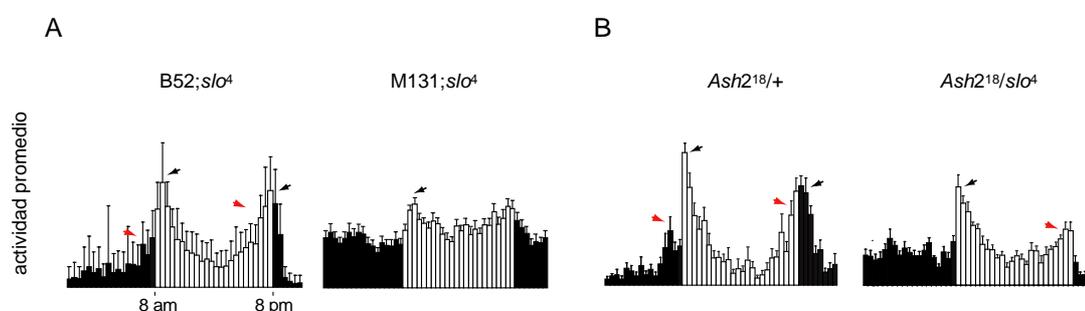


Figura 2.6.- La expresión del canal en sistema nervioso rescata la capacidad de sincronizarse a ciclos de LO.

Gráficos de actividad promedio correspondientes a los genotipos *B52;slo*⁴, *M131;slo*⁴, *Ash2*¹⁸/+ y *Ash2*¹⁸/*slo*⁴. Las flechas negras corresponden a las respuestas directas a la luz y las rojas a las anticipaciones circadianas. Los gráficos corresponden a un experimento representativo, con un mínimo de 16 individuos por genotipo. Los patrones de actividad fueron similares en 4-6 experimentos independientes. (A) *B52* y *M131*, las líneas que expresan las versiones neuronal y muscular del canal, respectivamente, y (B) *Ash2*¹⁸ en heterocigocis y transheterocigocis con *slo*⁴, durante el promedio de cuatro días consecutivos en ciclos de luz y oscuridad. Las barras indican el desvío estándar. Los datos fueron adquiridos cada 30 minutos.

²⁶- El hecho de que tanto en esta línea como en *slo*⁴ se pueda observar la anticipación de la noche se discutirá en la tercera sección de este capítulo.

Con respecto a los porcentajes de ritmicidad durante el ciclo de LO, la respuesta a la luz es un factor importante ya que otorga una componente de periodicidad que permite al software de análisis asignar un período de 24 horas. Como se discutió anteriormente, una línea arrítmica en OO pero que responde normalmente a las transiciones parecerá rítmica durante el ciclo de entrenamiento (LO) como resultado del enmascaramiento de esa arritmicidad. En la tabla 1.1, donde se muestran los porcentajes de ritmicidad durante en LO, se observa que no solamente la línea B52 tiene un porcentaje de ritmicidad comparable al del control sino que también la combinación alélica *Ash2¹⁸/slo⁴*, por su rescate parcial de la respuesta a la luz.

Tanto en los gráficos de actividad promedio (FIGURA 2.5) como en los actogramas que se muestran en la figura 1.1 se ve que mientras que las moscas silvestres prácticamente no se mueven durante la noche, las mutantes en *slo* tienen una mayor desconsolidación de la actividad, y en el caso de *slo⁴* se mueven casi constantemente. Esto se ve con mayor claridad si se superponen ambos gráficos como en la figura 2.7.A, donde se muestra el patrón de actividad promedio para varios individuos de cada genotipo durante tres días consecutivos en LO. Para determinar si existen diferencias significativas respecto de la distribución de la actividad, se cuantificó la sumatoria de la actividad diurna y nocturna de CS y *slo⁴* relativa a la cantidad de actividad para cada individuo (ver materiales y métodos). En la figura 2.7.B se muestra la proporción relativa de actividad en cada fase del ciclo. Mientras que la actividad diurna de CS es más del doble de su actividad nocturna, en *slo⁴* la actividad diurna y nocturna no son significativamente diferentes. Sin embargo, ambos valores sí son significativamente diferentes tanto del valor diurno como del nocturno de CS, lo que indica que la actividad de línea *slo⁴* no representa ninguna de las dos fases sino que todo el tiempo exhibe valores de actividad *intermedios*. En el caso del mutante *Clk^{irk}*, la actividad nocturna es significativamente mayor que la diurna, y ambos valores también son significativamente diferentes de los característicos de *slo⁴*.

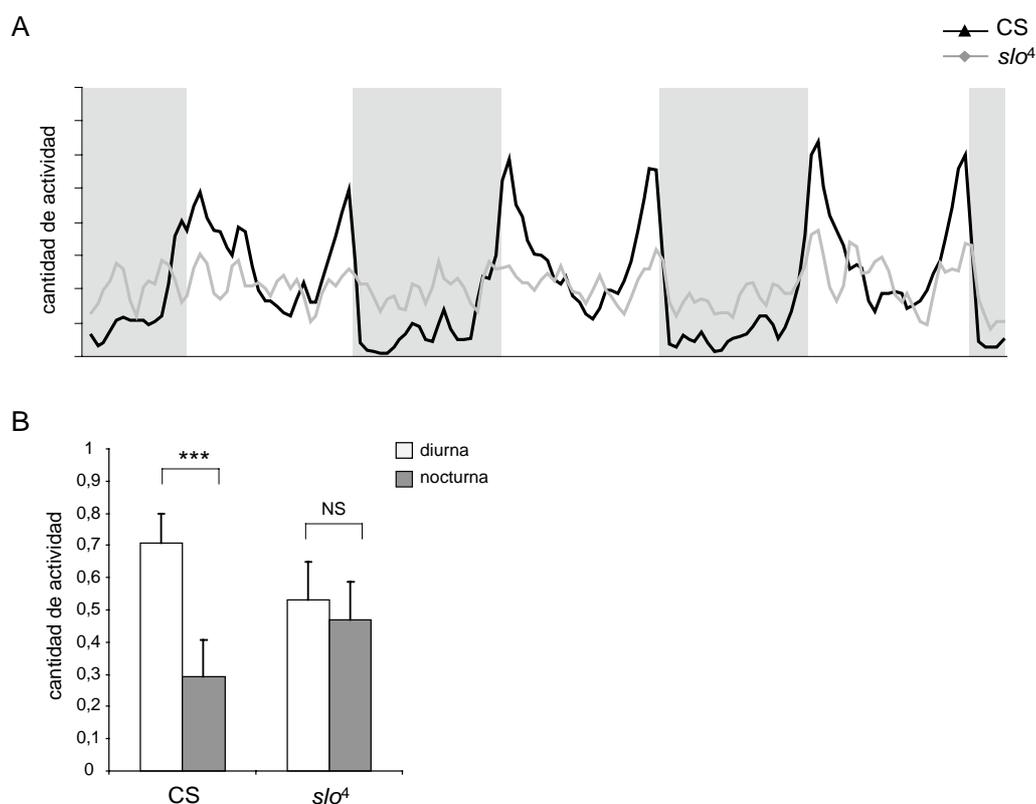


Figura 2.7.-Las mutantes en *slo* no consolidan su actividad en la fase diurna.

Análisis de actividad durante el ciclo de LO de las líneas CS y *slo*⁴. Cada bin de actividad está normalizado a la actividad promedio de cada línea para cada día del ciclo. En esta condición se ve que las moscas *slo*⁴ presentan un patrón de actividad irregular (A) Actividad promedio durante tres días consecutivos en LO (LO2 a LO5). Los recuadros blancos representan la fase del día y los grises la de la noche. El gráfico es el resultado de entre 30 y 50 individuos en un experimento representativo. (B) Cuantificación de la actividad diurna y nocturna promedio para cada genotipo. Las combinaciones de todos los valores resultaron significativamente diferentes (tres asteriscos, $p < 0.001$), excepto los dos valores de *slo*⁴ entre sí ($p > 0.05$).

Para determinar si esta *incapacidad de discriminar* entre el día y la noche observada en *slo*⁴ era un defecto específico de sincronización a los ciclos de LO o podía ser extrapolable a otros paradigmas de entrenamiento se sometió a esta línea a un régimen de ciclos de temperatura. Se sabe que si bien la luz es el *Zeitgeber* más potente, los animales pueden entrenarse según distintas claves ambientales, dependiendo de la especie. En *Drosophila*, la temperatura es el segundo sincronizador

más importante, después de la luz²⁷. De hecho las moscas pueden entrenarse con ciclos de temperatura aun en condiciones de luz constante, donde el reloj normalmente no es funcional (Boothroyd et al., 2007; Miyasako et al., 2007; Takeuchi et al., 2007; Yoshii et al., 2005; Yoshii et al., 2007). En condiciones normales, los organismos interpretan la fase de temperatura *alta* como *día* y la de temperatura mas *baja* como *noche*; en *Drosophila*, una diferencia de 3°C es suficiente para establecer la dicotomía día/noche y entrenar al reloj circadiano.

El patrón de actividad de las moscas silvestres en ciclos de temperatura es distinto del de ciclos de LO, ya que no anticipan las transiciones de fase ni presentan la típica disminución de actividad en la mitad del día, la *siesta*²⁸. Existe un incremento abrupto en la actividad al subir la temperatura, y ésta se mantiene en niveles elevados mientras dure la fase del día. Una vez dejadas en condiciones constantes de oscuridad y temperatura, la actividad se mantiene alta en el día subjetivo, la fase del ciclo donde la temperatura era mayor durante el ciclo de entrenamiento. Al graficar la actividad promedio durante tres días consecutivos en ciclos de 25°C / 20°C (FIGURA 2.8.A), se puede ver que la línea *slo⁴* presenta bajo entrenamiento por ciclos de temperatura un fenotipo similar al de ciclos de LO: las moscas no consolidan su actividad en la fase del día sino que se mueven de manera casi constante. Si bien en algunos experimentos se ven picos de actividad en la fase de día, estos no siempre coinciden con el primer momento de temperatura alta y la actividad es sumamente irregular. La línea control, por el contrario, aumenta su actividad inmediatamente ante el incremento en la temperatura, y ésta se distribuye de un modo homogéneamente alto en el día y homogéneamente bajo en la noche. Al cuantificar la actividad diurna y nocturna respecto de la actividad total del mismo modo que en la figura 2.7.B, se ve que nuevamente no hay diferencias significativas en la actividad de *slo⁴* en cada fase (FIGURA 2.8.B), mientras que en CS la actividad diurna es casi tres veces más alta que la nocturna ($p < 0,001$).

²⁷-Cuando se entrenaron las moscas con claves contradictorias, superponiendo la información de luz con la de temperatura, se pudo observar que la luz es una clave más fuerte ya que las moscas interpretan la fase de luz como día, a pesar de que en este paradigma sea la de temperatura más baja.

²⁸- Esta disminución de la actividad hacia la mitad de la fase de día es característica de los machos, ya que las hembras se mueven de un modo más constante durante las horas de luz (Blau and Rothenfluh, 1999).

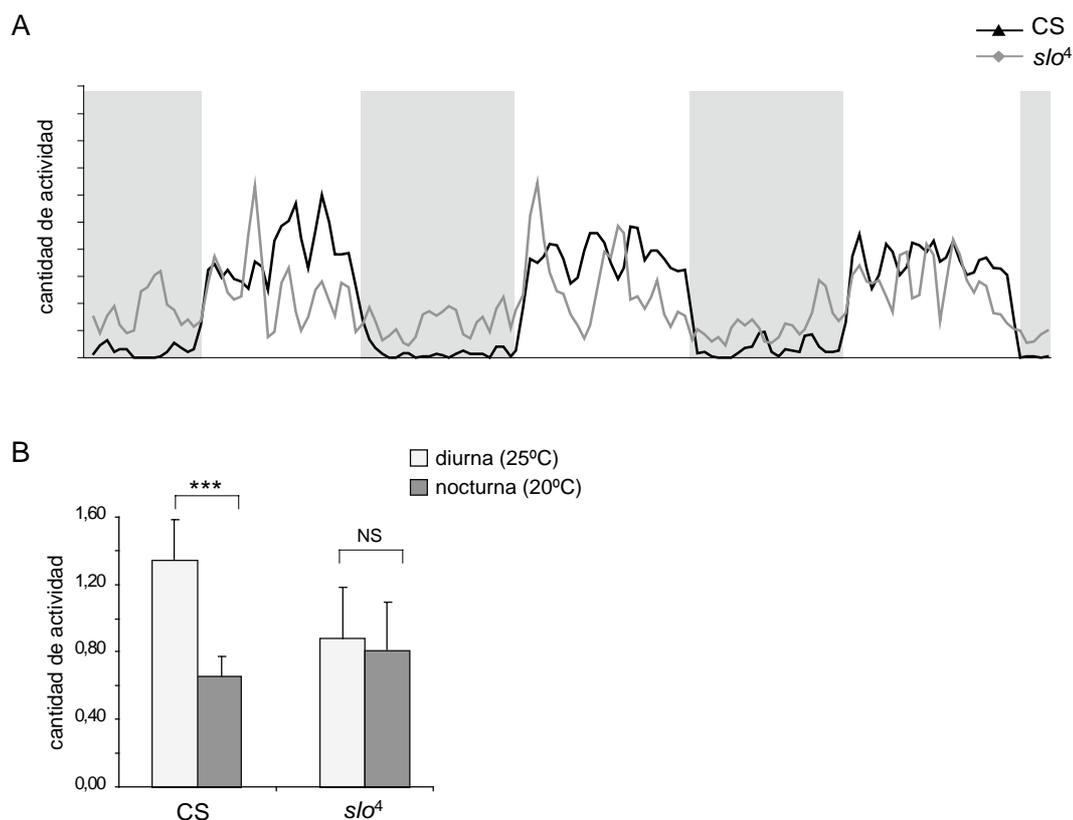


Figura 2.8.- La línea *slo*⁴ no consolida su actividad en la fase diurna bajo entrenamiento por temperatura.

Análisis de actividad durante un ciclo de 12 hs a 25°C y 12 hs a 20°C, en oscuridad constante. Los recuadros blancos representan la fase de temperatura alta, interpretada por las moscas como “día” y los grises la fase de temperatura baja, que es interpretada como “noche”. (A) Gráfico de actividad promedio de los primeros tres días del ciclo de entrenamiento por temperatura de las líneas CS y *slo*⁴. En este paradigma de entrenamiento las moscas silvestres no exhiben la “siesta” típica del ciclo de LO, y consolidan su actividad de manera homogénea durante la fase diurna. (B) Cuantificación de la actividad “diurna” y “nocturna” promediada para la totalidad del ciclo de entrenamiento. Los dos valores de *slo*⁴ no resultaron significativamente distintos entre sí (tres asteriscos, $p < 0.001$). Se analizaron como mínimo 8 individuos en cada experimento (de un total de 3 experimentos).

Respecto de la ritmicidad comportamental en este paradigma de entrenamiento, si bien las moscas *slo*⁴ son levemente más rítmicas durante el ciclo de temperatura que durante el ciclo de LO, al ser dejadas en condiciones constantes su porcentaje de arritmicidad es similar. El porcentaje de ritmicidad en condiciones constantes de la

línea control demuestra que el entrenamiento del reloj bajo esta condición es comparable al obtenido mediante ciclos de entrenamiento estándar (TABLA 2.1).

Genotipo	n	ciclo de T	OO			Período (hs)	FFT
		%R	%R	%DR	%AR		
CS	30	66,7	70	13,3	16,7	23.2 ± 0.24	0.079 ± 0.006
<i>slo</i> ⁴	25	32	20	40	40	24.8 ± 0.93	0.043 ± 0.003
<i>Clk</i> ^{rk}	7	71,4	0	28,6	71,4	-	-

Tabla 2.1.- Porcentaje de ritmicidad en entrenamiento por temperatura. Moscas jóvenes (0-5 días) fueron entrenadas en ciclos de temperatura (25°C/20°C) y posteriormente dejadas en condiciones constantes a 20°C. Los valores de período se asignan sólo a los individuos rítmicos.

Estos resultados demuestran que independientemente del *Zeitgeber* involucrado en el entrenamiento, las moscas mutantes en *slo* no son capaces de consolidar su actividad en la fase diurna. Tampoco muestran una preferencia por la fase nocturna, como es el caso del *Clk*^{rk}, por lo que no representan un caso de enmascaramiento paradójico. Esta mutación genera que las moscas se muevan en forma indistinta²⁹ en cualquier momento del ciclo, *que no puedan distinguir el día de la noche*.

2.2.- En condiciones de fotoperíodo ampliado se evidencia la existencia del oscilador E.

Como se mencionó anteriormente, a partir de los gráficos de actividad promedio en LO es difícil determinar si en la línea *slo*⁴ existen o no anticipaciones a las transiciones de fase. Este dato es de especial importancia ya que pone en evidencia la existencia de un reloj funcional: el oscilador M en el caso de la anticipación de la mañana y el

²⁹-En mamíferos, se ha reportado que mutaciones en los canales BK producen ataxias y falta de coordinación motora (Hubner and Jentsch, 2002).

oscilador E en el caso de la anticipación de la noche. Si bien parece haber una leve anticipación de la noche, más clara en algunos experimentos que en otros y con una gran variabilidad entre individuos, muy rara vez los incrementos de actividad hacia el final de la noche parecen coincidir con una anticipación de la mañana. En la línea *slo*¹, esto resulta bastante más claro que en *slo*⁴, ya que existe un incremento gradual en la actividad a partir desde la mitad hacia el final del día que representa la anticipación de la noche pero no se observa un comportamiento análogo en la actividad previa al encendido de la luz (FIGURA 2.5).

Para determinar si era posible detectar con mayor claridad la anticipación de la noche en *slo*⁴, se sometió a esta línea a un entrenamiento estándar seguido de un paradigma de entrenamiento bajo *fotoperíodo ampliado*. En esta condición es posible separar las respuestas directas a las transiciones de fase de las anticipaciones inherentes a la función de los osciladores circadianos (Rieger et al., 2003). Para ello se somete a las moscas a un régimen de LO de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante cinco días (8 a.m. a 8 p.m.) y luego se las transfiere a un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (6 a.m. a 10 p.m.) (ver materiales y métodos). Luego de algunos días bajo este nuevo régimen las moscas salvajes logran reentrenarse³⁰ y comienzan a anticipar las nuevas transiciones de fase, antes de las 6 a.m. y de las 10 p.m. Sin embargo, los primeros dos o tres días del ciclo de fotoperíodo ampliado permiten separar los picos circadianos de las respuestas directas a los cambios de luz y oscuridad, ya que el entrenamiento previo del reloj provoca que las anticipaciones aún se produzcan en los momentos en los que el cambio de fase se “espera”, alrededor de las 8 a.m. y 8 p.m.

³⁰- El tiempo necesario para el reentrenamiento a la nueva condición depende de la intensidad de la luz.

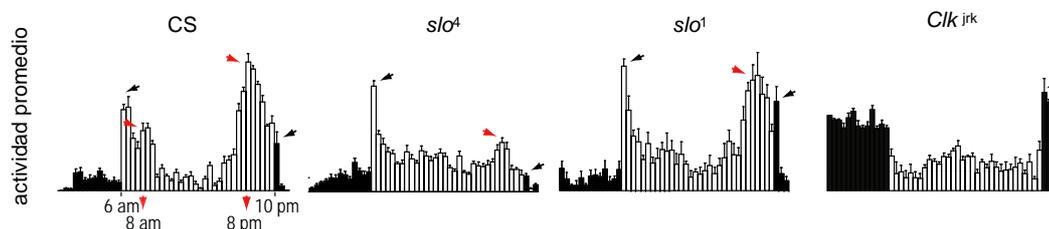


Figura 2.9- En condiciones de fotoperíodo ampliado se evidencia la anticipación de la noche en *slo⁴*. Gráficos de actividad promedio obtenidos durante los primeros 3 días bajo 16 hs de luz: 8 hs de oscuridad luego de 6 días de entrenamiento en LO 12:12. Las luces se encienden a las 6 a.m. y se apagan a las 10 p.m. (flechas negras). En la línea control se ve que en este paradigma de entrenamiento aun persiste la anticipación a las transiciones predichas en base al entrenamiento anterior, cerca de las 8 a.m. y 8 p.m. Luego del cuarto día en esta condición las anticipaciones y las respuestas directas a la luz se solapan (datos no mostrados). En las mutantes en *slo* es posible detectar la anticipación de al noche, especialmente en el caso de *slo⁴*. En el control negativo, *clk^{irk}*, no se detectan anticipaciones en ninguno de los dos momentos del día, y en este fotoperíodo es aún evidente el *enmascaramiento paradójico*.

En la figura **2.9** se muestran los gráficos de actividad promedio de CS, *slo⁴*, *slo¹* y *Clk^{irk}* durante los tres primeros días luego de ser transferidos de LO 12:12 a LO 16:8. Mientras que en la línea control se ven las anticipaciones de la mañana y de la noche alrededor de las 8 a.m. y 8 p.m. (indicadas con flechas rojas), en ninguno de los mutantes en *slo* se ve la anticipación de la mañana. Sin embargo, ambos presentan el incremento gradual de la actividad de cercano a las 8 p.m. (lo que era la anticipación de la noche en LO 12:12) muy leve en *slo⁴* pero comparable al del control en *slo¹*. El control negativo, *Clk^{irk}*, muestra nuevamente la consolidación nocturna de la actividad y ninguna de las dos anticipaciones.

Esta capacidad de retener la anticipación de la noche sólo es posible si la salida del oscilador **E** es funcional aun en ausencia de *slo*. Además de esta manifestación del oscilador **E**, los gráficos de la figura **2.9** muestran que el comportamiento de *slo⁴* se asemeja al de la línea control en ciclos de fotoperíodo ampliado que en LO estándar: no sólo la respuesta directa al encendido de las luces es mayor sino que la actividad

diurna es significativamente mayor que la nocturna. Sin embargo, es posible que esta diferencia se deba fundamentalmente al incremento de actividad debido al encendido de la luz.

Por otro lado, la línea *slo⁴* presenta un porcentaje de ritmicidad mayor en fotoperíodo ampliado del que presenta en 12:12, aunque la ritmicidad al ser dejadas en condiciones constantes es igualmente baja luego de cualquiera de los paradigmas de entrenamiento (TABLA 2.2). Esta mayor capacidad de sincronización bajo condiciones de fotoperíodo ampliado puede interpretarse en el contexto del modelo que postula que el reloj circadiano es a la vez un reloj estacional, y que el oscilador **M** prevalece en invierno, en la condición de “días cortos” y el oscilador **E** prevalece en verano, cuando hay “días largos” (Stoleru et al., 2007). Si la mutación en *slo* altera la *salida* del reloj circadiano, como sugieren todos los experimentos presentados hasta el momento, pero sólo del oscilador **M** y no del **E**, cabe esperar que en una condición ambiental en la que este último prevalece, el comportamiento de la línea *slo⁴* sea mas semejante al de las moscas silvestres.

Genotipo	12:12				16:8			
	n	%R	%DR	%AR	n	%R	%DR	%AR
CS	44	64,29	35,71	0	41	85,71	14,29	0
<i>slo⁴</i>	14	15,91	54,55	29,55	14	36,59	46,34	17,07
<i>Clk^{rk}</i>	11	45,45	45,45	9,09	11	54,55	36,36	9,09

Tabla 2.2.- Porcentaje de ritmicidad en el paradigma de fotoperíodo ampliado. Moscas jóvenes (0-5 días) fueron entrenadas en ciclos de luz: oscuridad estándar (12h:12h) durante cinco días y posteriormente transferidos a un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante seis días. El encendido de la luz ocurre 2 horas antes y el apagado 2 horas después (6 a.m. y 10 p.m., respectivamente).

Estos resultados demuestran que en condiciones de luz y oscuridad sólo es posible detectar en las líneas mutantes en *slo* la manifestación comportamental del oscilador **E** y no la del oscilador **M**. Esto apoya la hipótesis de que la *salida* de la información del reloj está afectada por esta mutación, aunque el problema se encuentra específicamente río abajo de las NLvps. Esto impide la ritmicidad comportamental en condiciones constantes sino también la apropiada consolidación de la actividad durante los ciclos de entrenamiento.

PARTE III- Los grupos neuronales que componen el oscilador **E** están desincronizados en ausencia de claves ambientales.

En la sección anterior se demostró que en ciclos de luz y oscuridad sólo es posible detectar en los mutantes en *slo* manifestaciones comportamentales del oscilador **E** pero no del oscilador **M**. Sin embargo, en esta condición ambiental, tanto en las moscas silvestres como en *slo⁴* todas las neuronas del sistema circadiano oscilan en fase por acción de la luz sobre la degradación de algunos de los componentes fundamentales del reloj molecular (ANEXO 3).

Si la hipótesis de que la mutación en *slo⁴* afecta la salida de las NLvps fuera correcta, las oscilaciones en las NLds y grupos dorsales en condiciones constantes deberían estar alteradas ya que *carecerían de las señales sincronizadoras necesarias para mantenerse en fase*. Los reportes previos sobre oscilaciones moleculares de algunos de estos grupos neuronales en OO mostraron algunas divergencias respecto de la cantidad de días que las oscilaciones persisten en cada uno de ellos. En todos estos trabajos se cuantificó la intensidad de señal de PER en lugar de las oscilaciones en su localización subcelular, por lo cual no fue posible obtener un grado de resolución adecuado que permita comparar las oscilaciones moleculares en estas células con las de las NLvps.

Para determinar si las oscilaciones moleculares en el resto de los osciladores del cerebro seguían estando sincronizadas en *slo⁴* en ausencia de claves ambientales se realizaron curvas temporales en el tercer día en OO. Dentro de los grupos neuronales que componen el oscilador **E** se estudiaron los dos más relevantes: las NLds y las ND1. Para esto se realizó inmunohistoquímica en cerebros de adultos y se analizó la localización subcelular de las proteínas del reloj de modo análogo a lo realizado en las NLvps. Según lo reportado en la literatura, la señal de TIM en las líneas silvestres es baja durante el día y alta durante la noche. La primera observación que resultó llamativa al analizar la señal obtenida al estudiar los puntos CT2 y CT14 fue que mientras en la línea control la señal es prácticamente indetectable en CT11 e intensa en CT 23, según los reportes previos, la intensidad de la señal era constitutivamente alta en *slo⁴* (FIGURA 2.10.A). Para determinar con mayor resolución cual era el

defecto de esta línea (si en todas las células de un mismo grupo TIM se encontraba en la misma localización subcelular en forma constitutiva, si se detectaban diferencias entre células del mismo grupo o diferencias entre distintos grupos, etc.) se realizó una curva de tiempo con una resolución de 6 horas, utilizando un anticuerpo específico contra el factor de transcripción ELAV como contratincción. Esta proteína se expresa específicamente en el sistema nervioso, desde estadios embrionarios y permite identificar con claridad todas las neuronas del cerebro de *Drosophila*. Dado que su localización es constitutivamente nuclear, se utilizó su patrón de expresión para discriminar entre señal nuclear, ubicua o citoplasmática de TIM (FIGURA 2.10.B).

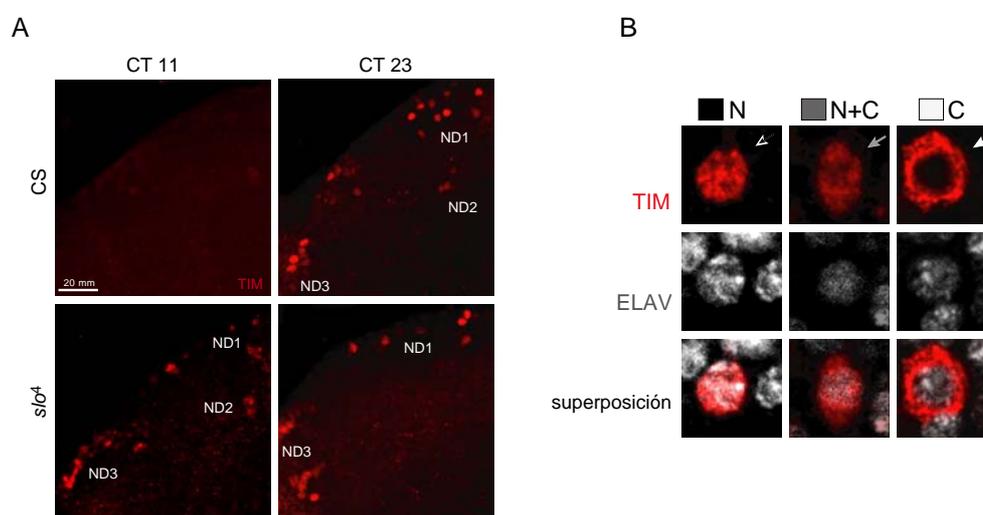


Figura 2.10.- La señal de TIM en los osciladores dorsales es constitutivamente alta en *slo*^Δ. (A) Mediante inmunohistoquímica, cerebros de las líneas CS y *slo*^Δ fueron analizados en el tercer día en condiciones constantes para evaluar la señal de TIM en los grupos de neuronas dorsales en dos puntos antifásicos, CT11 y CT23. Magnificaciones de la región dorsal de estos genotipos mostrando cada uno de los clusters del reloj. Mientras que la señal de TIM es casi indetectable en el control en CT11, es similar en los dos puntos en *slo*^Δ. (B) Imágenes representativas de neuronas individuales donde se muestra la señal del marcador nuclear ELAV. La señal de TIM (rojo) es clasificada como nuclear, ubicua o citoplasmática en función de su localización relativa respecto de la localización de ELAV (gris).

En primer lugar se estudió la sincronización de las NLds, de las que se sabe que si bien su función es determinante en cuanto a la capacidad de anticipación de la noche, son prescindibles respecto de la ritmicidad comportamental en OO (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). Sin embargo, las moscas que carecen no sólo de las NLvps sino también de las NLds son más arrítmicas en OO que aquellas que carecen solamente de las NLvps (Dushay et al., 1989; Renn et al., 1999). Las proyecciones axonales de estas neuronas se dirigen hacia el protocerebro dorsal (Kaneko y Hall, 2000), aunque se ha reportado que también proyectan hacia la médula accesoria ipsilateral (Stoleru et al., 2004) y contralateral (Helfrich-Forster et al., 2007).

Al analizar el patrón de localización subcelular de PER y TIM durante el tercer día en condiciones constantes, se pudo observar que mientras que la localización tanto de PER como de TIM en la línea control presenta un patrón similar al de las NLvps, en *slo⁴* las oscilaciones en ambas proteínas están completamente fuera de fase (FIGURA 2.11.A). En la línea CS la localización de PER es nuclear en CT5 y CT11, predominantemente citoplasmática en CT17 y nuclear nuevamente en CT23. En el caso de TIM el patrón temporal es similar, aunque no se detecta señal en CT5 y generalmente tampoco en CT11, aunque en algunos casos se encontró una tenue señal citoplasmática, lo que indica que hacia el final del día subjetivo las proteínas recientemente traducidas ya comienzan a acumularse gradualmente en el citoplasma. En *slo⁴*, ambas señales son muy intensas en todos los puntos analizados, y, lo que es aun más llamativo, las distintas neuronas dentro de un mismo grupo se encuentran desincronizadas.

Al cuantificar la localización de TIM para cada uno de estos puntos, utilizando la señal de ELAV como marcador nuclear (ver materiales y métodos), se observó que para cualquiera de los tiempos es posible encontrar en la línea *slo⁴* neuronas donde la señal es nuclear, ubicua o citoplasmática (FIGURA 2.11.B). El caso más llamativo es el punto CT11, donde mientras que en CS prácticamente no se detecta señal de TIM (y la poca que se detecta es citoplasmática, como indica la cuantificación), en *slo⁴* la señal es intensa y además pueden encontrarse cerebros donde la señal es citoplasmática,

ubicua e incluso nuclear. Si bien existe una pequeña dispersión en el control, en ningún caso se detectó señal nuclear de TIM ni en CT11 ni en CT17. En estos casos el porcentaje menos representado suele corresponder a la categoría *ubicuo* y puede atribuirse tanto a una dificultad técnica en la categorización debido a la baja intensidad como a diferencias leves en la fase entre distintos individuos (el período endógeno de esta línea es 23,7 horas, ver TABLA 1.1). Tanto en CT5 como en CT11 y 17 se encuentra señal de TIM en el citoplasma en *slo*⁴, y un porcentaje importante de señal ubicua. En el caso de CT23, en el 90% de las células de la línea control se detecta la señal de TIM localizada en el núcleo, y sólo en un pequeño porcentaje la señal es ubicua, pero en ningún caso se detecta PER en el citoplasma. En *slo*⁴, en cambio, existe un 15 % de señal citoplasmática y más del 70% de señal deslocalizada.

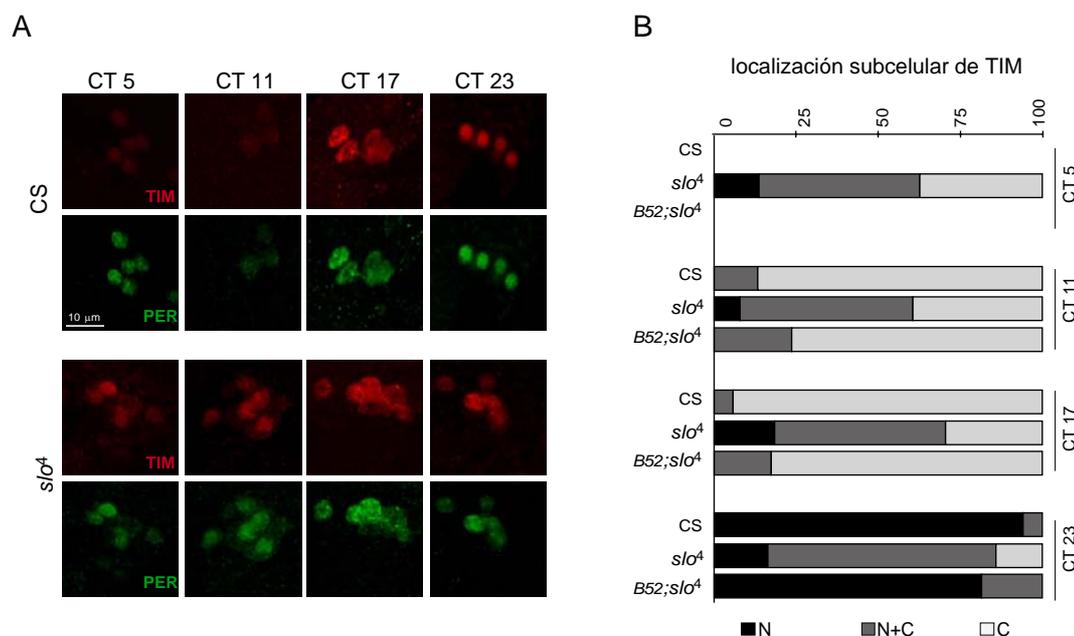


Figura 2.11.- Las NLds, parte fundamental de oscilador E, están fuera de fase en ausencia de *slo*. En el tercer día de oscuridad constante, las NLds están desincronizadas en los mutantes *slo*⁴. Moscas de las líneas CS, *slo*⁴ y *B52H;slo*⁴ fueron analizadas en CT5, CT11, CT17 y CT23 para evaluar la localización de PER (verde) y TIM (rojo). ELAV fue utilizado como marcador nuclear, como se describe en materiales y métodos y en la figura 2.10.B. Los resultados fueron consistentes en más de 20 cerebros analizados para cada punto en 2-4 experimentos independientes. (A) Imágenes representativas de cerebros de las líneas CS y *slo*⁴ para los cuatro puntos analizados (B) Resultados de la cuantificación de la localización de TIM para los tres genotipos en cada uno de los puntos. El detalle de la cuantificación se describe en la sección de materiales y métodos. La expresión de la versión neuronal de *slo* es suficiente para rescatar la desincronización en la localización subcelular de TIM que presenta el mutante *slo*⁴. Mientras que CS y *B52H;slo*⁴ resultan indistinguibles, *slo*⁴ es significativamente distinta de ambas (análisis de X² de la distribución de frecuencias, p<0.001).

Además, al realizar el mismo análisis en la línea B52, que expresa la variante neuronal del canal y rescata la arritmicidad comportamental en LO y OO, se encontró que también rescata las oscilaciones en las NLds. En la figura **2.11.B** se puede ver que la distribución de la localización subcelular de TIM lo largo de la curva de tiempo es similar a la de la línea control. El análisis estadístico revela que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los patrones de oscilación de B52 y CS, mientras que *slo⁴* es significativamente distinta de ambas.

A continuación realizamos un experimento similar en el otro grupo importante de neuronas que componen el oscilador E, las ND1. Se cree que estas células tienen un rol importante en las vías de fotopercepción, en la *entrada* de información al reloj, y que expresan un fotopigmento independiente de CRY (Rieger et al., 2003). Se ha reportado que envían sus proyecciones hacia el protocerebro dorsal y la médula accesoria, en forma ipsilateral (Kaneko y Hall, 2000). Como en el caso de las LNds, se encontró que son capaces de mantener las oscilaciones en la intensidad de señal de PER por varios días en condiciones constantes (Klarsfeld et al., 2004; Veleri et al., 2003; Veleri y Wulbeck, 2004), aunque tampoco se analizaron los cambios circadianos en la localización subcelular de las proteínas del reloj en estas células.

El análisis de la localización subcelular de PER y TIM en las ND1 revela que en la línea *slo⁴* las oscilaciones moleculares desaparecen en condiciones constantes, en forma análoga a lo que ocurre en las NLds (FIGURA **2.12.A**). En este grupo también se encontró que en la línea control las oscilaciones en la localización subcelular tanto de PER como de TIM están en fase con las NLvps. La cuantificación de la localización subcelular de TIM para cada uno de los puntos utilizando la señal de ELAV como marcador nuclear (en forma análoga a lo realizado en las NLds) revela que en este grupo también se encuentra que la señal de TIM está deslocalizada (FIGURA **2.12.B**.)

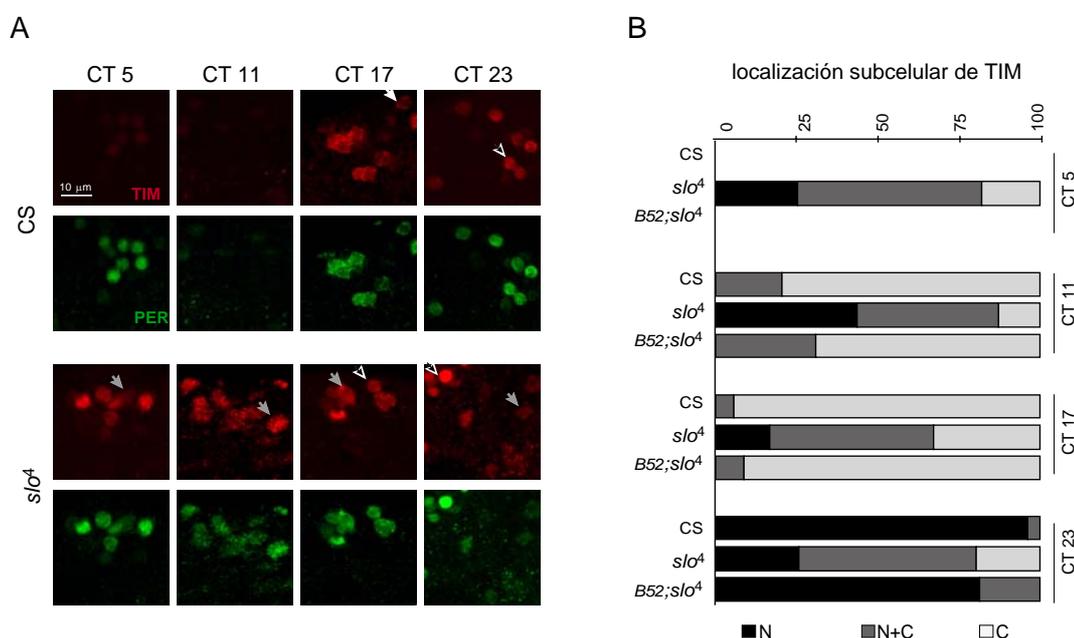


Figura 2.12.- Las oscilaciones en las ND1 están fuera de fase en *slo⁴*. Los experimentos (A) y las cuantificaciones (B) fueron realizados como se describe en la figura 2.11. Nuevamente, mientras que CS y *B52H; slo⁴* resultan indistinguibles, *slo⁴* es significativamente distinta de ambas (análisis de χ^2 de la distribución de frecuencias, $p < 0.001$). En ambos casos los experimentos se hicieron por triplicado y el número de cerebros por genotipo y por punto fue entre 7 y 21.

En cada uno de los tiempos es posible encontrar en *slo⁴* señal nuclear, ubicada o citoplasmática. Tal como ocurrió con el rescate de las oscilaciones moleculares en las NLds por la expresión del canal en la línea *B52*, en este caso nuevamente se encontró que esta línea presenta un patrón de oscilaciones comparable al del control.

Estos resultados apoyan la noción de que los defectos en la transmisión de la información desde las NLvs causados por la mutación en *slo* impedirían que el resto de los osciladores del cerebro pudiera mantener su sincronización en condiciones constantes. El hecho de que no se detecte ningún tipo de ritmicidad comportamental asociada a la función del oscilador **M**, sumada a la observación de que sus *targets* inmediatos, los grupos neuronales que componen el oscilador **E**, están

desincronizados, apoya la noción de que la *salida* del reloj circadiano hacia sus vías eferentes es dependiente de la función de *slo*.

CAPÍTULO 3.- El circuito PDF

En conjunto, todos los resultados presentados hasta el momento aportan evidencias a favor de la hipótesis inicial, es decir, que los defectos comportamentales observados en la línea *slo*⁴ se deben a alteraciones en la *salida* de información desde el oscilador **M**. En este capítulo se describen los experimentos que se realizaron para comenzar a elucidar los motivos por los cuales la falta del canal podría causar un defecto semejante.

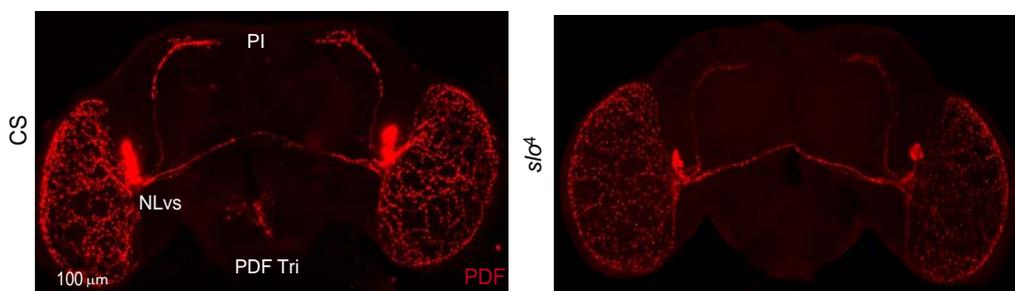
Contrariamente a lo que ocurre con la caracterización de los mecanismos bioquímicos que subyacen a las oscilaciones moleculares (para una recopilación detallada ver Hall, 2005), poco se sabe sobre el modo en que la información se propaga río abajo de las neuronas marcapasos. A pesar de los múltiples intentos, hasta el momento no se ha logrado identificar ningún neurotransmisor que se exprese en las NLvps y pueda estar involucrado en la potencial comunicación con neuronas postsinápticas. Al marcar las NLvps con una proteína de fusión entre GFP y synaptobrevina -proteína que se une a las vesículas sinápticas y posibilita su fusión a la membrana- se ve que la señal está presente a lo largo de los axones pero especialmente localizada en la región más distal (datos no mostrados). Sin embargo, podría darse el caso de que las NLvps fueran neuronas exclusivamente peptidérgicas y no hubiera ningún neurotransmisor involucrado en el proceso de liberación.

Dado que el único factor conocido que está involucrado en la salida de las NLvps es el neuropéptido PDF, se buscó determinar si la oscilación descrita en cuanto a la intensidad de su señal en las terminales dorsales de las NLvps estaba preservada en el mutante en *slo*, ya que defectos en la expresión o liberación de PDF podrían dar cuenta de la desincronización del oscilador **E** que se encontró en este mutante.

PARTE I.- La señal de PDF está disminuida en ausencia de *slo*.

En primer lugar, se buscó determinar si la expresión del neuropéptido PDF estaba afectada en la línea *slo*⁴. Para ello se realizó inmunohistoquímica en cerebro de moscas adultas, de entre 0 y 5 días de edad, utilizando un anticuerpo específico contra PDF. Las moscas fueron entrenadas en ciclos de LO desde el momento de la ovipuesta y los cerebros fueron disecados en las primeras horas a partir del encendido de la luz (ZT2-4). En estos primeros experimentos el objetivo era determinar si existían diferencias *macroscópicas* en la señal obtenida mediante el anticuerpo anti PDF entre ambos genotipos, tales como en la intensidad de la señal o la cantidad o distribución de las neuronas marcadas. En este sentido, lo primero que llamó la atención fue la ausencia completa de señal en las neuritas que proyectan a lo largo de la línea media en *slo*⁴ (FIGURA 3.1.A). Esta señal no proviene de ninguno de los grupos de *neuronas laterales* sino que corresponde a las proyecciones de un pequeño grupo de células ubicado en el tritocerebro que envían sus axones por la línea media hacia la *pars intercerebralis* (PI).

A



B

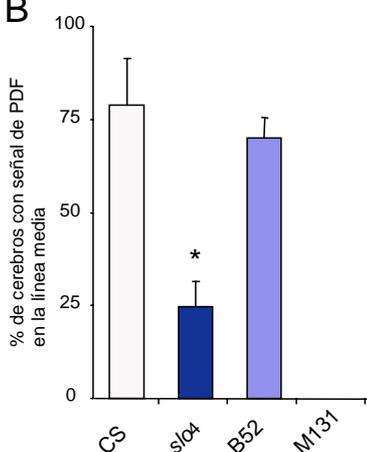


Figura 3.1.- La señal de PDF en la línea media está ausente en *slo4*. (A) Imágenes representativas obtenidas mediante inmunohistoquímica en cerebros de moscas jóvenes (0-3 días) de las líneas CS y *slo4* incubados con un anticuerpo específico contra PDF. (B) Cuantificación del porcentaje de cerebros que presentan señal de PDF en esta condición. Se analizaron entre 20 y 35 cerebros por genotipo. *slo4* resulta significativamente distinto de CS (ANOVA, $p < 0.005$).

En tres experimentos independientes se cuantificó la cantidad de cerebros de cada genotipo que exhibían esta señal y se encontró que sólo estaba presente en el 15% de los individuos *slo4* (FIGURA 3.1.B). En la línea control, en cambio, la señal de PDF a lo largo de la línea media se pudo detectar en prácticamente la totalidad de los cerebros. Sin embargo, se ha reportado que esta señal está presente sólo en los estadios pupales tardíos y los primeros 2-3 días de vida del adulto (Helfrich-Forster, 1997). A partir del momento de la eclosión desaparece gradualmente y se vuelve indetectable hacia los 4-5 días de edad, mientras que la ritmicidad en actividad locomotora en moscas silvestres se mantiene por varios días (de hecho resultados del laboratorio demuestran que la ritmicidad en actividad locomotora se mantiene por más de un mes, Carolina Rezával y MFC, en preparación). Esto implica que dado que no es posible establecer una correlación directa entre la señal de PDF de la línea media y la ritmicidad

comportamental, los defectos que ésta presenta en el mutante en *slo* no pueden dar cuenta de su fenotipo en actividad locomotora. Una posibilidad es que, como se ha sugerido (Helfrich-Forster, 1997; Helfrich-Forster, 2005; Helfrich-Forster y Homberg, 1993), la expresión de PDF en esta región esté relacionada con el ritmo de eclosión, lo cual es consistente con que sólo se observe en estadios pupales y los primeros días de la vida del adulto. El hecho de que la línea *slo⁴* sea también arrítmica en eclosión apoya esta posibilidad.

Una vez descartada la posible relevancia de este defecto en el control de la ritmicidad comportamental se analizó en mayor detalle la expresión de PDF en el resto del circuito. No se detectaron alteraciones en cuanto a la morfología ni a la localización de los somas de las NLvs grandes ni de los de las pequeñas. En general, sobre todo en el caso de las NLvgs, existe una gran variabilidad en cuanto a su distribución en la médula anterior, pero esta variabilidad aparece tan representada en *slo⁴* como en la línea control. Respecto de las proyecciones contralaterales de estas neuronas, ni su trayectoria ni las ramificaciones axonales que inervan el lóbulo óptico del hemisferio opuesto parecen estar afectadas por la mutación. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al grado de fasciculación de estos axones o la intensidad de señal de PDF a lo largo del trayecto que recorren.

Sin embargo, al examinar la expresión de PDF en las proyecciones de las NLvps se observa una llamativa diferencia en cuanto a la intensidad de la señal en *slo⁴* respecto de la línea control (FIGURA 3.1.A). Es precisamente en estas terminales axonales donde se ha reportado que la intensidad de PDF oscila, lo cual se atribuyó a una potencial regulación de la acumulación/liberación de este neuropéptido por parte del reloj circadiano³¹ (Park et al., 2000). Según esta interpretación, la alta señal de PDF en las primeras horas del día y del día subjetivo se debe a que el neuropéptido está siendo acumulado en las terminales axonales, para luego ser liberado durante la noche y la noche subjetiva. Esta oscilación no se detecta en los mutantes del reloj, *tim⁰¹* y *per⁰¹*, lo cual apoya la noción de que es un fenómeno regulado circadianamente. Mientras que en *tim⁰¹* la señal es constitutivamente baja, semejante a la que presentan

³¹- No se detectaron oscilaciones de PDF a nivel de RNAm ni de proteína (Park and Hall, 1998) .

las moscas silvestres durante la noche, en *per*⁰¹ es constitutivamente alta, remedando la condición diurna de la línea control.

En la figura **3.2** se muestran imágenes de mayor aumento de las terminales de las NLvps en dos puntos antifásicos de LO y OO para cada uno de los genotipos. Para esto las moscas fueron entrenadas en LO desde el momento de la ovipuesta, y se eliminaron todos los adultos eclosionados con más de 5 días de anterioridad al momento de realizar los experimentos. Los puntos tomados durante el ciclo de LO se realizaron disecando los cerebros en el quinto día de entrenamiento, mientras que los puntos tomados en OO corresponden al segundo día en condiciones constantes. En las imágenes correspondientes a la línea CS se puede ver que la señal es notablemente más intensa en los puntos ZT2 y CT2, y que además presenta una distribución diferente entre los puntos diurnos (día y día subjetivo) y nocturnos (noche y noche subjetiva).

Independientemente de la presencia o no de señal en la línea media (que como se discutió anteriormente depende fundamentalmente de si los cerebros corresponden a moscas con unos pocos días de edad de diferencia) tanto la intensidad como la calidad de la señal es diferente entre ZT2 y ZT14 y entre ZT2 y CT14, de acuerdo con lo reportado para las moscas silvestres (Park et al., 2000). En el caso de *slo*⁴, la intensidad de la señal de PDF es constitutivamente baja, y se asemeja a la de la línea control tanto en los puntos nocturnos. No se observaron diferencias cualitativas entre los puntos diurnos y nocturnos en este mutante, como tampoco entre la señal obtenida durante el ciclo de LO y la de OO.

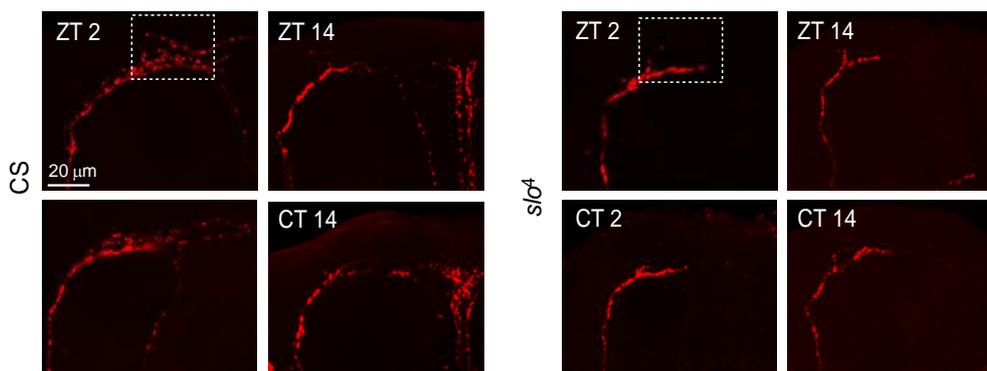


Figura 3.2.- La acumulación de PDF está alterada en ausencia de *slo*. Inmunohistoquímica en cerebros de moscas jóvenes (0-3 días) de las líneas CS y *slo*⁺ durante el segundo día en condiciones constantes, revelando las diferencias en la señal de PDF en las terminales dorsales de las NLVps. Los experimentos se repitieron 3 veces con idénticos resultados. Los recuadros interiores indican las áreas sobre las que se realizó la cuantificación mostrada en la figura 3.3.

Para determinar si las diferencias observadas en la intensidad de la señal de PDF entre CS y *slo*⁺ eran estadísticamente significativas, se cuantificó utilizando el *software Image J*. Para esto se establecieron áreas equivalentes a partir del primer punto de ramificación (Nitabach et al., 2005) (ver materiales y métodos) y se cuantificaron los píxeles obtenidos por unidad de área. En la figura **3.3.A** y **B** se muestran los resultados obtenidos para las cuantificaciones realizadas en los experimentos de LO y OO. Llamativamente, la cuantificación de los puntos de LO revela que tanto en CS como en *slo*⁺ la intensidad de la señal en ZT2 es aproximadamente el doble de la obtenida en ZT14, y en ambos casos esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa. Este resultado es sorprendente ya que lo que se observa en las imágenes es que la señal de PDF en el mutante en *slo* es muy similar en todos los puntos. Sin embargo, como se discutirá mas adelante, en muchos casos lo que ocurre es que en ZT2, si bien la señal de PDF es intensa, el circuito se ve *muy poco ramificado* en comparación con lo observado en la línea control. Esta señal “compacta” de PDF resulta generalmente en cuantificaciones de valores muy altos, en algunos casos incluso superiores a los del control.

En condiciones constantes, sin embargo, mientras que la oscilación en la intensidad de la señal prevalece en la línea control (en estos experimentos la diferencia entre el día subjetivo y la noche subjetiva resultó ser levemente mayor que entre los puntos de LO), en *slo⁴* desaparece por completo. Esto demuestra que la oscilación obtenida en *slo⁴* durante los ciclos de LO se debe a un efecto directo de la luz (enmascaramiento) y no a una regulación circadiana. Los resultados de la cuantificación corroboran la observación cualitativa de que la señal de PDF en el mutante es análoga a la de los puntos nocturnos de la línea control. No existen diferencias significativas entre la intensidad de la señal de PDF entre *slo⁴* y CS en ZT14, como tampoco entre las señales obtenidas para *slo⁴* a CT2 ni a CT14 respecto de CS en ZT 14.

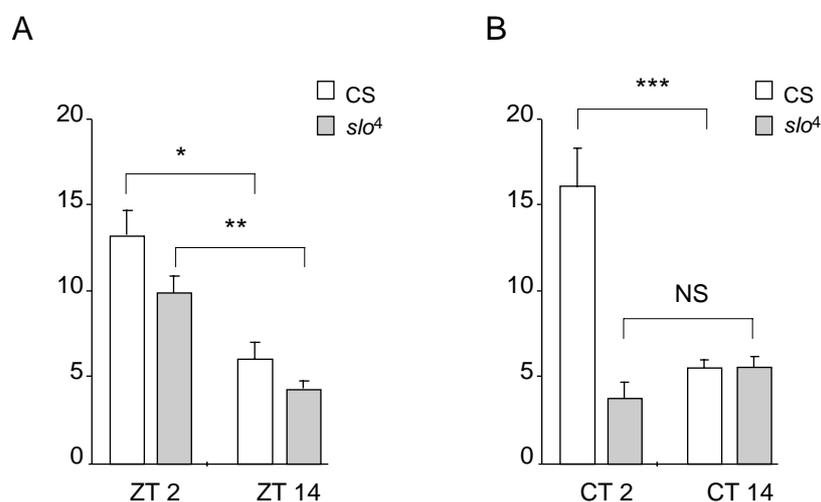


Figura 3.3.- No existen variaciones circadianas en la intensidad de PDF en *slo⁴*. Cuantificación de la intensidad promedio de la señal de PDF en las terminales dorsales de las NLps en la región indicada en la figura 3.2. Los datos representan entre 25 y 33 cerebros por genotipo y por punto. Las barras de error representan la desviación estándar (un asterisco, $p > 0.05$, dos asteriscos $p > 0.005$). Ver materiales y métodos para una descripción del análisis realizado.

Finalmente, se analizó la distribución de la señal del neuropéptido a lo largo de las terminales axonales de las NLvps en cada genotipo. Mientras que en el caso de CS la

señal aparece irregular y discontinua, consistente con su localización en vesículas, en *slo⁴* la señal es continua y difusa (FIGURA 3.4). En general no se observan los acúmulos que se esperaría de una distribución vesicular. En la mayoría de los casos tampoco se pueden identificar membranas de axones individuales o puntos de ramificaciones primarias, secundarias o terciarias. El defecto es específico de los axones de las NLvps ya que en otras regiones del circuito PDF no se detectan este tipo de anomalías. De hecho en el caso de las terminales axonales de las NLvgs, la señal de PDF en *slo⁴* es similar a la de CS, vesiculada y discontinua.

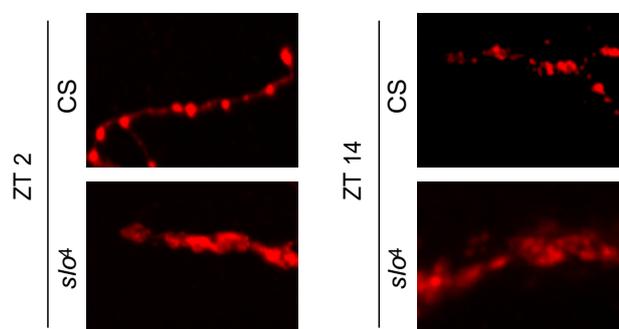


Figura 3.4.- En *slo⁴* el neuropéptido PDF presenta una distribución alterada en las terminales axonales. Magnificación de segmentos de neuritas individuales de las terminales dorsales de las NLvps en experimentos realizados como se describe en la figura 3.2.

A continuación analizamos el patrón de señal de PDF en las dos líneas que expresan las variantes de *splicing* de *slowpoke*, B52 y M131, predominantes en tejido neuronal y muscular respectivamente. Como se demostró en los capítulos 1 y 2, la línea que expresa la variante neuronal es capaz de rescatar el defecto comportamental de *slo⁴*, así como también el patrón de oscilación normal de las proteínas del reloj en los grupos de neuronas dorsales. Por lo tanto, se analizó la señal de PDF en B52 para determinar si también presentaba un patrón comparable al de la línea silvestre. En la figura 3.5 se puede ver que, en efecto, tanto la intensidad como la distribución del neuropéptido en esta línea son indistinguibles de los de la línea control. Esta

condición se mantiene en OO (datos no mostrados), por lo que es posible afirmar que B52 también rescata el defecto en la expresión/localización de PDF observado en *slo⁴*.

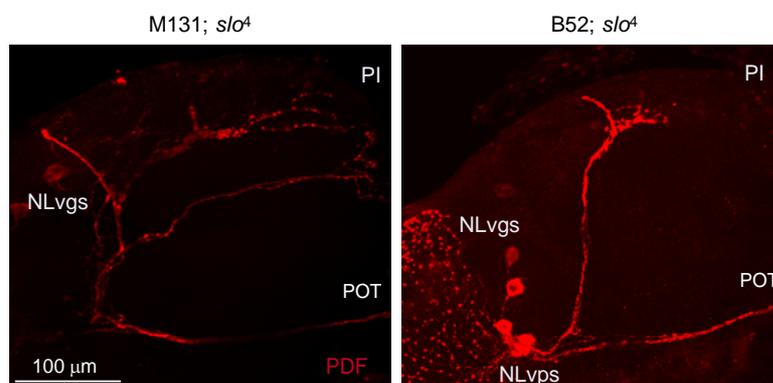


Figura 3.5.- La expresión de la versión neuronal del canal es suficiente para rescatar el patrón normal de expresión de PDF. Cerebros de individuos jóvenes (0-3 días) de las líneas B52; *slo⁴* y M131; *slo⁴* fueron analizados de manera análoga a la descrita para CS y *slo⁴*. Mientras que B52 presenta una señal indistinguible de la de la línea control, M131 exhibe un patrón aberrante, con proyecciones que se desvían de sus trayectorias normales y una pronunciada defasciculación de los axones de las NLvps.

Por otro lado, se buscó determinar si la expresión en el sistema nervioso de una variante inadecuada del canal, la que contiene el transgén de la línea M131, era suficiente para restaurar el patrón de expresión normal de PDF. El resultado obtenido es sorprendente: no solamente M131 no logra rescatar el defecto, sino que exhibe un fenotipo totalmente aberrante aunque completamente diferente al de *slo⁴* (FIGURA 3.5). Contrariamente a lo que ocurre en el mutante, en la línea M131 se observa una excesiva ramificación de los axones, con proyecciones mucho más largas y defasciculadas que en la línea control. En general las proyecciones de las NLvps se entrecruzan con los axones que provienen de la línea media, desde los somas ubicados en el tritocerebro. Además, es frecuente observar drásticos desvíos en las trayectorias de los axones, que no siguen el curso normal en dirección dorsoposterior sino que proyectan en diagonal desde los somas hacia la *pars intercerebralis*, y en ocasiones

hasta contralateralmente, llegando al hemisferio opuesto. Además, en general la defasciculación comienza en la región adyacente a los cuerpos celulares, y no inmediatamente después de la *pars lateralis* como se observa normalmente. La señal de PDF en estos axones es discontinua y vesiculada, incluso más que en la línea control.

Estos resultados sugieren que no sólo el patrón de expresión del neuropéptido PDF sino también la estructura del circuito constituido por las neuronas ventrales depende de la función adecuada de *slo*, ya que tanto la ausencia del canal como la expresión de una variante que habitualmente no se encuentra en el sistema nervioso provocan aberraciones en la apariencia de este circuito.

PARTE II.- Las alteraciones en la señal de PDF se deben a aberraciones en la estructura del circuito.

En las imágenes de la figura **3.2** (y con menor claridad, aún en la figura **3.1**) se ve que además de que la intensidad de la señal de PDF está disminuida en *slo*⁴, el aspecto general de las ramificaciones de los axones es radicalmente diferente. Para determinar si efectivamente la mutación en *slo* provocaba cambios estructurales en las ramificaciones de los axones de las NLvps se analizaron estas proyecciones marcándolas no sólo mediante el anticuerpo anti PDF sino también con una proteína de fusión entre GFP y el marcador de membrana CD8 (Lee y Luo, 1999). Esta herramienta permite, por un lado, independizarse de cualquier potencial variación en los niveles de *pdf* (cuyo mRNA de todos modos no oscila) ya que al utilizar el sistema Gal4/UAS la expresión de mCD8-GFP es constitutivamente alta, y por otro, marcar la totalidad de las membranas axonales y no solamente aquellos sitios donde PDF se localiza de modo preferencial, como las vesículas sinápticas.

A partir de las líneas *pdf*:Gal4 (Renn et al., 1999) y UAS-mCD8-GFP se generó una línea recombinante que posee ambos transgenes en el mismo cromosoma (ver materiales y métodos) y se realizó inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas de las líneas *pdf*:Gal4-UAS.mCD8.GFP y *pdf*:Gal4-UAS.mCD8.GFP;*slo*⁴ con los anticuerpos anti PDF y anti GFP. En la figura **3.6.A** se puede ver que el defecto de la línea *slo*⁴ en este circuito no solamente involucra la disminución en los niveles de PDF sino que las ramificaciones axonales se encuentran completamente colapsadas. Mientras que en la línea control los axones “viajan” fasciculados hacia la región del protocerebro dorsal donde los fascículos se abren, y a partir de ese punto se extienden neuritas adicionales, en el caso de *slo*⁴ este punto de *apertura y ramificación* no llega nunca a alcanzarse. Los axones están fasciculados durante la totalidad de su trayectoria, y en la mayoría de los casos no se ven ramificaciones adicionales, aunque es posible que esto se deba a que la estrecha proximidad en la que se encuentran los axones hace imposible que puedan distinguirse como neuritas independientes.

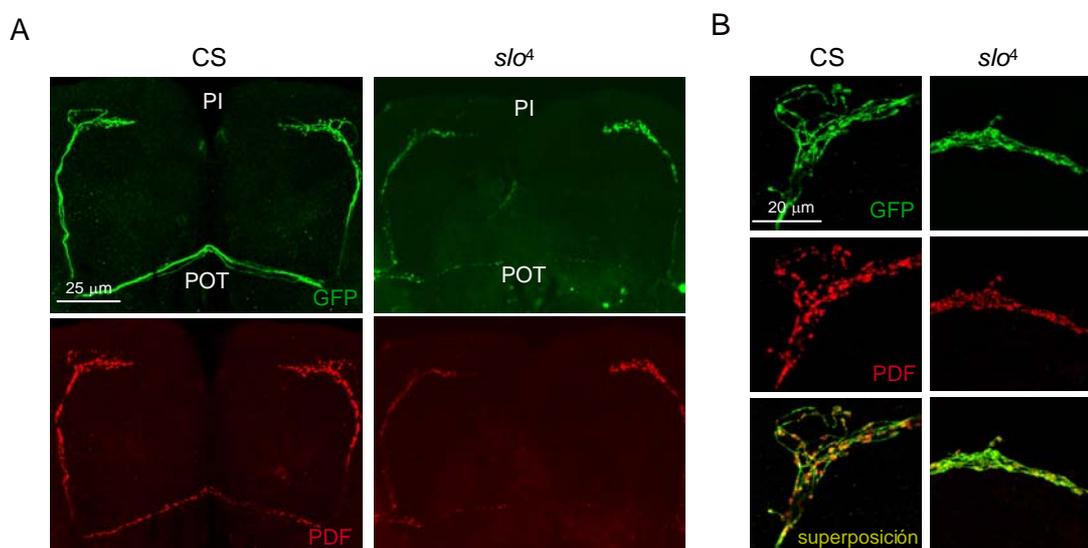


Figura 3.6.- La estructura del circuito PDF está alterada en *slo4*. Inmunohistoquímica en cerebro de moscas adultas de las líneas *pdf:Gal4/UAS-mCD8.GFP* y *pdf:Gal4-UAS-mCD8.GFP; slo4* con anticuerpos anti PDF (rojo) y GFP (verde). Las imágenes revelan las diferencias morfológicas en las proyecciones axonales de las NLvs. (A) Magnificación de la región central y superior del protocerebro dorsal en los dos genotipos. (B) imágenes de mayor aumento sobre las terminales dorsales de las NLvs.

En la figura **3.6.B**, donde se muestra la región más distal de las proyecciones de las NLvs, se pueden ver en mayor detalle las diferencias en el aspecto de estas terminales entre *slo4* y la línea control. Si bien esto demuestra que la función del canal es necesaria para el establecimiento de una estructura adecuada del circuito, a partir de estos datos no es posible discernir si la disminución en los niveles de PDF precede o antecede al defecto conformacional. Incluso podría tratarse de dos defectos “independientes” asociados a la ausencia del canal. Sin embargo, mientras que el defecto en la intensidad de PDF se vuelve evidente en condiciones constantes (figura **3.3.A y B**), las alteraciones estructurales que exhibe el mutante se manifiestan aún en ciclos de LO.

CAPÍTULO 4.- El circuito PDF presenta cambios plásticos regulados circadianamente.

Al analizar las diferencias en las arborizaciones de los axones de las NLvps entre *slo⁴* y CS se observó que existían diferencias cualitativas en la estructura del circuito PDF en la línea control, que en la gran mayoría de los cerebros analizados parecía estar más ramificado al comienzo del día (ZT2) que de la noche (ZT14), lo cual no podía explicarse apelando únicamente a las variaciones en la intensidad de la señal de PDF.

Esta observación llevó al planteo de la hipótesis de que estos cambios estructurales en las terminales dorsales podrían ser estar regulados circadianamente, por ejemplo, como parte del mecanismo utilizado por las neuronas del reloj para regular diferencialmente la comunicación con sus *targets* postsinápticos. Para estudiar en mayor profundidad este fenómeno se adaptó un método desarrollado originalmente para cuantificar ramificaciones de árboles dendríticos de neuronas de vertebrados y se buscó determinar si la variación observada en LO persistía en condiciones constantes y en ausencia de un reloj funcional.

Existen antecedentes de plasticidad estructural en circuitos neuronales, como los cambios en las terminales axonales de las células bipolares en retina de rata (Behrens et al., 1998) o los cambios en la morfología de las espinas dendríticas dependientes de actividad sináptica en cultivos de neuronas de hipocampo (Goldin et al., 2001). Mas aún, se ha demostrado que existen variaciones circadianas en distintas propiedades morfológicas de las interneuronas L1 y L2 en el sistema visual de *Drosophila* y de *Musca domestica* (Gorska-Andrzejak et al., 2005; Pyza y Gorska-Andrzejak, 2004). En este caso se encontraron oscilaciones circadianas en el tamaño y la distribución de las varicosidades (potenciales sitios de liberación sináptica) de los axones de las NLvgs, que envían sus proyecciones hacia el lóbulo óptico. Los autores interpretaron estas modificaciones como parte de un potencial mecanismo para la transmisión diferencial de información desde las NLvgs. La región del lóbulo óptico donde se encuentran los terminales axonales de estas células es una de las pocas regiones del cerebro del adulto en donde existe convergencia entre las señales obtenidas por los distintos grupos que reportaron la identificación del receptor de PDF (Hyun et al., 2005; Lear et al., 2005b; Mertens et al., 2005).

Además, recientemente se ha reportado que el grado de arborización de ciertas motoneuronas de la placa neuromuscular en larvas de *Drosophila* varía significativamente entre el día y la noche. En este caso no se pudo afirmar que este fenómeno se encuentre bajo regulación circadiana ya que no persiste en condiciones constantes, pero, llamativamente, la oscilación desaparece en ausencia de un reloj funcional. Al analizar las arborizaciones en los mutantes *per*⁰¹ y *tim*⁰¹ se encontró que mientras que el primero exhibe una drástica disminución en la cantidad de ramificaciones, en el segundo se observa una constitutiva hiperramificación, mayor a la observada en el punto diurno en la línea control (Mehnert et al., 2007).

En este sentido, este fenómeno tiene características semejantes a las descritas para la oscilación en la intensidad de PDF, ya que también en este caso los mutantes de *per* y *tim* exhiben constitutivamente una única configuración. Todavía no existen evidencias que permitan determinar si la oscilación de PDF redundante en una modulación diferencial de la respuesta postsináptica. De todos modos, recientemente la relevancia de la oscilación circadiana en los niveles de este neuropéptido se ha puesto en duda, ya que su inhibición mediante la sobreexpresión de una proteína que se une a vesículas sinápticas y mantiene la señal de PDF constitutivamente elevada no afecta sustancialmente la ritmicidad comportamental (Kula et al., 2006).

4.1.- Existen cambios plásticos en la morfología del circuito circadiano.

Dado de que el aspecto de las arborizaciones era diferente entre el día y la noche en la línea control se cuantificaron las ramificaciones en dos momentos del día que coinciden con los niveles máximos y mínimos de la señal de PDF (Park et al., 2000), de modo de determinar si esta variación era estadísticamente significativa. Esto permitiría plantear la posibilidad de que independientemente de las diferencias observadas debido a los cambios en la intensidad de la señal de PDF, *podían existir diferencias en las propiedades anatómicas del circuito.*

En primer lugar se repitieron los experimentos descritos en el capítulo anterior, utilizando las líneas *pdf*-Gal4 y mCD8-GFP en un *background* genético silvestre. Como se mostró en el capítulo anterior, esto permite observar la integridad del circuito PDF, por lo que es posible detectar los somas, dendritas y axones de las NLvs grandes y pequeñas. Moscas obtenidas de la progenie del cruzamiento entre estas dos líneas (*pdf*>mCD8-GFP) fueron sincronizadas en ciclos de LO a 25°C desde el momento de la ovipuesta. Posteriormente se realizó inmunohistoquímica en cerebros de individuos adultos (0-3 días a partir del momento de la eclosión) en el quinto día de LO, en ZT2 y ZT14. Estos puntos fueron escogidos porque en ellos se reportó que se detectan el máximo y el mínimo de la intensidad de la señal de PDF (Park et al., 2000). En las imágenes del capítulo anterior además de las variaciones en la intensidad de PDF, puede verse que en la morfología de las terminales dorsales de las NLvps existen diferencias entre el día y la noche. En el punto de la mañana se ve un mayor grado de arborización, mientras que en la noche se ven menos ramas independientes y en una conformación diferente.

Con el objetivo de cuantificar el grado de ramificación se adaptó el método de Scholl, originalmente diseñado para el estudio de los árboles dendríticos. Para esto se realizaron proyecciones 2-D de las galerías de imágenes obtenidas por microscopía confocal, que incluyen la totalidad de las proyecciones en las que se detecta señal de GFP en cada uno de los cerebros (ver materiales y métodos). Sobre estas reconstrucciones se ubicaron seis círculos concéntricos espaciados entre sí por una distancia de 10 μm , cuyo centro fue ubicado en el primer “nodo” de ramificación. Como se describió anteriormente, los axones de las NLvps permanecen fasciculados hasta un punto del protocerebro dorsal donde se desfasciulan y el árbol se *abre*. Este punto fue el elegido como centro del primer círculo.

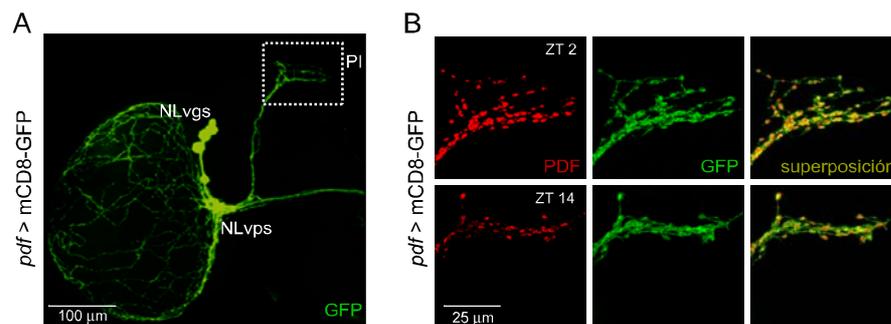


Figura 4.1.- La estructura del circuito PDF varía en ciclos de LO. Reorganización diaria de las terminales de las neuronas del *circuito PDF* en el protocerebro dorsal. Moscas de la línea *pdf > mCD8-GFP* fueron entrenadas en ciclos de LO y los experimentos se realizaron en el quinto día del ciclo. (A) Hemicerebro donde se muestra la región de las proyecciones de las NLvps analizada en los experimentos subsiguientes. (B) Imágenes correspondientes a cerebros disectados a ZT2 y ZT14, donde se realizó inmunohistoquímica empleando anticuerpos contra GFP (verde) y PDF (rojo).

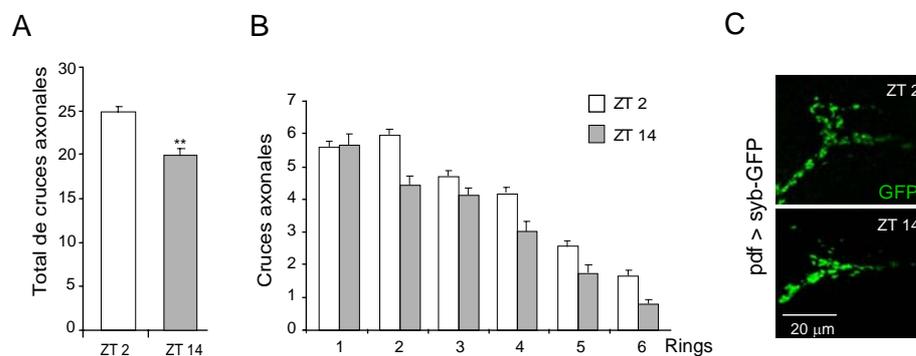


Figura 4.2.- La ramificación del circuito PDF es mayor durante el día. El grado de ramificación de las terminales dorsales de las NLvps se cuantificó utilizando una adaptación del método de Sholl (ver materiales y métodos). (A) El número total de intersecciones entre los círculos concéntricos y las proyecciones axonales fue significativamente distinto entre cerebros disecados durante las primeras horas del día y de la noche ($p < 0,0001$, test no paramétrico de Mann-Whitney). Los datos son el resultado de tres experimentos independientes, con un mínimo de 40 cerebros por genotipo y por punto. Las cuantificaciones se realizaron a ciegas. (B) La complejidad de las arborizaciones axonales es consistentemente menor en la conformación nocturna. (C) La expresión del marcador presináptico *synaptobrevina-GFP* (*pdf > syb-GFP*) en el circuito PDF muestra diferentes arreglos de vesículas sinápticas correspondientes a estos dos puntos del día.

En el ejemplo de la figura, cada uno de los puntos sobre los distintos círculos se contabilizan como *un cruce*, y el total para ese punto es *la sumatoria de estos cruces* (materiales y métodos). La cuantificación de las arborizaciones mediante este método reveló que existen diferencias significativas entre el número de cruces obtenidos para el punto del día y el de la noche (FIGURA 4.2.A) (se utilizó el test estadístico de Mann Whitney para muestras no paramétricas). Existen distintos escenarios posibles para explicar este resultado: las diferencias observadas podrían deberse a la generación y retracción de neuritas (un proceso similar al fenómeno de *prunning*, pero en este caso reversible) o a cambios en el grado de fasciculación de los axones. Si bien aún no existen evidencias para descartar la primera posibilidad, algunas observaciones sugieren que la última opción representa una explicación más probable. Por un lado, se han encontrado oscilaciones circadianas en moléculas de adhesión, específicamente en las NLvps (Justin Blau, comunicación personal). Esto explicaría tanto que los

axones de neuronas independientes como que distintas ramificaciones de una misma neurona tuvieran condiciones diferenciales entre el día y la noche que afectaran el contacto entre unos y otros. Por otro lado, al cuantificar los cruces en cada uno de los círculos por separado se puede ver que, a excepción del primero (en la región proximal en general existe una gran variabilidad, y además la complejidad dada por el entrecruzamiento de distintas neuritas hace más difícil la cuantificación), el valor obtenido para ZT14 es siempre menor que el obtenido para ZT2. Si existiera una retracción de estas proyecciones en la noche, posiblemente esto se vería reflejado en la cuantificación como una disminución especialmente pronunciada en los círculos más distales.

4.2.- La plasticidad estructural persiste en condiciones constantes.

Las variaciones en el grado de arborización observadas entre el día y la noche podrían deberse a un mero efecto directo de la luz, y no a un mecanismo regulado por el reloj endógeno. Para analizar esta posibilidad se realizó un experimento análogo pero durante el segundo día en OO. En este caso moscas de la línea *pdf>mCD8-GFP* fueron entrenadas en ciclos de LO a 25°C desde el momento de la ovipuesta y posteriormente transferidas a condiciones constantes. Se utilizaron adultos del mismo rango de edad del experimento anterior, entre 0 y 3 días luego del momento de la eclosión. Los cerebros fueron disecados en los puntos CT2 y CT14, el comienzo del día y de la noche subjetiva. En estas condiciones, se encontró no solamente que la variación en el grado de arborización persiste, sino que el recuento obtenido para el punto del día subjetivo es similar al obtenido para el punto del día (CT2 y ZT2) y lo mismo ocurre para los puntos nocturnos (FIGURA 4.3.A y B).

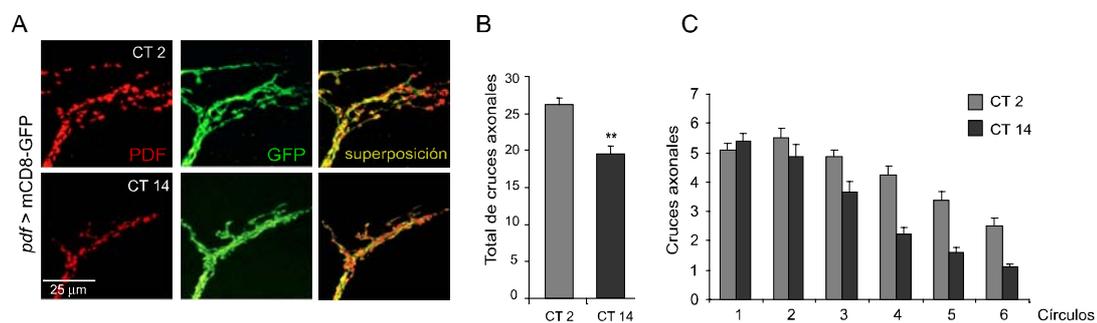


Figura 4.3.- La remodelación del circuito PDF persiste en condiciones constantes.

Cerebros de moscas de la línea *pdf>mCD8GFP* fueron disecados en CT2 y CT14 durante el segundo día de oscuridad constante (OO2). (A) Imágenes representativas tomadas en el día subjetivo (panel superior) y la noche subjetiva (panel inferior) de cerebros incubados con anti-PDF (rojo) y GFP (verde). (B) Los cruces axonales totales son significativamente diferentes durante el día respecto de los de la noche subjetiva ($p < 0,0001$, test no paramétrico Mann-Whitney), y los valores medios son similares a los encontrados en LO. Los experimentos se repitieron 3 veces. Cada punto en la figura representa al menos 32 cerebros. Las cuantificaciones se realizaron a ciegas. (C) El número de intersecciones es consistentemente menor durante la noche subjetiva.

De manera similar a lo realizado para el experimento en ciclos de LO, se analizaron por separado los datos obtenidos para cada uno de los círculos y se encontró que también en condiciones constantes los valores nocturnos (noche subjetiva) son menores para cada uno de ellos, a excepción de los que se encuentran en la región más proximal (FIGURA 4.3.C).

Estos resultados demuestran que existe una regulación circadiana de la plasticidad estructural observada en las terminales dorsales de las neuronas que ocupan la jerarquía más alta entre los osciladores circadianos, las NLvps. A continuación se buscó determinar si el fenómeno persiste en ausencia de un reloj funcional, estudiando el proceso en mutantes para genes del reloj.

4.3.- La remodelación circadiana del circuito depende de la presencia de un reloj funcional.

En todos los experimentos realizados se ve que la señal de GFP “acompaña” a la señal de PDF. Esto significa que mas allá de las variaciones en la intensidad del neuropéptido, el grado de arborización que es posible detectar en los experimentos de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti PDF es similar al que se obtiene con el anticuerpo anti GFP. Esto sugiere que las diferencias reportadas para los mutantes nulos en *per* y *tim* mediante anti PDF (Park et al., 2000) podrían estar reflejando en realidad variaciones en la morfología de las terminales dorsales de las NLvps.

Para determinar si la presencia de un reloj funcional es necesaria para la manifestación de las variaciones estructurales del circuito, se introdujeron los transgenes *pdf-Gal4* y *mCD8-GFP* en las líneas *per*⁰¹ y *tim*⁰¹ y se cuantificó el número de ramificaciones en los puntos ZT2 y ZT14. Si las condiciones ambientales influyen en la manifestación de este fenómeno deberían verse en estas líneas variaciones similares a las descritas en la línea control durante el ciclo de LO. En la figura 4.4.A se muestran imágenes representativas de las terminales axonales de *per*⁰¹ y *tim*⁰¹ en ZT2 y ZT14. La cuantificación, realizada con el método descrito en la sección anterior, no reveló la existencia de diferencias significativas en ninguna de las dos líneas (FIGURA 4.4.B), apoyando la noción de que este fenómeno se encuentra regulado circadianamente³².

³²- Un análisis más exhaustivo de este proceso se está llevando a cabo actualmente en el laboratorio. El objetivo es determinar si persiste en el contexto de otras mutaciones relevantes para la manifestación de los ritmos circadianos (como *pdf*o su receptor), en moscas de edad más avanzada, y si presenta dimorfismo sexual.

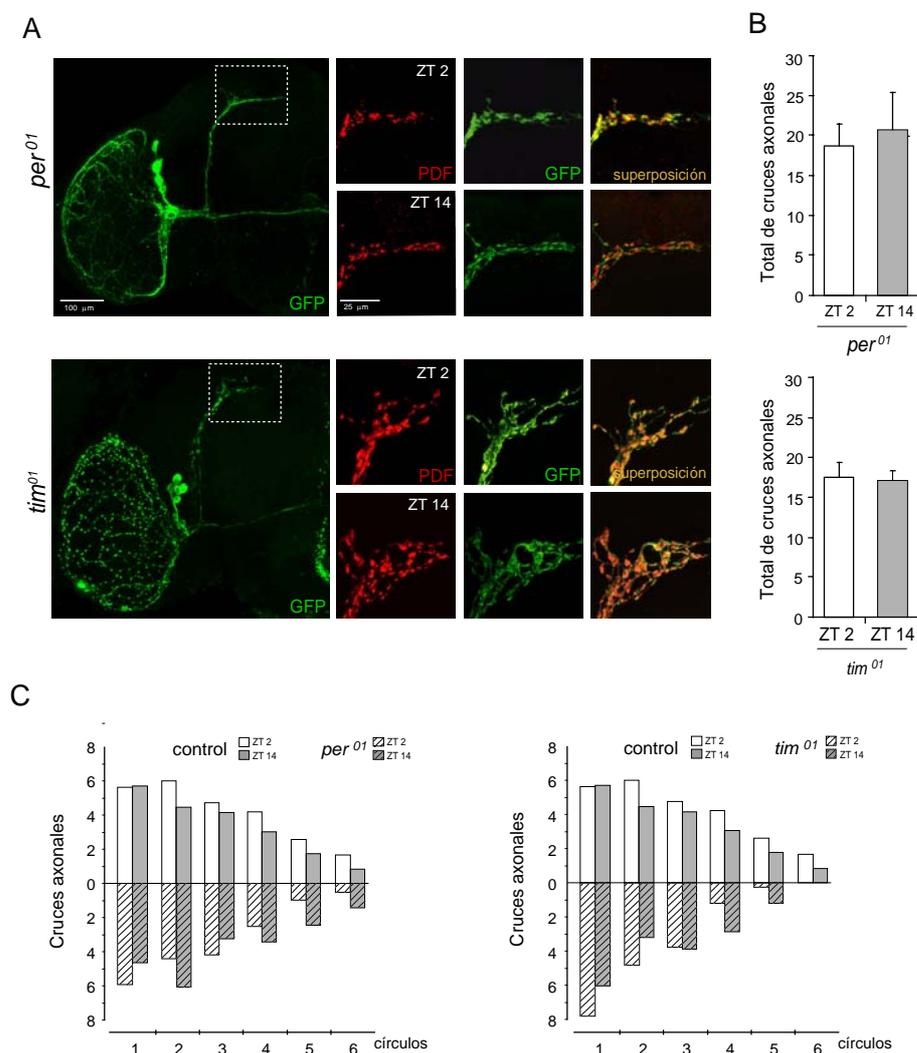


Figura 4.4.- La plasticidad estructural del circuito PDF está bajo el control de los genes del reloj. La línea recombinante *pdf>mCD8-GFP* se analizó en el contexto genético de mutaciones nulas en *per* y *tim* (*per⁰¹*, panel superior, y *tim⁰¹*, panel inferior). Las moscas fueron sincronizadas en ciclos de LO y los cerebros disecados en ZT2 y ZT 14 en LO5. (A) Paneles izquierdos: imágenes de baja magnificación de hemisferios de cerebros de moscas *per⁰¹* y *tim⁰¹*. Véase el grado de desfasciculación en los tractos axonales en *tim⁰¹* a lo largo del protocerebro dorsal. Paneles derechos: imágenes representativas tomadas en ZT2 y ZT14 donde se muestran los efectos diferenciales de estas mutaciones en la estructura del circuito. Los experimentos se repitieron 2 veces. Cada punto en la figura representa 15-21 cerebros. Las cuantificaciones se realizaron a ciegas. (B) No se observaron diferencias significativas entre la configuración del día y de la noche para ninguna de las líneas mutantes ($p > 0,05$, test no paramétrico Mann-Whitney). (C) Las moscas *per⁰¹* presentan un circuito menos ramificado y con una longitud relativamente normal en todos los momentos evaluados; por otro lado, las moscas *tim⁰¹* presentan un fenotipo de ramificación *exacerbada* del circuito, que se caracteriza por ser más corto que en los cerebros salvajes.

Previamente se reportó que la señal de PDF en la línea media desaparece gradualmente a partir del momento de la eclosión (Helfrich-Forster, 1997). En experimentos análogos a los descritos en las figuras 4.1-4 realizados con moscas de 1, 2 y 3 días a partir del momento de la eclosión se encontró que en la línea media la señal de GFP también desaparece gradualmente, demostrando que en el caso de las células del tritocerebro que expresan PDF se está produciendo un fenómeno de *pruning*. Para descartar un posible efecto del desarrollo en la plasticidad estructural de las terminales de las NLvps se realizaron experimentos análogos a los descritos, en los puntos ZT2 y ZT14 del ciclo de LO, en moscas de 1, 2 y 3 días y se pudieron detectar variaciones en la arborización de los axones en cada uno de estos días (datos no mostrados).

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que existe una variación circadiana en el grado de ramificación de las neuronas del reloj en *Drosophila*. Estos cambios podrían repercutir en diferencias en la actividad del circuito circadiano, refinamiento de las conexiones que el circuito establece con neuronas postsinápticas e inclusive el acceso diferencial a estas neuronas en distintos momentos del ciclo. Dada la importancia del establecimiento adecuado de las conexiones sinápticas, la capacidad de una neurona de regular espacial y temporalmente el contacto con las células que se encuentran río abajo depende de un conjunto de procesos biológicos altamente organizados. En el caso del sistema circadiano, la regulación de la transmisión de información río abajo de las NLvps es un proceso fundamental que última instancia redundante en su capacidad de controlar la ritmicidad comportamental.

CAPÍTULO 5.- Expresión y desregulación de *slowpoke* en el circuito circadiano.

Los experimentos que se describen en este capítulo tienen como objetivo determinar si *slowpoke* se expresa en alguna de las estructuras relevantes para el control de la ritmicidad comportamental y analizar los efectos en el comportamiento de la desregulación de su función específicamente en los distintos grupos de neuronas que componen el circuito circadiano.

Además de la pronunciada falta de ritmicidad de los mutantes en *slo* en distintos paradigmas comportamental descrita en los primeros capítulos de esta tesis, otros laboratorios han reportado diversos fenotipos comportamentales asociados a la ausencia de canal (Atkinson et al., 1998; Atkinson et al., 2000; Peixoto y Hall, 1998). Si bien posiblemente la manifestación de los distintos fenotipos del mutante *slo*⁴ es consecuencia de la falta del canal en todos los lugares donde normalmente se expresa, distintos datos presentados en esta tesis demuestran que la función de *slowpoke* en sistema nervioso es necesaria y suficiente para rescatar aquellos fenotipos asociados a la disfunción del reloj circadiano.

En la primera parte se describen las distintas estrategias utilizadas para estudiar la localización de SLO y las razones por las que se eligió utilizar un anticuerpo dirigido contra el homólogo del canal en otro insecto, la cucaracha *Periplaneta americana* (Derst et al., 2003). Los primeros intentos por estudiar la expresión de *slowpoke* en *Drosophila*, realizados en el laboratorio de Nigel Atkinson, quien clonó este canal, permitieron conocer cuáles son a grandes rasgos los tejidos en los que se expresa (Becker et al., 1995; Brenner et al., 1996; Brenner y Atkinson, 1996; Brenner y Atkinson, 1997; Yu et al., 2006). Sin embargo, como los experimentos se realizaron mediante hibridaciones *in situ* de muy baja resolución, no fue posible a partir de esos datos determinar su localización en circuitos neuronales específicos o estudiar potenciales colocalizaciones con otras proteínas. En este capítulo, mediante el uso del anticuerpo anti pSLO se describe la expresión del canal en relación a las distintas estructuras relevantes para el reloj circadiano.

En la segunda parte se presentan experimentos en los que se buscó desregular la función del canal mediante su expresión ectópica en distintos circuitos circadianos, mediante una línea que porta la inserción UAS-SLO. Esta línea transgénica fue generada en el transcurso de esta tesis por el método de transformación de la línea germinal (Rubin y Spradling, 1982; Spradling y Rubin, 1982). Una de las grandes ventajas del uso de *Drosophila* como sistema modelo es precisamente la posibilidad de desregular la función génica en forma específica de tejido e independizarse así de los potenciales epifenómenos de una mutación generalizada. En estos experimentos buscamos determinar las consecuencias comportamentales de la alteración de la excitabilidad neuronal específicamente en las células relevantes para el reloj.

PARTE I.- SLO se expresa en estructuras relevantes para el control del comportamiento.

5.1.- Localización del canal.

Durante el transcurso de esta tesis se utilizaron distintas estrategias para estudiar la localización del canal con el objetivo de determinar si se expresa en alguno de los grupos de neuronas relevantes para el control de la ritmicidad comportamental. En primer lugar, se utilizó un anticuerpo peptídico contra la versión de *slowpoke* de mamíferos³³, KNCMA1 o BK (los canales SLO-1 se denominan habitualmente *big K*, por su gran conductancia unitaria). Si bien mediante este anticuerpo se pudo detectar localización en el cerebro del adulto, la calidad de esta señal era muy baja y no fue posible llevar a cabo un análisis confiable a partir del cual determinar los circuitos específicos donde el canal se expresa (ANEXO 4.1).

La segunda estrategia consistió en expresar la proteína reportera GFP bajo el control del promotor de *slowpoke*, utilizando una línea *slo-GAL4*³⁴. En este caso se obtuvo una excelente señal de GFP, intensa y de alta resolución, pero que no reporta el patrón completo de expresión de *slo* ya que la construcción *slo-Gal4* está compuesta por una secuencia parcial del promotor del canal. Si bien se detectó señal en varias estructuras conocidas del cerebro del adulto, como los lóbulos de la antena o los cuerpos pedunculados, éstas sólo representan una fracción de los lugares donde el canal se expresa normalmente. De hecho, no se encontró señal en algunas regiones donde se sabe que existe una amplia expresión, como los lóbulos ópticos (Brenner y Atkinson, 1996). Sin embargo, se detectaron grupos de células que expresan *slo* en el protocerebro dorsal, adyacentes a algunos grupos de neuronas dorsales (ND1 y ND2). Es a esta región del cerebro adonde llegan las terminales dorsales de las NLvps, y en la gran mayoría de los cerebros analizados se detectó en cada uno de los hemisferios al menos una célula de tamaño intermedio que se ubica precisamente en la región más distal de estos axones (ANEXO 4.3).

³³ -Este anticuerpo fue donado por el laboratorio de Osvaldo Uchitel.

³⁴ -Esta línea fue generada en el laboratorio de Nigel Atkinson.

La tercera estrategia involucró la utilización de una línea transgénica en la que el gen que codifica para la enzima β -galactosidasa fue clonado en fase en uno de los exones compartidos por todas las variantes del canal. Esta línea fue utilizada en los experimentos originales en los que se analizó la expresión del canal mediante hibridaciones *in situ* (Becker et al., 1995; Brenner et al., 1996; Brenner y Atkinson, 1996; Brenner y Atkinson, 1997; Chang et al., 2000). El mismo patrón de expresión reportado por el laboratorio del Dr. Nigel Atkinson, tanto en larva como en adulto, fue el obtenido al analizar las imágenes generadas mediante microscopía confocal luego de realizar inmunohistoquímica con un anticuerpo contra la proteína β -galactosidasa. Sin embargo, dado que la versión del gen reportero empleada no contiene señales de localización nuclear ni citoplasmática, fue imposible determinar si existía o no colocalización con otros anticuerpos en un compartimiento subcelular determinado (ANEXO 4.2). Por lo tanto, mediante esta herramienta no fue posible estudiar la potencial coexpresión con marcadores de neuronas del circuito circadiano.

5.1.1.- El anticuerpo contra pSLO detecta específicamente dSLO.

Finalmente, se utilizó un anticuerpo dirigido contra la versión de slo de *Periplaneta Americana* (Derst et al., 2003). Existe un alto porcentaje de homología entre pSLO y dSLO, y la región que posee el epítipo contra el que está dirigido el anticuerpo, que pertenece al extremo C-terminal de la proteína, se encuentra altamente conservada. Para determinar si mediante este anticuerpo podía reconocerse específicamente a dSLO se realizó inmunohistoquímica en cerebros de individuos adultos de la línea CS, utilizando al mutante nulo en *slo* como control negativo.

Como se muestra en la figura 5.1, si bien existen algunas regiones con mínima expresión residual del anticuerpo en la línea *slo*⁴, la señal que se detecta en CS no está presente en *slo*⁴ en las condiciones del experimento. Es posible que parte de la señal inespecífica se deba a que el anticuerpo esté reconociendo subunidades de otros canales iónicos que poseen regiones de alta similitud de secuencia con la región de *slo* que contiene el epítipo. La señal específica obtenida es especialmente intensa en el lóbulo óptico (FIGURA 5.1.A), donde se sabe que el canal se expresa ampliamente, y en el protocerebro dorsal (FIGURA 5.1.B).

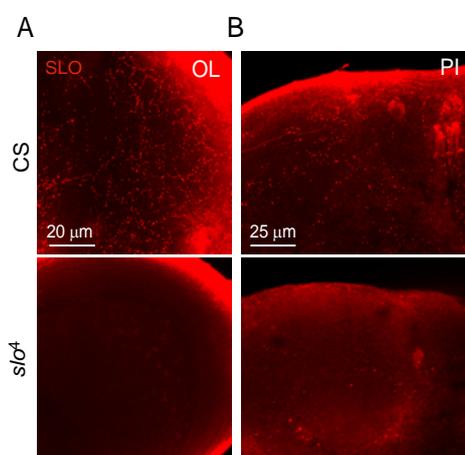


Figura 5.1.- El anticuerpo pSLO reconoce específicamente a *slowpoke* en *Drosophila*.

Imunohistoquímica en moscas jóvenes de las líneas CS y *slo*⁺ (0-5 días) mostrando la especificidad del anticuerpo anti pSLO en el cerebro de *Drosophila*. Las imágenes se tomaron en idénticas condiciones y el experimento se repitió 4 veces con idénticos resultados. En la figura se muestran las dos regiones del cerebro del adulto que presentan más señal. (A) Ampliación del lóbulo óptico (OL), donde se extienden neuritas SLO+. (B) Protocerebro dorsal, incluyendo la señal en uno de los grupos neuronales de la PI.

La señal detectada es punteada y discontinua, ubicada a lo largo de los axones, como por ejemplo a lo largo de la línea media, de la gran comisura formada por proyecciones contralaterales, en los cuerpos elipsoidales o el complejo central, del cual se sabe que está involucrado en el control de la locomoción en insectos. La detección de SLO mayoritariamente en membranas axonales es consistente con la localización presináptica esperable para un canal cuya función principal es la repolarización de la membrana luego de un potencial de acción. Sin embargo, en varias regiones del cerebro también se encontró señal sobre el soma de las neuronas, aunque en general ésta es más tenue que la detectada sobre los axones. En la *pars intercerebralis*, por ejemplo, se detectó una clara señal de SLO sobre dos grupos de 4 neuronas en cada hemisferio (FIGURA 5.1.B). Es precisamente en *clusters* de la PI (además de los fotorreceptores) donde se reportó la oscilación de SLOB, el principal regulador del canal (Jaramillo et al., 2004) y es a esta región adonde llegan los axones de las células del tritocerebro que expresan PDF. Además, se cree que la PI, una de las principales áreas de secreción de neurohormonas del cerebro de *Drosophila* (Rajashekhar y Singh, 1994;Saunders, 1997), podría ser un punto de contacto entre los osciladores circadianos y el resto del organismo (Helfrich-Forster, 2005). En el trabajo original donde se utilizó este anticuerpo en *P.americana* también se detectó señal del canal tanto a lo largo de neuritas como en los cuerpos celulares, aunque el tejido analizado en este caso fue el de los ganglios torácicos y no cefálicos.

5-1-2.-Expresión de *slo* en el circuito canónico del reloj.

En primer lugar se buscó determinar si el canal se expresa en las NLvps, para lo cual se disecaron cerebros de moscas adultas de la línea recombinante *pdf-Gal4,mCD8-GFP* y se realizaron experimentos de inmunofluorescencia doble con los anticuerpos anti pSLO y anti GFP. En la figura 5.2.A se muestra la señal obtenida en el lóbulo óptico y la médula anterior, y se ve que no se detecta colocalización en los cuerpos celulares de las NLvs grandes ni de las pequeñas. Sin embargo, a lo largo de las proyecciones axonales de las NLvgs que inervan el lóbulo óptico se observan múltiples sitios donde ambas señales parecen colocalizar (FIGURA 5.2.A, recuadro). Imágenes de mayor aumento de esta región revelan que, en efecto, SLO y GFP colocalizan sobre estos axones (FIGURA 5.2.D y E). Esto es especialmente evidente en las varicosidades, potenciales sitios de contacto con neuronas postsinápticas.

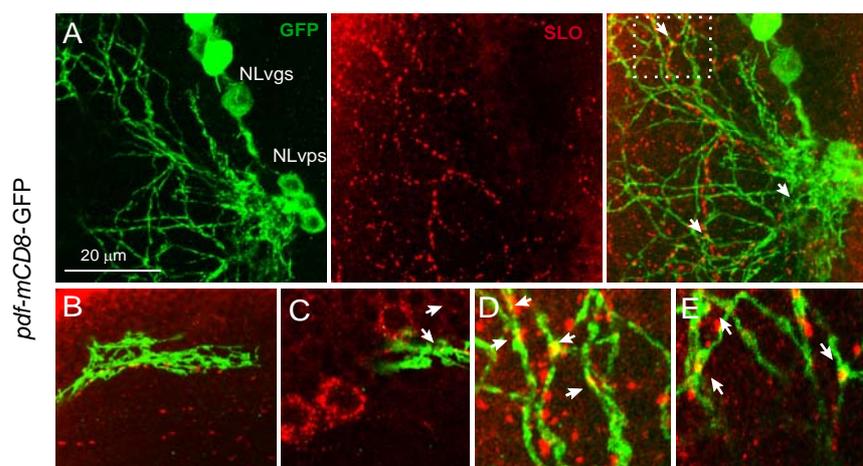


Figura 5.2.- Localización de *slo* sobre las NLvps. Inmunohistoquímica en cerebros de adultos (0-5 días) con anticuerpos anti GFP y anti pSLO sobre moscas de la línea *pdf-Gal4/UAS-mCD8-GFP*. (A) En el lóbulo óptico ambos anticuerpos revelan una extensiva ramificación (la señal de GFP proviene sólo de las NLvgs). (B-C) Señal de pSLO relativa a las terminales dorsales de las NLvps. (C) Cuerpos celulares de neuronas que expresan SLO en la región del protocerebro dorsal adonde llegan las NLvps. (D-E) Colocalización de SLO y GFP en imágenes ampliadas de los axones que inervan el lóbulo óptico.

En las terminales dorsales de las NLvps también se detectó la señal punteada y discontinua típica de SLO (FIGURA 5.2.B). Si bien las imágenes de menos de 1 μm de espesor sugieren que podría existir colocalización, la resolución de esta técnica no permite afirmar en forma concluyente que la señal detectada corresponda a la presencia de SLO en estos axones. Sin embargo, en la región inmediatamente adyacente a éstos se detectó una clara señal de SLO sobre los cuerpos celulares de dos grupos pequeños de neuronas de simetría bilateral (FIGURA 5.2.C). Como se describió al inicio de esta sección, también mediante la expresión de GFP bajo el promotor parcial de *slo* se detectaron neuronas que expresan el canal cuyos somas están inmediatamente adyacentes a las terminales de los axones de las NLvps (ANEXO 4.2).

A continuación se realizó un experimento análogo pero en la progenie del cruzamiento entre las líneas *tim*-Gal4 y UAS-mCD8-GFP (*tim*>mCD8-GFP). En la figura 5.3.A se muestra un hemisferio cerebral donde se ve señal de GFP en todos los grupos de neuronas del reloj y en una gran cantidad de fotorreceptores, especialmente en la región periférica del lóbulo óptico. Respecto de la localización de SLO la situación es similar a la encontrada al expresar GFP bajo el promotor de *pdf*: si bien no se detecta colocalización en los cuerpos celulares se observa señal del canal a lo largo de subgrupos de axones de las ND1 y ND3 que proyectan hacia la línea media (FIGURA 5.3.B y C). Nuevamente, la resolución de las imágenes no permite afirmar categóricamente que el canal se exprese en estas células.

En la figura 5.3.B se muestra una galería de tres imágenes consecutivas desde la región anterior a posterior de las NDs, donde se observa como las proyecciones de estas neuronas se dirigen hacia una región en donde se encuentran los somas de las células de la PI que expresan SLO (así como también axones que proyectan a lo largo de la línea media y provienen de neuronas SLO⁺ ubicadas en tritocerebro). En

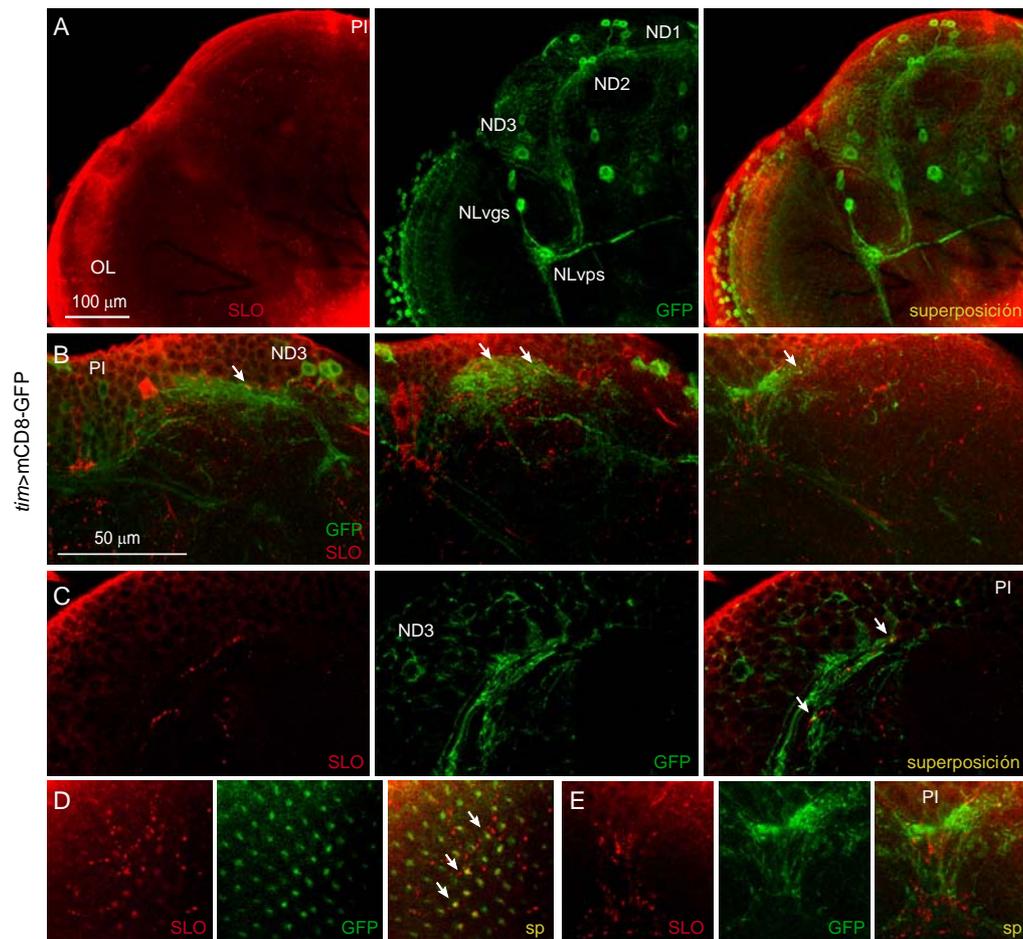


Figura 5.3.- Localización de *slo* sobre el circuito circadiano. Inmunohistoquímica en cerebros de individuos jóvenes (0-5 días) incubados con anticuerpos anti GFP y anti pSLO sobre moscas de la línea *tim-Gal4/UAS-mCD8-GFP*. (A) Hemicerebro donde se muestra la señal de SLO en relación con el circuito marcado por la expresión de GFP bajo el promotor de *tim*. (B) Galería de tres imágenes consecutivas (de posterior a anterior) de las proyecciones de las neuronas dorsales que se dirigen hacia la PI, donde se encuentran algunos de los grupos de neuronas que expresan SLO. (C) imagen de 0,6 μ m de espesor donde se muestra la señal de SLO sobre algunos de los axones de las neuronas dorsales que proyectan hacia la PI. (D) Colocalización de SLO y GFP en el lóbulo óptico. "sp" indica superposición de ambas señales (E) Tanto células del tritocerebro que expresan SLO como la mayoría de las proyecciones de las neuronas dorsales terminan en la PI.

5-1-3.-Neuronas del cerebro dorsal coexpresan SLO y PDFR.

Finalmente, se analizó la expresión de SLO en relación al patrón de expresión del receptor de PDF (Mertens et al., 2005). En la figura **5.4.A**, donde se muestra un hemisferio de un cerebro de un individuo silvestre (*y w*), se ve que ambos anticuerpos tienen una señal llamativamente similar, discontinua y punteada, principalmente sobre los procesos de neuritas, en muchos casos correspondientes a axones que integran neuropilos conocidos como los lóbulos de la antena, los cuerpos elipsoidales o el complejo central.

En las imágenes de mayor aumento de estas proyecciones (FIGURA **5.4.C y E**) se observa que existen puntos de colocación entre ambas señales, en este caso más claros que los observados sobre las proyecciones de las NLvps y NDs ya que en ambos casos se trata de “dominios” discretos sobre las membranas axonales y no se están comparando señales que presentan una distribución completamente diferente como en los casos anteriores (a excepción de las terminales de las NLvgs en el lóbulo óptico). Si bien es esperable que la localización del canal sea presináptica, en el caso del receptor de PDF es llamativo encontrar señal a lo largo de los axones de tantos neuropilos.

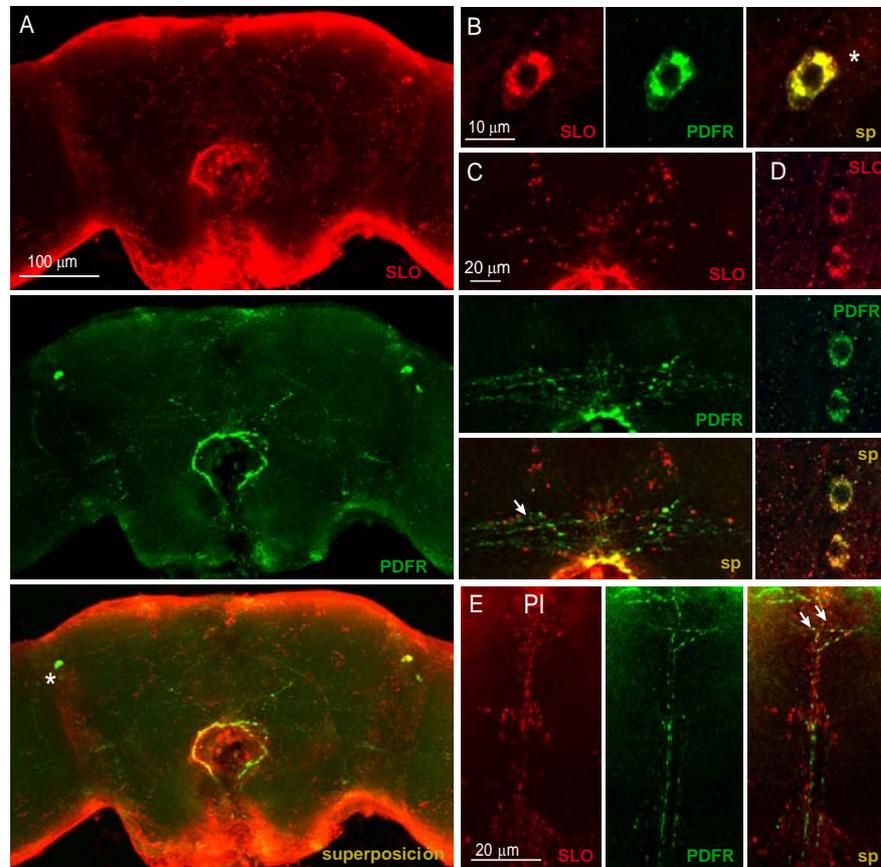


Figura 5.4.- *slo* colocaliza con el receptor de PDF. Inmunohistoquímica en moscas de la línea *y w*, utilizando anticuerpos específicos contra SLO (rojo) y receptor de PDFR (verde). (A) Patrón de distribución de anti SLO y anti PDFR en un cerebro de adulto. El asterisco indica las células *braplet*, donde ambos colocalizan. (B, D) colocalización entre SLO y PDFR en grupos de neuronas dorsales (D) y en la célula neurosecretoria *braplet* (B). (C) axones de la gran comisura donde se coexpresan ambas proteínas. (E) Distribución de Slo y PDFR a lo largo de la línea media.

Al analizar los distintos grupos de neuronas que expresan uno u otro anticuerpo en el soma, se encontró que existe una clara colocalización en algunos *clusters* del protocerebro dorsal (FIGURA 5.4.D). Se trata de grupos de células de pequeño tamaño ubicadas en la región dorsal lateral posterior (indicadas con un asterisco en la figura

5.4.A) que se encuentran *en el recorrido* de los axones de las NLvps hacia el protocerebro dorsal. Además, SLO y PDFR son coexpresados por las *braplet* (FIGURA 5.4.B), dos grandes células neurosecretorias de simetría bilateral que envían sus proyecciones hacia la PI y donde se sabe que se expresa *tim* (aunque en estas células TIM no oscila en cuanto a su localización subcelular). Se cree que las *braplet* están inmediatamente río abajo de las NLvps y serían esenciales para la transmisión de información desde estas células (Orie Shafer, comunicación personal).

5.2.- El silenciamiento de *slo* afecta la ritmicidad en actividad locomotora.

Si bien los resultados anteriores demuestran que SLO está presente en células relevantes para el circuito circadiano ya que colocaliza con el receptor de PDF, a partir de los experimentos realizados con *pdf>mCD8-GFP* y *tim>mCD8-GFP* no es posible determinar si el canal también se expresa en alguno de los grupos de neuronas canónicas del reloj, los clusters ventrales, dorsales y laterales dorsales.

Sin embargo, el hecho de que SLO oscile tanto a nivel de RNA como de proteína (Ceriani et al., 2002) sugiere que el canal se expresa o bien en células en las que los genes del reloj se expresan y ejercen directa o indirectamente el control transcripcional y/o post traduccional del canal, o en células donde moléculas que se encuentran río abajo de los componentes del reloj son responsables de esta regulación. Además, el canal deja de oscilar en una línea mutante para el gen *Clk*, *Clk^{irk}* (Ceriani et al., 2002) lo que apoya la noción de que la regulación circadiana de los niveles del canal es un mecanismo utilizado por el reloj para modular diferencialmente las propiedades de la membrana y sugiere que SLO y CLK podrían ser coexpresados en las células en las que es necesaria esta modulación.

Para determinar si la disminución en los niveles del canal (no ya a nivel generalizado como en la línea *slo⁴* sino específicamente en las NLvs) produce un efecto en la ritmicidad comportamental se utilizó una línea que porta una construcción que contiene las secuencias necesarias para inhibir la expresión del canal mediante la técnica de ARN de interferencia. Esta línea contiene la secuencia *slo-RNAi* río abajo

del UAS, por lo que permite el silenciamiento de la expresión de *slo* en forma tejido específica (*Drosophila RNAi library*, IMB, Austria).

En la figura 5.5.A se muestra un actograma representativo del cruzamiento entre las líneas *pdf-Gal4* y UAS-*slo*-RNAi, incluyendo a esta última sin combinar con una línea Gal4 como control negativo. El silenciamiento de la expresión del canal específicamente en las NLvs produce una desorganización de la actividad, especialmente notoria luego de que las moscas son dejadas en condiciones constantes. La actividad durante la noche subjetiva es muy alta comparada con la de la línea control, y el porcentaje de ritmicidad disminuye sustancialmente (FIGURA 5.5.B).

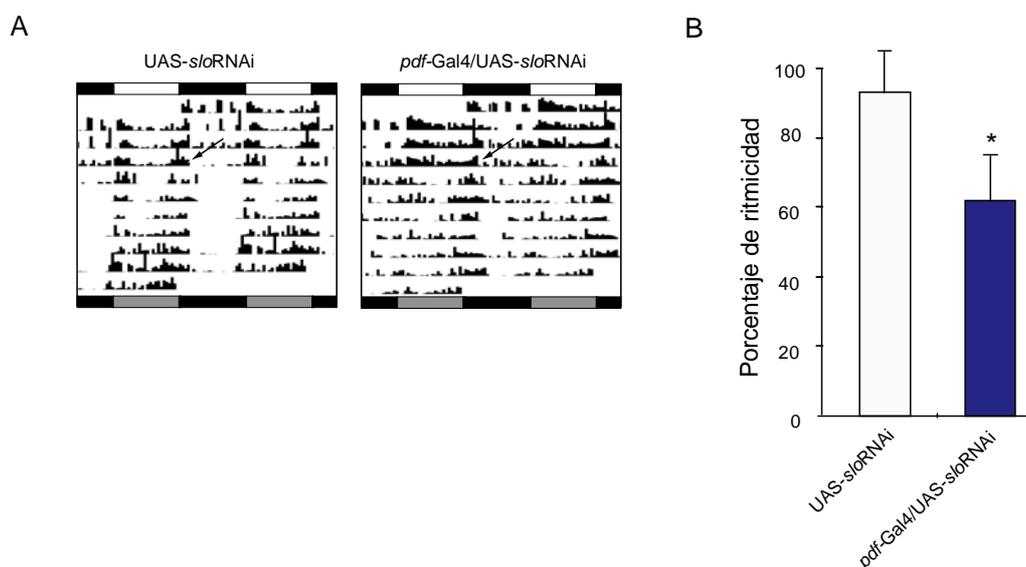


Figura 5.5.- El silenciamiento de lo específicamente en las NLvps altera la consolidación de la actividad. (A) Actogramas representativos de la línea control, UAS-*slo*-RNAi, y la línea *pdf-GAL4/UAS-slo*-RNAi. Las flechas indican el momento de transferencia a OO. Las barras blancas indican la fase del día, las negras la noche, las grises el día subjetivo y las negras inferiores la noche subjetiva. El análisis se realizó como se describe en materiales y métodos. (B) El porcentaje de ritmicidad de la línea *pdf-GAL4/UAS-slo*-RNAi es significativamente menor que el de la línea control (test t de Student, $p < 0.05$).

Este experimento se realizó con una sola copia del transgén UAS-*slo*-RNAi. Varios autores han reportado que en general la eficiencia de estas líneas es muy baja, por lo que habitualmente se incluyen múltiples copias del RNAi y/o de la construcción que posee el Gal4, o se incluye la expresión ectópica de la proteína DICER para aumentar la eficiencia de la maquinaria de silenciamiento. En experimentos futuros del laboratorio se estudiará el efecto en el comportamiento de la disminución mas pronunciada de los niveles de *slo* en las NLvps. De todos modos, aún con una sola copia de la inserción es posible ver el efecto en la desconsolidación de la actividad y el descenso en los niveles de ritmicidad. De hecho, la mayor parte de los individuos en los cuales el programa encuentra ritmicidad y asigna un período no exhiben un comportamiento similar al de una línea silvestre.

Si bien el fenotipo observado al silenciar la expresión de *slo* específicamente en las NLvs no es en absoluto tan severo como el de la línea *slo*⁴, el hecho de que aún la inhibición parcial de la expresión del canal en estas células tenga un efecto en el comportamiento sugiere fuertemente que existe expresión endógena de SLO en este circuito. Contrariamente a lo que ocurre con la sobreexpresión o la desregulación de la expresión génica, que pueden alterar propiedades de la célula por interferir con algún proceso fisiológico relevante durante el desarrollo de todo el individuo, el silenciamiento sólo tiene efecto si el gen es expresado en el tejido en cuestión.

PARTE II.- La sobreexpresión de *slo* altera específicamente las manifestaciones comportamentales de los osciladores **M** y **E**.

En la sección anterior se demostró que la disminución de la función de *slo* específicamente en las NLvps produce alteraciones en la ritmicidad comportamental. Para determinar si la sobreexpresión del canal en el circuito del reloj también afecta la consolidación de la actividad se generó una línea transgénica que permiten dirigir la expresión de *slo* en forma tejido específica, mediante el método de transformación de la línea germinal (ver materiales y métodos).

5.1.- La expresión de *slo* restringida a las NLvps no rescata el fenotipo de *slo*^Δ.

En primer lugar se utilizó la línea UAS-*slo* para determinar si la expresión del canal específicamente en el circuito del reloj era suficiente para rescatar la arritmicidad comportamental del mutante nulo. Para esto se generaron las líneas *pdf-Gal4;slo*^Δ y *tim-Gal4;slo*^Δ y se cruzaron por la línea UAS-*slo*. Analizando los porcentajes de ritmicidad en LO y OO se encontró que si bien existe un pequeño incremento en el porcentaje de ritmicidad en OO, éste no es significativamente distinto del de las líneas silvestres (datos no mostrados).

Este resultado no es sorprendente dado que la expresión y función de este canal se encuentra altamente regulada y sería improbable que los niveles de SLO generados a partir de la expresión ectópica fueran los adecuados como para restaurar el nivel de expresión endógeno. Por otro lado, si la oscilación en los niveles del canal tiene relevancia biológica ésta se vería inhibida por la utilización del sistema Gal4/UAS, ya que los niveles de expresión que se obtienen son constantes (Yang y Sehgal, 2001).

5.2.- La sobreexpresión de *slo* en una línea silvestre provoca arritmicidad.

Para estudiar los efectos comportamentales de la sobreexpresión de *slo* se analizó el patrón de actividad de la progenie del cruzamiento entre la línea UAS-*slo* y *pdf-Gal4* en el contexto genético de una línea silvestre. En la figura 5.6 se muestran actogramas representativos de individuos en los que el canal fue sobreexpresado bajo el promotor de *pdf*.

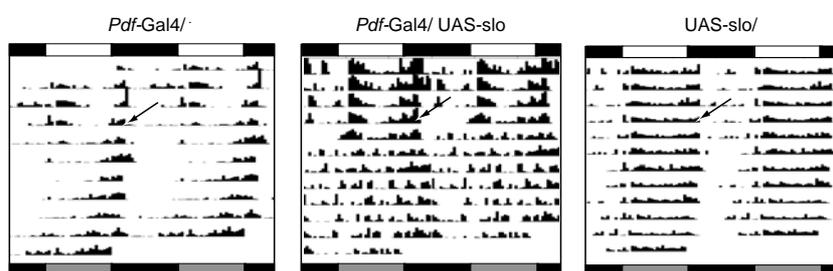


Figura 5.6.- La sobreexpresión de SLO genera desorganización de la actividad en condiciones constantes. (A) Actogramas representativos de las líneas control, UAS-*slo* y *pdf-Gal4* en heterocigosis, y de la línea *pdf-Gal4/UAS-slo*. Las flechas indican el momento de transferencia a OO. El análisis se realizó según se describe en materiales y métodos.

Además, al sobreexpresar *slo* bajo los promotores de *tim* y *elav* se encontró una pronunciada arritmicidad en condiciones constantes, especialmente evidente en el caso de *elav*, lo cual es esperable dado que se demostró previamente que el canal se expresa en varios lugares del cerebro además de neuronas relevantes para el reloj circadiano (ANEXO 6). Además, la capacidad de sincronización en ciclos de luz y oscuridad también está afectada, ya que estas moscas presentan niveles anormalmente elevados de actividad nocturna. Estos resultados demuestran que la alteración de los niveles de *slo* específicamente en el circuito circadiano afecta las manifestaciones comportamentales de los distintos osciladores tanto en ciclos de LO como en condiciones constantes.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados a lo largo de este trabajo de tesis corroboran la hipótesis inicial que postulaba que *slowpoke* era una molécula clave para la *salida* de información desde el reloj circadiano hacia las vías eferentes que en última instancia posibilitan el control de la ritmicidad comportamental.

En primer lugar, se estudiaron las manifestaciones comportamentales más importantes del reloj circadiano y se demostró que todas se encuentran afectadas por la mutación en *slo*. Distintos escenarios podrían dar cuenta de este resultado: o bien el reloj no puede ser sincronizado porque la mutación afecta las vías de *entrada* que permiten que las oscilaciones moleculares se ajusten a la fase determinada por el *Zeitgeber*, o el oscilador molecular *per se* está afectado, o la mutación interfiere con las vías a través de las cuales la ritmicidad se propaga río abajo del reloj molecular.

La primera posibilidad puede ser descartada con sólo analizar en detalle los experimentos iniciales. Si las vías de entrada al reloj estuvieran afectadas, se observaría ritmicidad comportamental a nivel individual pero desincronización entre la población (cada una de las moscas sería rítmica pero cada una exhibiría una *fase* diferente). Una de las propiedades más importantes del reloj circadiano es precisamente que, si bien puede ser sincronizado por distintos factores ambientales, es funcional aún si un organismo no ha sido expuesto en ningún momento a factores sincronizadores. De este modo, una línea de *Drosophila* que ha sido mantenida por varias generaciones en condiciones constantes sigue manteniendo la ritmicidad comportamental aunque el *ritmo* de cada uno de los individuos posee una *fase* distinta. En forma análoga, líneas mutantes que son *circadianamente ciegas*, ya que tienen afectadas todas las vías de sincronización fótica, siguen manifestando ritmicidad en condiciones constantes aunque no puedan ser sincronizadas a los ciclos de LO (Helfrich-Forster et al., 2001). Esta situación no es la que se observa al analizar los mutantes en *slo*, donde la mayor parte de los individuos presenta arritmicidad o ritmicidad débil. Además, al analizar sus oscilaciones moleculares en LO se ve que todos los osciladores del cerebro están en fase con el *Zeitgeber* y resultan indistinguibles de la línea control. Por lo tanto, se puede afirmar que la mutación en

slo no afecta las vías de fotopercepción que median la sincronización del oscilador molecular a los ciclos de luz y oscuridad.

Sin embargo, el comportamiento de *slo⁴* durante el ciclo de entrenamiento dista de ser semejante al de la línea control. Mientras que las moscas CS exhiben el típico fenotipo crepuscular, respondiendo con picos de actividad a las transiciones de fase y *anticipando* estas transiciones con un incremento gradual de la actividad, en el caso de *slo⁴* ni las respuestas directas a las transiciones ni las anticipaciones se ven con claridad en ciclos de entrenamiento estándar. Además, mientras que las líneas silvestres son claramente diurnas (la cantidad de actividad promedio durante la fase del día es cerca del doble de la nocturna), las mutantes en *slo* no parecen poder distinguir entre la fase diurna y la nocturna, ya que su actividad se encuentra homogéneamente distribuida a lo largo del ciclo, a excepción de un leve incremento en respuesta al encendido de la luz.

Una situación análoga se observa al entrenar a las moscas en ciclos de temperatura (25°C-20°C), ya que mientras que la línea control consolida su actividad claramente durante la fase de temperatura más alta (que corresponde al “día”), en *slo⁴* la actividad está distribuida en forma indistinta entre las fases de alta y baja temperatura. Nuevamente, estas mutantes no parecen poder interpretar comportamentalmente las claves ambientales que en condiciones normales establecen la dicotomía entre el día y la noche.

El entrenamiento en ciclos de luz y oscuridad resulta más informativo en términos de la disección del funcionamiento de los componentes del reloj, ya que como se discutió en la introducción y en el capítulo 2, las anticipaciones a las transiciones de fase representan las manifestaciones comportamentales del funcionamiento de los dos osciladores que integran el circuito circadiano, el oscilador **M** y el oscilador **E** (Grima et al., 2004; Rieger et al., 2006; Stoleru et al., 2004). Al estudiar el comportamiento de las líneas mutantes en *slo* se ve que si bien en el caso de *slo⁴* resulta difícil determinar si estas anticipaciones están presentes o no, en *slo¹* se ve un claro incremento gradual de la actividad a medida que se acerca la transición de luz a oscuridad. Dado que estos resultados sugerían que el oscilador **E** podía estar preservado, se utilizó otro paradigma de entrenamiento que permite mayor resolución en la separación entre las

respuestas directas a las transiciones y las anticipaciones. En esta condición, las moscas silvestres continúan anticipando la mañana y la noche en función de su entrenamiento anterior, alrededor de las 8 a.m. y 8 p.m., mientras que responden a las transiciones dos horas antes y dos horas después, respectivamente. Las mutantes en *slo* no mostraron anticipación de la mañana pero sí anticipación de la noche, especialmente evidente en el caso de *slo*¹. Estos resultados demuestran que en ciclos de LO, a pesar de que todos los grupos de neuronas que componen los osciladores del cerebro están sincronizados al ambiente, a nivel comportamental se vuelve evidente el funcionamiento del oscilador E pero no del oscilador M, aquel que ocupa la jerarquía más alta en el control de la ritmicidad comportamental.

Por otro lado, tanto la expresión de la variante de *splicing* de *slowpoke* predominante en el sistema nervioso como la utilización de una línea transgénica que remueve los promotores neuronales del canal demuestran que la función de *slo* en SNC es necesaria y suficiente para el rescate de los fenotipos asociados a la disfunción del circuito circadiano en *slo*⁴. La línea B52, que expresa la variante neuronal de *slo*, no es significativamente diferente de la línea control respecto de su ritmicidad en condiciones constantes, y en ciclos de LO resulta indistinguible de las moscas silvestres tanto respecto de su capacidad de consolidar la actividad en la fase diurna del ciclo como de las respuestas directas y anticipaciones a las transiciones de fase. Contrariamente, la línea M131, que expresa la variante muscular del canal, exhibe un fenotipo similar al de *slo*⁴ en todos los parámetros mencionados. La capacidad de la línea B52 de rescatar casi por completo el fenotipo de *slo*⁴ es llamativa, dado que como la construcción que posee la secuencia del canal se ubica río abajo de un promotor constitutivo, es posible que se exprese en lugares donde no se expresa normalmente. Sin embargo, estas moscas no presentan alteraciones comportamentales evidentes y resultan en general indistinguibles de las líneas silvestres. Esto puede deberse a que el alto nivel de regulación del canal impida que se exprese o que sea funcional en aquellos tejidos donde se lo estaría expresando ectópicamente. Se sabe que existen varios moduladores de la probabilidad de apertura del canal, como SLOB, CamKII o LEO, pero puede que existan otros reguladores que sean esenciales para que el canal sea funcional, que al no estar presentes en otros tejidos impidan las disfunciones que la expresión ectópica de *slo* podría causar en la línea B52. En cualquier caso, previamente se demostró que esta línea es capaz de rescatar fenotipos

electrofisiológicos y comportamentales asociados a la falta de *slo* en sistema nervioso (Atkinson et al., 1998; Atkinson et al., 2000; Ghezzi et al., 2004).

El segundo escenario planteado al principio de la discusión presentaba la posibilidad de que la mutación en *slo* afectara intrínsecamente al oscilador molecular. Los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica en los que se analiza el patrón de localización de PER y TIM en las NLvps en condiciones constantes revelan que las oscilaciones moleculares en estas células están conservadas en *slo*⁴. Estos experimentos demuestran en forma concluyente que la mutación en el canal *no afecta el funcionamiento del reloj molecular*, y aportan una evidencia importante en favor del rol de *slo* en la salida hacia las vías eefectoras.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros laboratorios al alterar la excitabilidad de las neuronas del reloj de *Drosophila* con distintos canales iónicos. En uno de los casos se encontró que una mutación en el canal *narrow abdomen* genera un importante grado de arritmicidad comportamental sin afectar en absoluto las oscilaciones moleculares en las NLvps (Lear et al., 2005a). En clara similitud con lo reportado para la línea *slo*⁴ en el capítulo 2, en el mutante *na* la fase de las oscilaciones moleculares en las ND₁ está adelantada, aunque contrariamente a lo que ocurre en el mutante en *slo* en este caso aparentemente existe un incremento en la acumulación de PDF en las terminales dorsales. Más aún, los autores encontraron que *na* se expresa en las NLvps, y, sin embargo, afecta el comportamiento sin alterar el reloj molecular.

Por otro lado, experimentos llevados a cabo por Nitabach et al. (2006) demuestran que el incremento en la excitabilidad de las NLvps mediante la expresión específica de tejido de *NaChBac*, un canal de sodio activable a voltajes despolarizados, afecta la consolidación de la actividad sin alterar las oscilaciones moleculares. Este canal proviene de bacterias, y no se ha determinado hasta que punto su utilización puede ser extrapolada a *Drosophila*. Sin embargo, es interesante destacar que también en este caso las alteraciones en la excitabilidad neuronal mediadas por la disfunción de un canal iónico afectan la ritmicidad comportamental sin afectar el reloj molecular y provocan desincronización en los grupos de neuronas dorsales. Los resultados obtenidos en esta tesis, en conjunto con los recién mencionados, sugieren que las alteraciones de la excitabilidad neuronal en las células del reloj de *Drosophila* no

necesariamente repercuten en sus oscilaciones moleculares, pero afectan directamente la capacidad de sincronizar tanto los osciladores que se encuentran río abajo como el comportamiento en actividad locomotora.

El efecto comportamental de la sobreexpresión de *NaChBac* en las NLvps no es arritmicidad absoluta sino en realidad una *descomposición* de la actividad en múltiples componentes de período, lo que se denominó *ritmos complejos* (Nitabach et al., 2006). En este caso, el análisis de los periodogramas revela que para un individuo existen múltiples períodos que pasan la línea de significancia. En el caso de *slo⁴*, aunque el porcentaje de ritmicidad resulta muy bajo en comparación con el de la línea control, la mayor parte de los individuos no son *arrítmicos* sino *débilmente rítmicos* (TABLA 1.1), de acuerdo a las categorías de análisis establecidas en el laboratorio (ver materiales y métodos). En la figura 6.1 se muestra el resultado del análisis de un experimento de actividad locomotora según una clasificación alternativa.

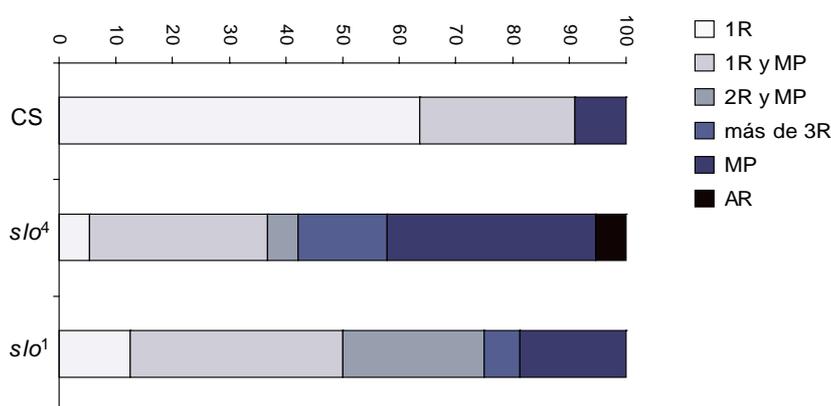


Figura 6.1. La mutación en *slo* genera un patrón de ritmicidad complejo. El gráfico muestra el resultado de un experimento representativo de actividad locomotora que fue analizado según el método alternativo que se describe en la sección de materiales y métodos. Los datos corresponden sólo a los días en condiciones constantes. Las barras blancas corresponden al porcentaje de individuos para los que un solo período pasa la línea de significancia (rítmicos) y las barras negras al porcentaje de individuos para el cual no se detectó ritmicidad (arrítmicos). En todas las categorías intermedias están representados aquellos individuos en los que el programa detecta más de un período (MCP) y que en las condiciones de análisis estándar se clasificarían en su mayoría como DR.

En el gráfico se puede ver que, de hecho, la mayor parte de las moscas *slo⁴* no son arrítmicas sino que presentan más de un período, aunque en la amplia mayoría de los casos la *fuerza* de todos ellos es muy leve (como revelan los valores de FFT para esta línea). Según los protocolos habituales de análisis de periodogramas, la mayor parte de estos individuos de múltiples períodos son clasificados como débilmente rítmicos, precisamente porque tienen más de una componente de periodicidad, y, además, en general éstas no exceden considerablemente la línea de significatividad.

Dado que *slowpoke* está involucrado en la repolarización de la membrana, y se ha demostrado que alteraciones en su función afectan no sólo la forma y duración de los potenciales de acción sino también la liberación de neurotransmisores y el potencial de reposo (Atkinson et al., 1991; Atkinson et al., 1998; Atkinson et al., 2000; Brenner et al., 2000), es posible que la mutación nula en este canal también aumente la excitabilidad neuronal, lo cual sería consistente con el hecho de que, como NaChBAC, genera la *desorganización de la actividad en múltiples frecuencias*.

Por otro lado, se ha reportado que el silenciamiento de la actividad eléctrica específicamente en las NLvps provoca arritmicidad comportamental pero *interfiere con las oscilaciones moleculares* en condiciones constantes (Nitabach et al., 2002). En este caso se utilizó una línea transgénica que permite la expresión específica de tejido del canal de potasio *Kir 2.1* (Rohrbough et al., 2003). Si bien esta observación parece contrastar con los resultados discutidos anteriormente, existe una diferencia sustancial en la estrategia utilizada en este caso: la sobreexpresión de un canal como *Kir* no modifica la excitabilidad neuronal o la forma de los potenciales de acción sino que *anula por completo el potencial de membrana* debido al incremento masivo en la conductancia de potasio. Por este motivo, no es una situación analogable a las anteriores, ya que existe una enorme cantidad de procesos fisiológicos que dependen de la existencia de una adecuada diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular, y no es sorprendente que las oscilaciones moleculares que subyacen al reloj circadiano sean parte de ellos.

En el caso del mutante *slo⁴*, las alteraciones en la actividad eléctrica causadas por la falta del canal provocan defectos evidentes en las vías de señalización río abajo de las NLvps. La desincronización observada en los grupos dorsales, NLds y ND1, es

consistente con la observación de que la señal del neuropéptido PDF, único factor sincronizador conocido del reloj circadiano en *Drosophila*, está severamente disminuida. Además, en ausencia de *slo* desaparece la oscilación en la intensidad de PDF en las terminales dorsales de las NLvps.

Más aún, los resultados obtenidos al dirigir el reportero GFP a la membrana de las NLvps en la línea *slo*⁴ demuestran que no solamente la señal de PDF se encuentra afectada en ausencia del canal sino que la estructura del circuito subyacente está colapsada. Se ha reportado previamente (Griffith y Budnik, 2006) que la adecuada actividad eléctrica de una neurona durante su desarrollo es esencial para el correcto establecimiento de las conexiones sinápticas. De hecho, se ha demostrado que mutaciones en canales de potasio generan patrones aberrantes en la morfología axonal en motoneuronas de la placa neuromuscular de *Drosophila*.

Estos resultados motivaron un análisis más exhaustivo de la morfología de las terminales dorsales de las NLvps, que dio lugar al conjunto de experimentos presentados en el capítulo 4, donde se demuestra que existe una regulación circadiana de la plasticidad estructural en este circuito. Este es un potencial mecanismo adicional que podría ser utilizado por las neuronas del reloj para el acceso diferencial a sus contactos postsinápticos, que en última instancia permitiría un control más fino de la ritmicidad comportamental (Fernández et al., en revisión).

El tercero de los escenarios posibles presentados al inicio de la discusión planteaba la posibilidad de que la mutación en *slo* afectara las vías de *salida* de información río abajo del reloj. En suma, los resultados presentados a lo largo de esta tesis apoyan la hipótesis de que *slowpoke* es parte de un mecanismo inherente al reloj circadiano que permite a las neuronas que lo componen la regulación temporal de la excitabilidad del circuito. Los experimentos de localización del canal mediante inmunohistoquímica no permiten concluir categóricamente que es expresado en alguno de los grupos canónicos del reloj, pero distintas líneas de evidencia sugieren que ésta es la situación más plausible. Por un lado, la interferencia mediada por RNA específicamente en las NLvps produce alteraciones en la ritmicidad comportamental. Por otro, la oscilación de *slo* reportada a nivel de RNA y proteína (Ceriani et al., 2002) sugiere que el canal se expresa o bien en lugares en los que los genes del reloj se expresan o en células

donde moléculas que se encuentran río abajo de los componentes del reloj son responsables de esta regulación.

Además, la observación de que canal deja de oscilar en la línea *Clk^{rk}* sugiere que al menos en algunos grupos de neuronas relevantes para el control del comportamiento SLO y CLK son coexpresados, y aporta una fuerte evidencia en favor de la hipótesis de que la regulación circadiana en los niveles *slo* es un mecanismo esencial mediante el cual el reloj circadiano modula diferencialmente las propiedades de la membrana. Más aún, *slo* oscila en fase con *slob*, su principal regulador, por lo que en los momentos de la noche y de la noche subjetiva donde la expresión del canal es máxima también se encuentra el pico de expresión de la proteína que regula positivamente su probabilidad de apertura.

Finalmente, en el transcurso de este trabajo aparecieron varios resultados interesantes de distintos laboratorios que sugieren que el modelo propuesto en esta tesis, en el cual *slowpoke* es un componente esencial de la *salida* del reloj circadiano, es un mecanismo conservado a través de la evolución. Se ha reportado que el análogo de *slo* en mamíferos, BK, oscila en el núcleo supraquiasmático, el reloj central en mamíferos, exactamente en la misma fase que la reportada en *Drosophila*, y que esta oscilación desaparece en un mutante para *per* (Meredith et al., 2006). Lo que es aún más sorprendente es que los autores demuestran que un mutante nulo en *mslo* también presenta arritmicidad comportamental aunque las oscilaciones moleculares en el NSQ no se encuentran afectadas.

En mamíferos no están desarrolladas las múltiples herramientas genéticas que posibilitaron la disección de las alteraciones diferenciales que la ausencia del canal provoca en los distintos osciladores del cerebro, pero la utilización de técnicas electrofisiológicas en las neuronas del reloj permite estudiar el mecanismo que involucra a *slo* como una molécula clave en la *salida* del reloj. Desde hace tiempo se sabe que existe una oscilación circadiana en la frecuencia de disparo espontáneo en el NSQ que desaparece en los mutantes del reloj. Además, se han encontrado en las neuronas del reloj oscilaciones circadianas en corrientes de potasio dependientes de calcio (el único canal conocido que involucra una corriente de este tipo es *slo*) (Kuhlman y McMahon, 2004; Pitts et al., 2006). La observación de que la oscilación en

los PA del NSQ desaparece en ausencia de *slo* demuestra que la actividad de este canal es un factor fundamental en el mecanismo de regulación de las propiedades de la membrana por parte del reloj circadiano (Meredith et al., 2006).

Este sorprendente resultado llevó a la postulación de un mecanismo presente en las neuronas que componen el reloj circadiano de mamíferos por el cual la oscilación en los niveles de *slo* afectaría *directamente* la excitabilidad neuronal, siendo el *principal factor responsable* de la oscilación en la frecuencia de disparo del NSQ (Colwell, 2006).

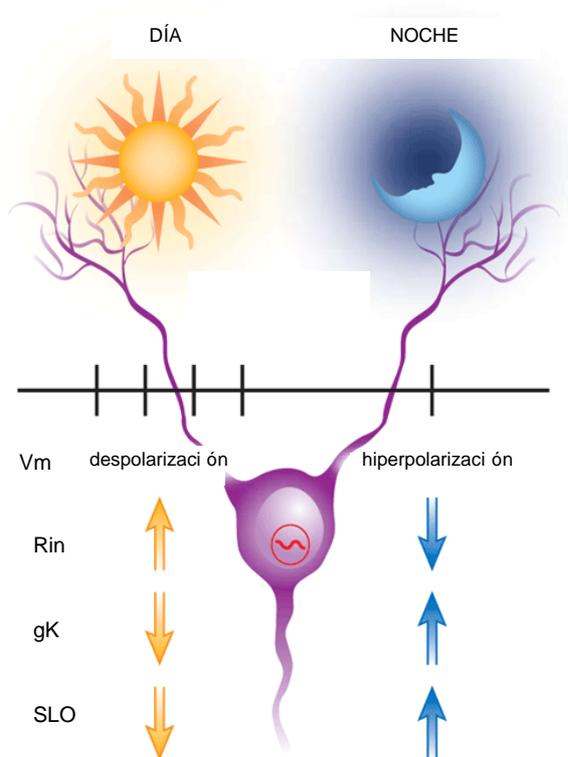


Figura 6.2. La oscilación en los niveles de *slowpoke* determina la oscilación en la frecuencia de disparo del NSQ. Adaptado de Colwell et al 2006.

Este modelo sostiene que durante la noche, cuando la expresión de *slo* es máxima, la hiperpolarización de la membrana neuronal provocada por el aumento en la corriente

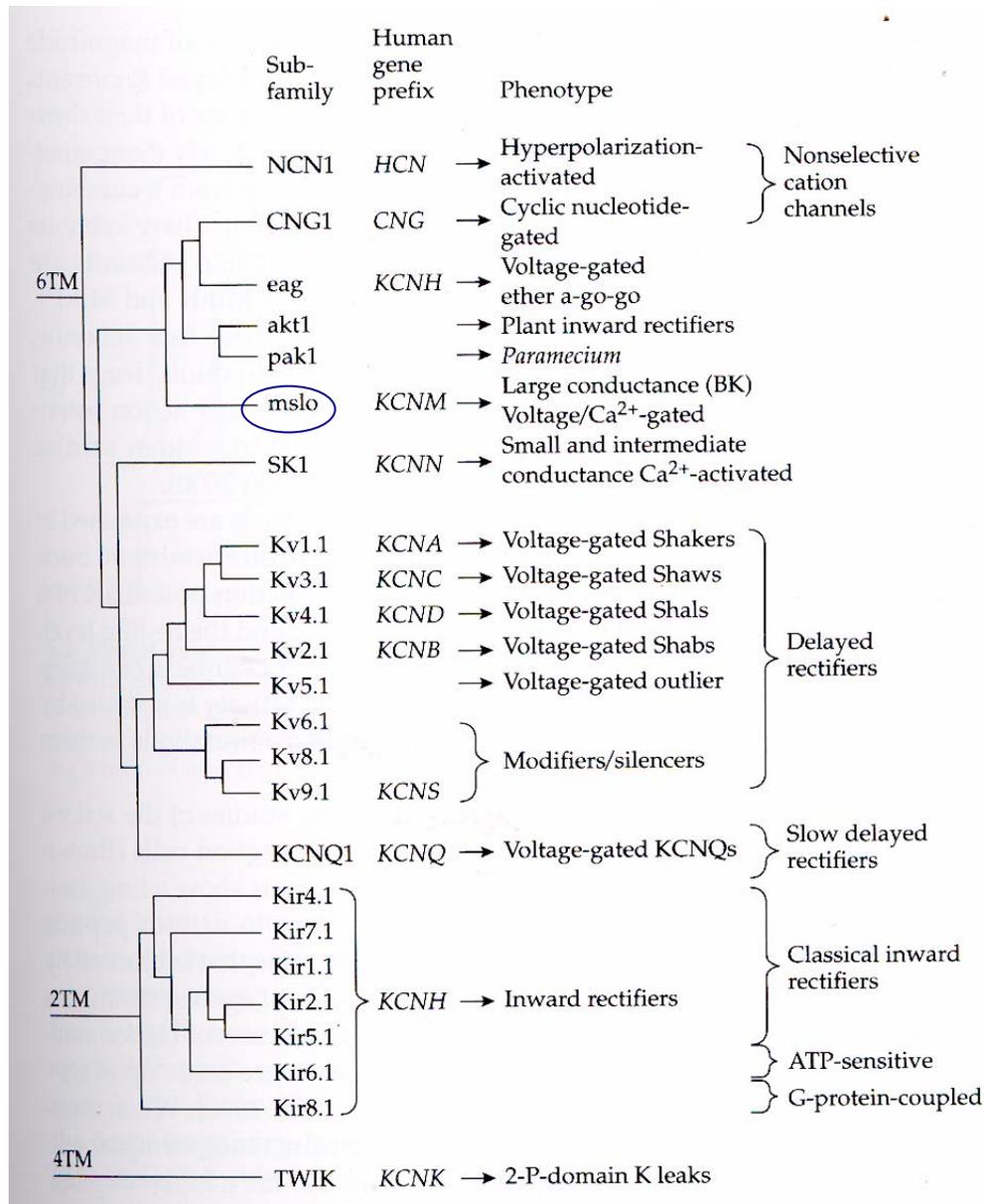
de potasio mediada por el canal genera una disminución en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. Por el contrario, durante el día, las neuronas del NSQ están más despolarizadas ya que la expresión del canal está en su nivel mínimo, y esta disminución en los niveles de *slo* correlaciona con el aumento en la frecuencia de disparo (FIGURA 6.2). En el mutante nulo en *mslo*, las membranas de las neuronas del NSQ están permanentemente despolarizadas y la frecuencia de disparo es constitutivamente alta (Meredith et al., 2006).

La oscilación en la frecuencia de disparo, determinada por la excitabilidad diferencial de la membrana entre el día y la noche (y entre el día subjetivo y la noche subjetiva), posibilitaría entonces la propagación rítmica de las señales eléctricas río abajo del reloj molecular. Además, la ritmicidad en la expresión de distintos factores secretados, como posiblemente sea el caso de PDF en *Drosophila*, dependería también de la excitabilidad de las neuronas del reloj en un determinado momento del ciclo.

Esta oscilación en las propiedades eléctricas de membrana de las neuronas del reloj determina su capacidad de controlar la consolidación de la actividad. La posibilidad de que en el mutante *slo⁴* las neuronas que integran el oscilador **M** estén “atascadas” en una condición explicaría la casi absoluta incapacidad de esta línea para consolidar su actividad en la fase diurna en todas las condiciones experimentales analizadas. El hecho de que las mutantes en este canal *nunca puedan distinguir el día de la noche* aporta fuertes evidencias en favor del modelo en el cual la oscilación en la actividad eléctrica de las neuronas del reloj es un factor esencial en la propagación de las oscilaciones moleculares que en última instancia posibilitan el control circadiano de la ritmicidad comportamental.

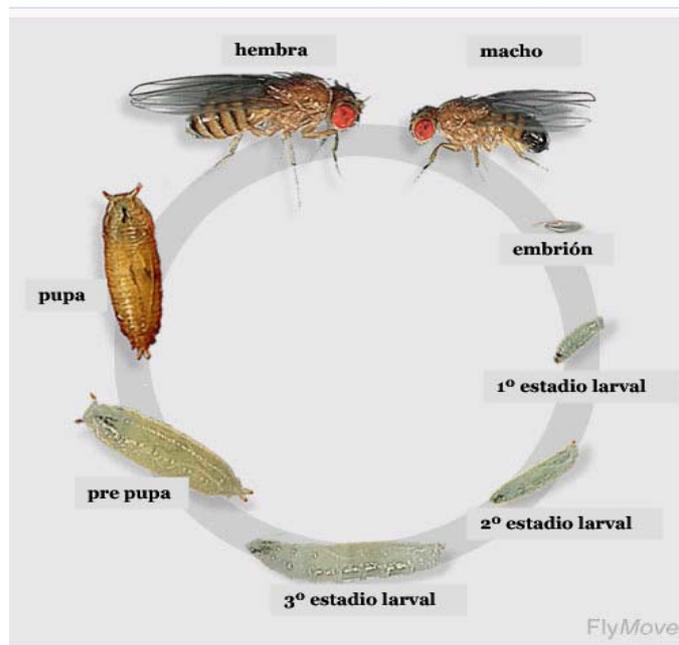
ANEXOS

ANEXO 1.-



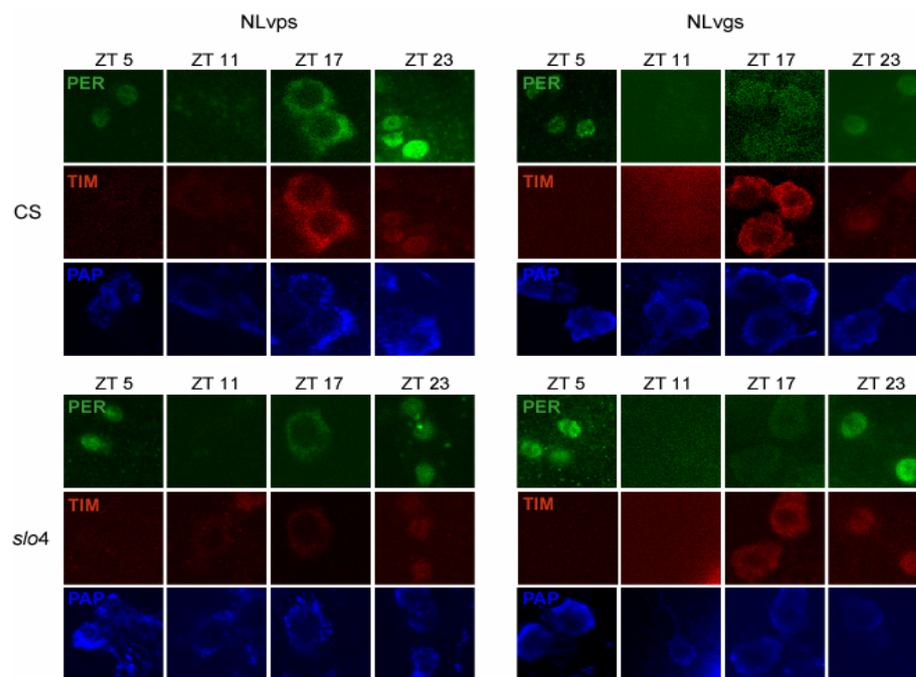
ANEXO 1. Familias y subfamilias de canales de potasio. Los canales conocidos se clasifican según la similitud de sus secuencias aminoacídicas. La clasificación primaria se establece en función de la topología de membrana (2, 4 o 6 pasos transmembrana). El diagrama fue realizado alineando las secuencias de 89 canales, principalmente de mamíferos. Se indica sólo un miembro representativo de cada subfamilia. La longitud de las ramas no representa intervalos temporales sino relaciones evolutivas (Hille, 2001).

ANEXO 2.-

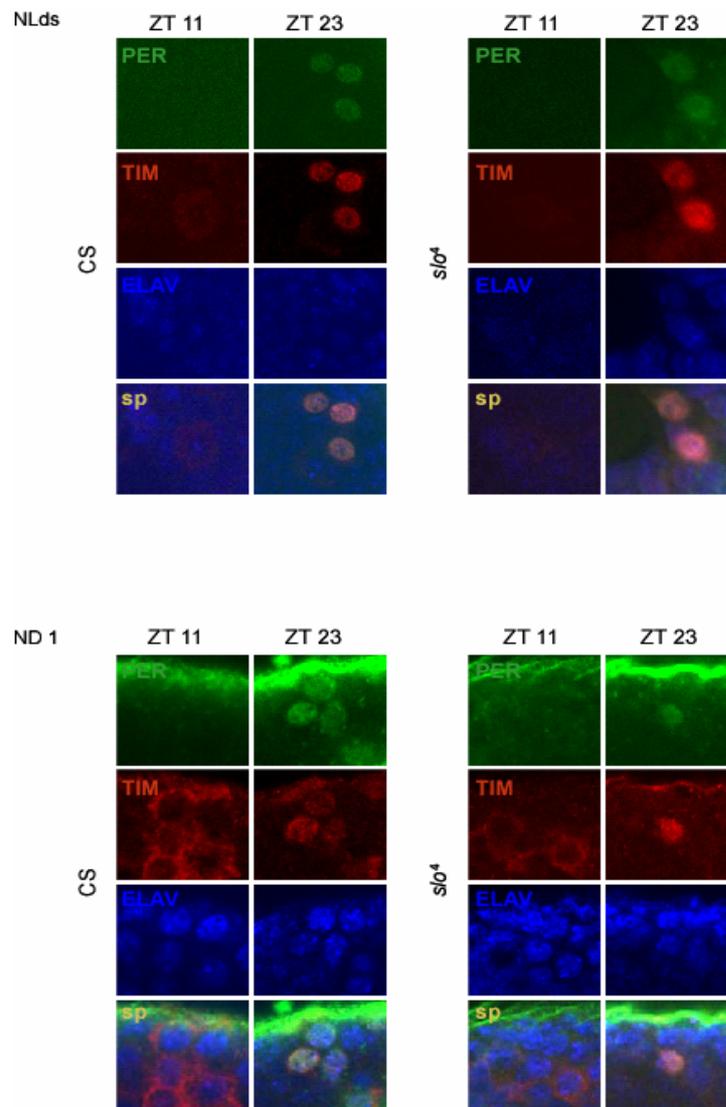


ANEXO 2. Ciclo de vida de *Drosophila*. El ciclo de vida de *Drosophila* tiene una duración que varía entre 10 y 15 días, dependiendo de la temperatura. A 25°C, la temperatura utilizada habitualmente en las cámaras del laboratorio, este ciclo dura 12 días en promedio. A partir de los huevos fecundados se desarrolla el embrión, que pasa por distintos estadios fácilmente identificables. Aproximadamente 24 horas más tarde emergen larvas de primer estadio, que al segundo día pasan a ser larvas de segundo estadio y 24 horas más tarde se desarrollan a larvas de tercer estadio, que a las 48 horas generan la pupa. El proceso de metamorfosis se completa en 4 días, dando lugar al adulto formado. A partir del momento de la eclosión, las moscas viven cerca de 60 días (para una temperatura de 25°C) (adaptado de FlyMove-Trends in Genetics 19, 2003).

ANEXO 3.-

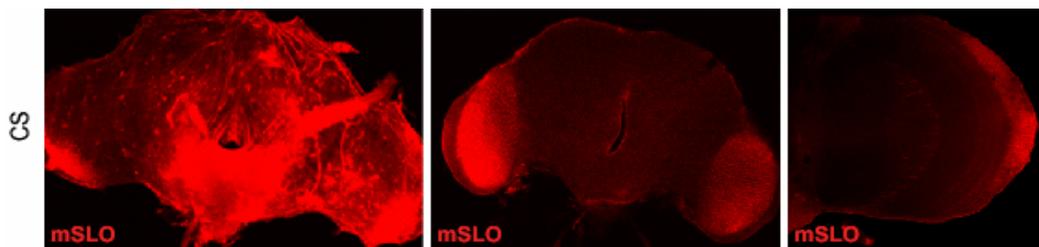


ANEXO 3.1. Oscilaciones moleculares en ciclos de luz y oscuridad en las neuronas del circuito PDF. Moscas recién eclosionadas (0-5 días) de las líneas CS y *slo4* fueron sincronizadas en ciclos LO y las muestras fueron tomadas durante el quinto día del ciclo de entrenamiento. En la figura se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de cerebros en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar el patrón de distribución de TIM (rojo) o PER (verde) en los puntos ZT5, ZT11, ZT17 y ZT23. PAP (pro PDF, señal azul) se utilizó como marcador para identificar unívocamente las NLvs en los cerebros de moscas CS (panel superior) y *slo4* (panel inferior). A su vez, las NLvps y NLvgs pueden distinguirse entre sí fácilmente por su forma, posición y tamaño. El experimento fue repetido 2 veces con idénticos resultados.

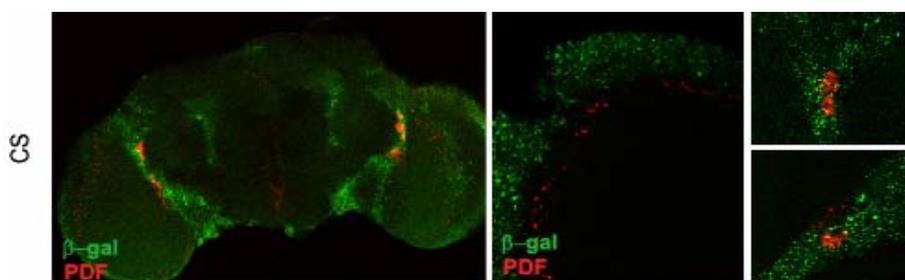


ANEXO 3.2. Oscilaciones moleculares en ciclos de luz y oscuridad en las neuronas que integran el oscilador E. Moscas recién eclosionadas (0-5 días) de las líneas CS y *slo*⁴ fueron sincronizadas en ciclos LO y las muestras fueron tomadas durante el quinto día del ciclo de entrenamiento. En la figura se muestran imágenes representativas de cerebros en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar el patrón de distribución de TIM (rojo) y PER (verde) en los puntos ZT5, ZT11, ZT17 y ZT23 respecto del marcador ELAV (azul), cuya localización es constitutivamente nuclear. *sp* indica superposición de las tres señales. El análisis de la localización se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos. El experimento fue repetido 2 veces con idénticos resultados.

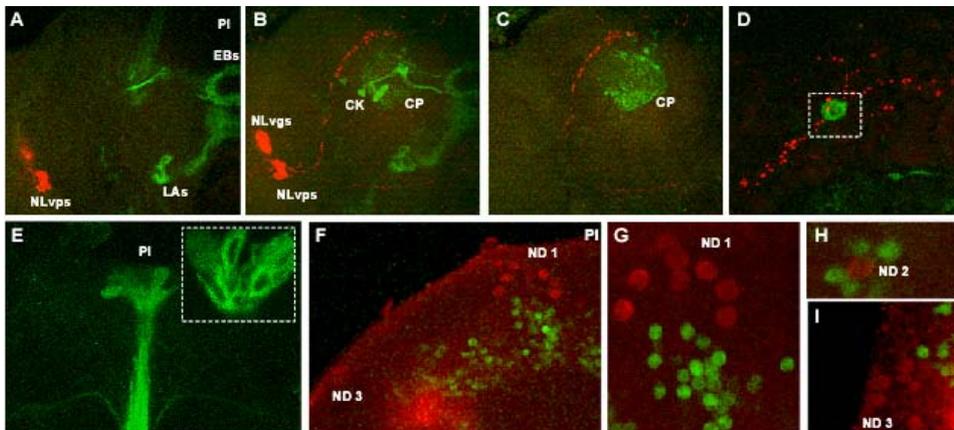
ANEXO 4.-



ANEXO 4.1. Expresión de mSLO en cerebros de *Drosophila*. Inmunohistoquímica en cerebros de individuos adultos incubados con un anticuerpo específico contra la proteína SLO-1 de mamíferos. Si bien se detectó señal del canal en diversos grupos de fotorreceptores, la señal obtenida no se corresponde con el patrón esperable para dSLO, cuya expresión en distintas regiones del cerebro detectada mediante hibridación *in situ* fue reportada previamente (Becker et al., 1995).

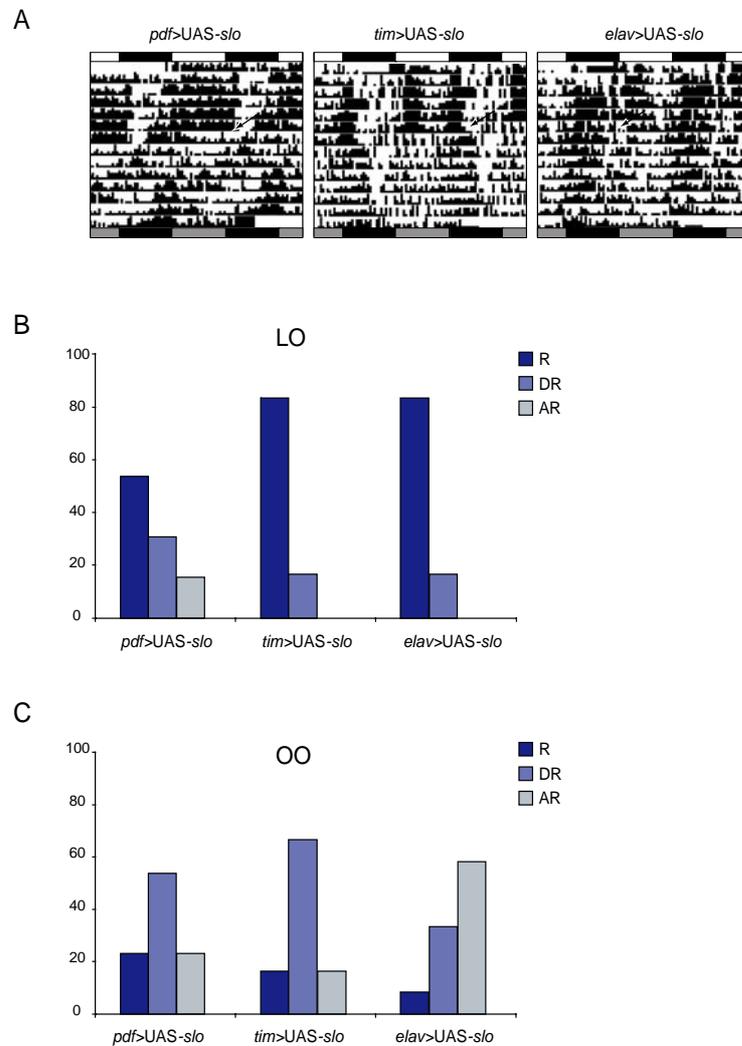


ANEXO 4.2. Expresión del gen reportero β galactosidasa bajo el control del promotor completo de *slowpoke*. Imágenes representativas de la señal obtenida mediante inmunohistoquímica en cerebros de moscas jóvenes (0-5 días) de la línea transgénica *slo-LacZ* con un anticuerpo dirigido contra la proteína β GAL. Si bien en este caso sí fue posible detectar expresión del canal en varias regiones del cerebro del adulto, consistente con los datos reportados por el laboratorio del Dr. Nigel Atkinson (Becker et al., 1995), a partir de la localización de la proteína β GAL no se pudo determinar si existía colocalización con distintos marcadores de neuronas del circuito circadiano. La secuencia del gen *LacZ* no posee señales de localización nuclear ni citoplasmática, y su distribución dentro de la célula es incierta (N. Atkinson, comunicación personal).



ANEXO 4.3. Expresión del gen reportero GFP bajo el control de la línea *slo-Gal4*. La señal de GFP en moscas adultas de la progenie del cruzamiento de las líneas *slo-Gal4* y UAS-mCD8-GFP (GFP fusionada a un marcador de membrana) o UAS-nls-GFP (GFP fusionada a una señal de localización nuclear) fue analizada mediante inmunohistoquímica. (A-E) Cerebros de moscas *slo-Gal4/UAS-mCD8GFP* fueron incubados con anticuerpos anti PDF (rojo) y anti GFP (verde). Las imágenes A-D representan una galería de imágenes de 1 μm de espesor, de anterior a posterior. Mediante esta técnica se detectó expresión de *slo* en los lóbulos antenales (LAs), los *ellipsoid bodies* (EBs), y las células de Kenyon (CK) de los cuerpos pedunculados (CP). En la figura D se muestra una imagen de mayor magnificación (*optical slice* 0,6 μm) donde se ve una de las células que expresan *slo* en el protocerebro dorsal, ubicada en las terminaciones axonales de las NLvps. Este putativo contacto con las NLvps se encontró en 24 de 38 hemisferios analizados, en 4 experimentos independientes. La figura E muestra la expresión de SLO en la *pars intercerebralis* (PI). (F-I) Cerebros de moscas *slo-Gal4/UAS-nls-GFP* fueron incubadas con anticuerpos anti TIM (rojo) y anti GFP (verde) en el punto CT2 del segundo día en condiciones constantes. Ninguno de los grupos de neuronas dorsales (ND1, ND2 y ND3) colocaliza con células que expresan SLO. Sin embargo, dado que la línea *slo-Gal4* no contiene la secuencia completa del promotor de *slowpoke*, no puede descartarse la posibilidad de que existan otras células que expresan el canal que no puedan ser detectadas mediante esta estrategia.

ANEXO 5.-



ANEXO 5.- La sobreexpresión de *slo* provoca desconsolidación de la actividad locomotora. Moscas provenientes de la progenie de cruzamientos entre la línea transgénica UAS-*slo* y distintas líneas Gal4 fueron analizadas en el paradigma comportamental estándar. (A) Actogramas representativos de las líneas *pdf>UAS-slo*, *tim>UAS-slo* y *elav>UAS-slo* donde se ve la desconsolidación de la actividad incluso durante el ciclo de LO. (B-C) Porcentajes de individuos rítmicos, débilmente rítmicos y arrítmicos de cada una de las líneas en el ciclo de LO y OO.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Líneas de *Drosophila* empleadas

1.1.- Mantenimiento de *stocks*

Todas las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis se mantuvieron en medio de crecimiento estándar preparado a base de harina de maíz, agar, levadura, sacarosa, Nipagin y ácido propiónico. Los cruzamientos y stocks se mantuvieron habitualmente en viales de vidrio de 2 cm de diámetro y 10 cm de alto (*Lumenglass*). Al momento de amplificar una línea se utilizaron botellas con el mismo medio de cultivo, por su mayor capacidad (250 cm³) (*Genesee Scientific*).

El laboratorio posee cinco incubadoras que mantienen condiciones controladas de luz y temperatura (25°C) para el mantenimiento de las líneas. Según los requerimientos experimentales, los viales o botellas fueron mantenidos en incubadoras o en el cuarto de moscas, a 18°C. Para seleccionar individuos según sexo, presencia o ausencia de cromosomas balanceadores, color de ojos u otros marcadores fenotípicos las moscas se analizan bajo la lupa sobre una plataforma porosa a través de la cual se filtra CO₂, que en *Drosophila* tiene efecto anestésico. Todos los experimentos comportamentales se analizaron al menos 24 horas después de que las moscas fueran sometidas al tratamiento con CO₂. Para los cruzamientos entre las líneas de interés se seleccionaron hembras vírgenes (menos de 8 horas transcurridas desde el momento de la eclosión, a 25°C) con el objetivo de controlar el genotipo de la progenie (las hembras de *Drosophila* tienen una espermateca en la que puede “almacenarse” el esperma de los machos con los que se han apareado anteriormente). Los cruzamientos normalmente consisten de un promedio de 10 hembras por cada 3 machos. En general se agregó una pequeña cantidad de levadura hidratada (5 gr) a cada vial para optimizar la ovipuesta.

1.2.- El sistema GAL4/UAS

Esta es probablemente la herramienta más ampliamente utilizada por los laboratorios que utilizan *Drosophila* como sistema modelo en el mundo. Este sistema heterólogo (proviene de levaduras) permite la expresión de un gen de interés en un determinado tejido. Se basa en la afinidad del factor de transcripción Gal4 por la secuencia UAS (*upstream activating sequence*) (Brand y Perrimon, 1993).

Una línea que expresa Gal4 bajo un promotor específico de tejido (P) es cruzada por otra que expresa un gen X bajo la secuencia UAS (por ejemplo, UAS-GFP); el resultado es que sólo en aquellos individuos de la progenie que posean ambas construcciones se expresará el gen X bajo el promotor P. La nomenclatura abreviada es P>X. En aquellos experimentos en los que es crucial asegurarse de que toda la progenie portará tanto la secuencia P-Gal4 como UAS-X o bien se parte de progenitores homocigotas para cada una de ellas o se utilizan en heterocigocis sobre cromosomas balanceadores. Los experimentos se realizan con la fracción de la F1 que no posee ningún balanceador (es decir, se “selecciona en contra” del balanceador).

1.3.- Líneas recombinantes

En *Drosophila* la recombinación meiótica ocurre únicamente en las gametas femeninas. La utilidad de generar líneas recombinantes consiste en que se puede tener en un mismo cromosoma dos construcciones de interés. Esto permite, por ejemplo, analizarlas en combinación con otras construcciones o con mutaciones presentes en otros cromosomas. La frecuencia de recombinación es proporcional a la distancia entre las entidades a recombinar. Para generar líneas recombinantes se parte de hembras vírgenes heterocigotas para los dos elementos a recombinar, para luego cruzarlas con machos balanceados para el cromosoma de interés. De la progenie se recuperan machos individuales balanceados en los que se les analiza la presencia de ambas construcciones a recombinar. Para los experimentos de esta tesis se generó la línea recombinante *pdf-Gal4-UAS-mCD8-GFP*. Ambas construcciones están en el segundo cromosoma. La generación de esta línea permitió analizar la morfología del circuito PDF mediante el anticuerpo anti GFP en los *backgrounds* de *slo⁴* o *per⁰¹*, por ejemplo, con un esquema de cruzamientos sencillo.

1.4.- Líneas de moscas utilizadas.

LÍNEAS Gal4:

- ❖ *pdf*-Gal4: laboratorio del Dr. Jeff Hall.
- ❖ *tim*-Gal4: laboratorio del Dr. Jeff Hall.
- ❖ *Elav*-Gal4: Bloomington Stock Center.
- ❖ *slo*-Gal4: laboratorio del Dr. Nigel Atkinson.

LÍNEAS UAS:

- ❖ UAS-mCD8-GFP II y III: Bloomington Stock Center.
- ❖ UAS-*slo*: generada en el laboratorio.
- ❖ UAS-*slo*.RNAi: Obtenida del Dr. Barry Dickson, colección de RNA de interferencia del IMB en Austria, Viena.

LÍNEAS DE GANANCIA DE FUNCIÓN:

- ❖ B52: laboratorio del Dr. Nigel Atkinson.
- ❖ M131: laboratorio del Dr. Nigel Atkinson.

LÍNEAS DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN:

- ❖ *slo*⁴: laboratorio del Dr. Nigel Atkinson.
- ❖ *slo*¹: laboratorio del Dr. Nigel Atkinson.
- ❖ *Ash2*¹⁸: laboratorio del Dr. Adam Shearn.
- ❖ *per*⁰¹: laboratorio del Dr. Jeff Hall.
- ❖ *tim*⁰¹: laboratorio del Dr. Jeff Hall.
- ❖ *pdf*⁰¹: laboratorio del Dr. Paul Taghert.
- ❖ *Clk*^{jrk}: laboratorio del Dr. Jeff Hall.

DEFICIENCIAS:

- ❖ Líneas 1972, 3345, 5601, 2366 y 2363: obtenidas de Bloomington Stock Center.

2.- Generación de líneas transgénicas

Para la generación de moscas transgénicas se utilizó la estrategia de transformación de la línea germinal mediada por Elementos P. Las construcciones conteniendo al cDNA de *slo* bajo la secuencia UAS fueron generadas por la Dra. M. Fernanda Ceriani. Las construcciones de ADN en el vector pCaSpeR se inyectaron junto a un plásmido *helper*, que contiene la secuencia necesaria para la expresión de la enzima transposasa, que media la inserción del elemento P a la célula embrionaria. Además, este plásmido contiene la secuencia del gen *mini white* (*w+*), que confiere pigmentación a los ojos. El color obtenido irá desde el amarillo pálido al rojo intenso según las regiones regulatorias de la región genómica donde el plásmido se inserte.

Se utilizaron embriones de la línea *y w*, que fueron inyectados en un lapso de 27 minutos a partir del momento de la ovipuesta. Sin remover el corion, fueron inmovilizados sobre una cinta de doble faz pegada a un portaobjetos. Para inyectarlos se utilizaron capilares Narishige de 1mm x 90mm, a los que se dio forma en un estirador vertical Narishige PC-10. Los capilares se obtienen en dos etapas, una a 63°C y otra 68.9°C, y se llenan con 5µl de solución de inyección con un tip *Eppendorf* de 10 µl (para el cargado de geles de secuenciación). Esta solución contiene 0,4µg/µl del ADN pCaSpeR-UAS y 0,25µg/µl de plásmido T-*helper* en un volumen total de 10µl de búfer [5mM KCl, 0,5mM NaH₂PO₄ pH 7.8]. Previamente se centrifuga durante 10 minutos a 10000 g y se transfiere a un nuevo tubo. Los embriones fueron inyectados bajo un microscopio Olympus BH, sumergidos en aceite halocarbonado 700 (*Sigma* H8898) para evitar la deshidratación, utilizando el microinyector Tranjector 5246 (*Eppendorf*). Luego se dejaron desarrollar a 18°C durante 48 horas. Las larvas, que emergen durante las primeras 24 horas, fueron transferidas a un vial con alimento (ver sección 1.1). Los adultos obtenidos fueron cruzados en forma individual con moscas DB. De la progenie obtenida se seleccionaron moscas con ojos de color, lo que indica que el plásmido conteniendo la secuencia y el gen *mini white* (*w+*) se ha integrado al genoma.

Para determinar en qué cromosoma quedó insertada la construcción se realiza un mapeo por análisis de segregación del marcador dominante mini-white (w^+) codificado en el elemento P. Para ello se cruzaron los individuos con ojos de color obtenidos en la F1 con moscas DB. Si el elemento P está inserto en el cromosoma X, el marcador w^+ es heredado solamente por las hembras pero no por los machos de la F1. En cambio, si el gen de interés está inserto en el segundo o en el tercer cromosoma se obtendrán en la F1 machos que llevan al transgén y los marcadores del DB simultáneamente (o bien ES o bien CyO y TM3 simultáneamente, ya que se segregarán juntos). Para definir en qué cromosoma autosómico se encuentra la inserción se realiza un segundo cruzamiento, donde esos machos candidatos son cruzados nuevamente por hembras DB. En la progenie de este segundo cruzamiento se analiza si el marcador w^+ del transgén se cosegrega con el marcador dominante del segundo o del tercer cromosoma. El elemento P segregará de manera excluyente con respecto al marcador del cromosoma en el que se encuentra inserto, mientras que coexistirá con el marcador del cromosoma en el que no se ha insertado (en el infrecuente caso en que el transgén se inserte en el cromosoma IV, se segregará de modo independiente tanto del marcador del segundo cromosoma como del tercero).

3.- Análisis de actividad locomotora

3.1.- Análisis automatizado de actividad locomotora

El monitoreo de la actividad locomotora se lleva a cabo poniendo machos individualmente en tubos de vidrio de 50 mm de diámetro, que a la vez se colocan en monitores de adquisición de datos (*Trikinetics*). Cada uno de los monitores tiene capacidad para 32 canales, en cada uno de los cuales se coloca uno de los tubos de vidrio. Hay dos hileras de canales, cada una de las cuales es flanqueada por un haz de luz infrarrojo, que no afecta el comportamiento de las moscas en oscuridad ya que éstas no detectan luz de longitudes de onda entre 850 y 950 nm. Cada vez que una mosca interrumpe el haz de luz se registra como un dato. La actividad se adquiere como la sumatoria de los registros obtenidos en intervalos de 30 minutos.

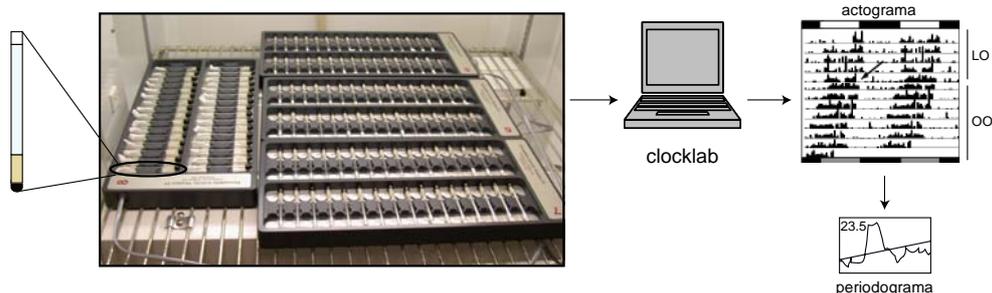
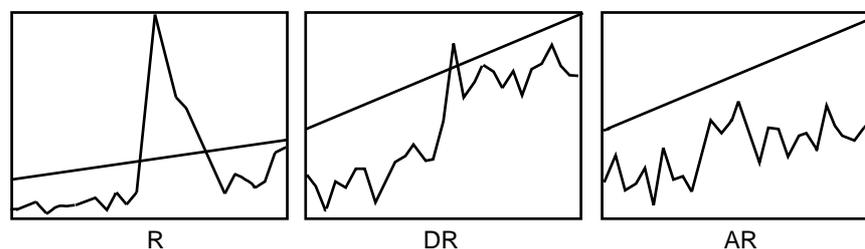


Figura 7.1.- Análisis automatizado de la actividad locomotora. Esquema del proceso de obtención de actogramas individuales para un experimento de actividad locomotora. En la figura se muestran cuatro monitores de actividad, en cada uno de los cuales se ubican 32 tubos, con un macho de *Drosophila* en cada uno de ellos.

La información es obtenida mediante una computadora conectada mediante cables telefónicos directamente a las incubadoras donde se ubican los monitores. Los datos obtenidos se analizan mediante un *software* comercial (*Clocklab*, *Actimetrics*, *IL*). Por cada canal se obtiene el registro de la actividad de una mosca durante la totalidad de los días que dura el experimento. A partir de estos datos se construye el actograma para ese individuo. Además, el *software* brinda información sobre distintos parámetros, como la cantidad total de actividad, el inicio y finalización (*onset* y *offset*) de la actividad, etc. Para obtener el período asociado a cada individuo se analizan los días en condiciones constantes (salvo casos excepcionales donde se desee obtener información sobre la ritmicidad en LO) mediante Chi cuadrado, con una significancia de 0,05. De acuerdo al periodograma obtenido, cada individuo se clasifica como rítmico, débilmente rítmico o arrítmico:

- ❖ **RÍTMICO:** Cuando los datos se ajustan a una función con un único período. El pico correspondiente al período asignado es el único que pasa la línea de significancia.
- ❖ **DÉBILMENTE RÍTMICO:** El período encontrado apenas pasa la línea de significancia, o bien varios picos la atraviesan.
- ❖ **ARRÍTMICO:** Cuando el programa no identifica periodicidad alguna, o lo hace en rangos fuera de lo esperado (<12 hs, >40 hs).

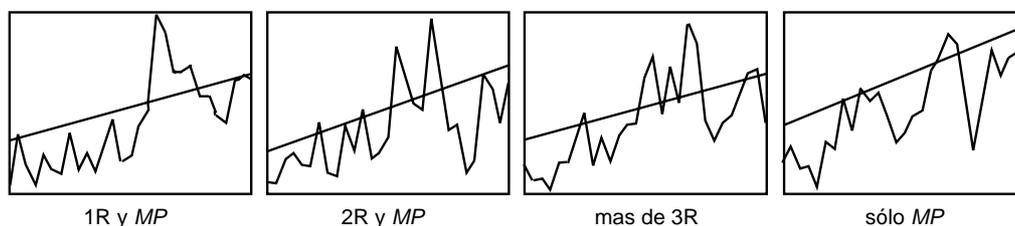


3.1.1.- Análisis alternativo del fenotipo comportamental.

La figura 6.1 se realizó sobre la base de un análisis alternativo de los periodogramas, adaptado de lo reportado por Nitabach y colaboradores (Nitabach et al., 2006). En este caso, en lugar de clasificar cada actograma según las tres categorías descritas previamente, se incorporaron nuevas categorías de modo de poder comparar con un grado mayor de detalle los fenotipos comportamentales de las líneas CS y *slot*. Además de las categorías de “rítmico” y “arrítmico” descritas anteriormente, se incorpora un desglosamiento de la categoría “débilmente rítmico”: todos aquellos periodogramas que presentan múltiples períodos (MP) se agrupan ahora en 4 categorías diferentes, según la cantidad de picos que pasan la línea de significatividad en cada caso.

- ❖ **1R y MP:** Sólo uno de los períodos pasa la línea de significancia, existen múltiples picos pequeños que la tocan. Corresponden a periodogramas que habitualmente se clasificarían como *débilmente rítmicos*, a menos que la diferencia entre el pico mayor y los otros sea extremadamente grande, en cuyo caso se clasificarían excepcionalmente como *rítmicos*.
- ❖ **2R y MP:** igual al caso anterior, pero con dos picos importantes que atraviesan la línea de significancia. Corresponden a periodogramas que habitualmente se clasificarían como *débilmente rítmicos*.

- ❖ **MÁS DE 3R:** tres o más picos importantes atraviesan la línea de significancia. Corresponden a periodogramas que habitualmente se clasificarían como *débilmente rítmicos*.
- ❖ **SÓLO MP:** ningún pico importante atraviesa la línea de significancia. Corresponden a periodogramas que habitualmente se clasificarían como *débilmente rítmicos*, excepto que varios picos similares apenas toquen la línea de significancia y la inspección visual del actograma no revele un patrón de ritmicidad residual, en cuyo caso se clasificarían como *arrítmicos*.



3.2.-Eclosión

Botellas conteniendo las líneas parentales que dan origen a las moscas utilizadas en los experimentos de eclosión fueron sincronizadas en ciclos de LO a 25°C. Larvas de tercer estadio y pupas se colocaron en los discos de los monitores de eclosión (*Trikinetics*, Waltham, MA) sobre cinta adhesiva de doble faz durante el último día de LO. A partir de ese momento el registro del patrón de eclosión de la población fue monitoreado en condiciones constantes, mediante un sistema de haz infrarrojo similar al utilizado en los monitores de actividad locomotora. Los experimentos fueron repetidos entre 3 y 5 veces. Los datos obtenidos se analizan mediante el software *Clocklab* que asigna un periodograma a cada uno de los registros en forma análoga al análisis de los actogramas.

3.3.-Análisis Estadísticos

En todos los casos el análisis estadístico se realizó mediante el programa *Graphpad 4.0 Prism* (San Diego, CA). Para los experimentos de actividad locomotora, tanto la significancia estadística de los períodos como de los porcentajes de ritmicidad de los distintos genotipos fueron determinados mediante análisis de la varianza (ANOVA) con test de comparaciones múltiples de Bonferroni (excepto en los casos en los que sólo se compararon dos genotipos, como en la figura 5.5, donde se utilizó un t-test). En el caso de los períodos, se agruparon todos los períodos asignados a cada individuo rítmico de un genotipo determinado en todos los experimentos analizados. El *n* en esos casos corresponde al número de moscas rítmicas. Para los porcentajes de ritmicidad, cada dato es el porcentaje asignado a una población en un experimento, por lo que el *n* representa la cantidad de experimentos.

4.- Inmunohistoquímica y análisis de imágenes

4.1.- Inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas

En primer lugar las moscas son decapitadas en buffer de disección utilizando pinzas de disección u hojas de afeitar. Las cabezas se colocan en solución de fijación (paraformaldehído 4%, PB 0,1M) durante aproximadamente 40 min. a temperatura ambiente. El tiempo de disección varía según el color de ojos de las moscas utilizadas y las particularidades de cada anticuerpo³⁵. Después de la fijación, las cabezas se enjuagan en PT (PBS 0,1% Tritón X-100) y se disectan en PT o buffer de disección mediante pinzas n^o5 (*Dumont*) bajo una lupa *Leica* CLS 100X. La disección se realiza en placas de sylgard, bajo una fuente de luz fría. Luego se lavan los restos de fijador entre 3 y 7 veces, en PT, a temperatura ambiente y se bloquea durante una hora.

Los cerebros se incuban con el anticuerpo primario a 4°C, generalmente ON. El tiempo de incubación con el anticuerpo primario varía según cada caso, llegando hasta 48 h. en caso del anticuerpo anti PDF hecho en rata (obtenido del laboratorio del Dr. Jeff Hall). Posteriormente se remueve el anticuerpo primario y se hacen 5 lavados con

³⁵- Las moscas de ojos blancos pueden fijarse por un período de hasta 3 horas en hielo, mientras que las moscas de ojos rojos por un máximo de 1,5 horas en hielo o 40 minutos a temperatura ambiente, debido a que la pigmentación de las omatidias “tiñe” los cerebros e interfiere con la detección de la señal.

PT en agitación, de aproximadamente 20 minutos cada uno. A continuación se agrega el anticuerpo secundario en oscuridad diluido en PT (habitualmente 1:250) y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. En los casos en los que el anticuerpo primario genera una gran cantidad de señal inespecífica, se incuba tanto el anticuerpo primario como en secundario con 15% de suero normal de cabra. Luego de remover el anticuerpo secundario los cerebros se lavan exhaustivamente en tubos cubiertos por papel de aluminio, entre 3 h. (a temperatura ambiente) y ON (a 4°C) en PT, cambiando la solución de lavado tan frecuentemente como sea posible. Finalmente, los cerebros se montan³⁶ en portaobjetos de 3'' x 1'' x 1 mm (Fisher) en aproximadamente 20 µl de una solución conteniendo 80% de glicerol en PT y se cubren con cubreobjetos de 18 mm de lado (Marienfeld GmbH). Los cerebros se colocan en el centro de un cuadrado realizado con esmalte de uñas transparente y luego de cubrirse se sellan con el mismo esmalte.

4.1.1.- Anticuerpos

4.1.1.1. –Anticuerpos primarios

ANTICUERPOS	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN	ORIGEN
anti PER	1:700	ON	Michael Rosbash
anti TIM	1:700	ON	Michael Young
anti PDF _{rata}	1:500	48 hs	Jeff Hall
anti PDF _{conejo}	1:1000	ON	<i>NeOmps</i>
anti PAP	1:1000	ON	Paul Taghert
anti ELAV	1:20	ON	Hibridoma bank
anti mSLO _{conejo}	1:50	2 hs	Oswaldo Uchitel
anti pSLO	1:500	ON	D. Wiecher
anti bgal	1:500	2hs	<i>molecular probes</i>
anti GFP _{pollo}	1:500	ON	<i>Upstate</i>
anti GFP _{conejo}	1:500	ON	<i>Invitrogen</i>
anti PDFR _{conejo}	1:500	ON	Paul Taghert

³⁶ -Este paso debe realizarse con la menor cantidad de luz ambiental posible ya que los anticuerpos conjugados a compuestos fluorescentes son fotosensibles.

4.1.1.2. –Anticuerpos secundarios.

Todos los anticuerpos secundarios utilizados provienen de *Jackson ImmunoResearch*. Se utilizaron en una dilución de 1:250 en PT y se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente.

- ❖ Contra conejo: Cy2, Cy3, Cy5, Alexa 488, Alexa 594.
- ❖ Contra ratón: Cy3, Cy2 específico de IgG1, Alexa 594.
- ❖ Contra pollo: Cy2.
- ❖ Contra rata: Alexa 594, Cy2.
- ❖ Contra cobayo: Cy3.

4.1.2.- Soluciones

- ❖ PB (buffer fosfato) 10 x: 70mM Na₂HPO₄, 30mM Na₂HPO₄, pH 7.4
- ❖ PBS 10x: PB 1x, 0.15 M NaCl, pH 7.4
- ❖ Solución de bloqueo: 7% suero normal de cabra en PT
- ❖ Stock de Paraformaldehído 8%: diluído en H₂O bidestilada, a 50°C, con 5gr de NaOH
- ❖ Mantenido a -20°C
- ❖ PT: PBS 1x, 0,1% Tritón X-100

4.2.- Curvas de tiempo

En el caso de las curvas de tiempo en oscuridad las cabezas son seccionadas en oscuridad, en el cuarto de moscas, mediante una luz roja para evitar la degradación de las proteínas del reloj. Esta operación se realiza con hojas de afeitar o pinzas de disección n°5 (*Dumont*). Las cabezas se colocan inmediatamente en solución de fijación, y los tubos conteniendo las cabezas se cubren con papel de aluminio durante todo el tiempo que dura el proceso de fijación.

4.2.1.- Análisis de la relación núcleo/citoplasma.

Para cuantificar la localización subcelular de PER y TIM en las curvas de tiempo en las neuronas ventrales (CAPÍTULO 2 parte I) se utilizó el software *Image J*. Para cada una de las neuronas de cada cerebro se graficó manualmente el perímetro alrededor del núcleo y una circunferencia que abarque el citoplasma (idéntica en cada célula, siempre en una región inmediatamente adyacente al núcleo) y se obtuvo la intensidad promedio para cada una de esas regiones en pixels/área. Luego se promediaron todas las células de un mismo cerebro. El valor obtenido para cada genotipo es la media para todos los cerebros analizados en cada uno de los puntos.

4.2.2.- Análisis de localización subcelular en los grupos dorsales

En este caso, como no existe un marcador específico como es PDF para las NLVs, se utilizó un anticuerpo contra el factor de transcripción *elav*, que marca todos los núcleos de neuronas del SNC de *Drosophila*. Para cada cerebro, se determinó el porcentaje de neuronas de cada grupo (NLds y ND1s) que presentan una localización nuclear, ubicua o citoplasmática en cada uno de los puntos analizados.

- ❖ **CITOPLASMÁTICA:** la señal de TIM y la señal de ELAV tienen un patrón mutuamente excluyente.
- ❖ **NUCLEAR:** la señal de TIM y la señal de ELAV colocalizan por completo.
- ❖ **UBICUA:** existe señal de TIM que excede a la señal de ELAV.

4.3.- Cuantificación de las ramificaciones axonales de las NLVps

Para determinar el grado de arborización de las terminales axonales de las NLVps se adaptó el método de Sholl, originalmente desarrollado para cuantificar arborizaciones de árboles dendríticos en neuronas de vertebrados (SHOLL, 1953). Se utilizaron cerebros de moscas conteniendo la construcción *pdf-Gal4-UAS-mCD8.GFP*, ya sea en *background* silvestre (*y w*) o en los mutantes *per*⁰¹ y *tim*⁰¹, incubados con anticuerpos

anti PDF y anti GFP. Sólo la señal de GFP fue tomada en cuenta para el análisis del grado de arborización.

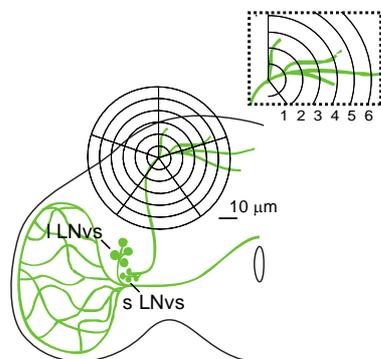


Figura 7.2.- Adaptación del método de Sholl para cuantificar arborizaciones de las NLvs. Diagrama esquemático donde se ilustra el método utilizado para cuantificar la complejidad de las arborizaciones axonales de las NLvs en imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. Se cuenta el número total de intersecciones entre círculos concéntricos y proyecciones axonales.

Sobre proyecciones de imágenes de las terminales dorsales de las NLvs (en un hemisferio de cada cerebro) se ubicaron seis círculos concéntricos, separados entre sí por $10\ \mu\text{m}$. A continuación se contabilizó (a ciegas) el número de intersecciones entre las ramificaciones para cada círculo. El número total de intersecciones obtenido para cada genotipo se indica en las figuras del capítulo 4, y las comparaciones se realizaron mediante análisis estadísticos para muestras no paramétricas (los valores de las figuras corresponden a los obtenidos mediante el test de Mann Whitney, pero la significancia estadística se confirmó con el test de Wilcoxon).

4.4.- Microscopía y procesamiento de imágenes

Todas las imágenes de esta tesis fueron obtenidas en un microscopio confocal *Zeiss* LSM5 (*Carl Zeiss*, Thornwood, NJ). Para las imágenes adquiridas a 10x o 20x los oculares inciden directamente sobre la muestra, mientras que para las imágenes a 40x y 63x se colocan aproximadamente 50ul de agua bidestilada y para 100X aceite mineral de inmersión. Para los cubreobjetos utilizados en estas muestras el ocular se ajusta a $0,16\text{mm}$. Las únicas imágenes obtenidas con el objetivo de 10x son las de cerebros enteros porque no entran completos en el mínimo aumento que permite el 20x. El *pinhole* utilizado es siempre de 1 unidad *airy*, salvo que se indique lo contrario en la figura. Las imágenes individuales o galerías, se exportan como JPEG desde el

software Pascal. Para abrir las imágenes en el *Image J* se guardaron desde el *Photoshop* (7.0) como JPG, JPEG o TIFF. Para el armado de las figuras, todas las imágenes fueron ensambladas en *Adobe Illustrator*.

BIBLIOGRAFÍA

Reference List

1. Adams,M.D., Celniker,S.E., Holt,R.A., Evans,C.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P.G., Scherer,S.E., Li,P.W., Hoskins,R.A., Galle,R.F., George,R.A., Lewis,S.E., Richards,S., Ashburner,M., Henderson,S.N., Sutton,G.G., Wortman,J.R., Yandell,M.D., Zhang,Q., Chen,L.X., Brandon,R.C., Rogers,Y.H., Blazej,R.G., Champe,M., Pfeiffer,B.D., Wan,K.H., Doyle,C., Baxter,E.G., Helt,G., Nelson,C.R., Gabor,G.L., Abril,J.F., Agbayani,A., An,H.J., Andrews-Pfannkoch,C., Baldwin,D., Ballew,R.M., Basu,A., Baxendale,J., Bayraktaroglu,L., Beasley,E.M., Beeson,K.Y., Benos,P.V., Berman,B.P., Bhandari,D., Bolshakov,S., Borkova,D., Botchan,M.R., Bouck,J., Brokstein,P., Brottier,P., Burtis,K.C., Busam,D.A., Butler,H., Cadieu,E., Center,A., Chandra,I., Cherry,J.M., Cawley,S., Dahlke,C., Davenport,L.B., Davies,P., de Pablos,B., Delcher,A., Deng,Z., Mays,A.D., Dew,I., Dietz,S.M., Dodson,K., Doup,L.E., Downes,M., Dugan-Rocha,S., Dunkov,B.C., Dunn,P., Durbin,K.J., Evangelista,C.C., Ferraz,C., Ferriera,S., Fleischmann,W., Fosler,C., Gabrielian,A.E., Garg,N.S., Gelbart,W.M., Glasser,K., Glodek,A., Gong,F., Gorrell,J.H., Gu,Z., Guan,P., Harris,M., Harris,N.L., Harvey,D., Heiman,T.J., Hernandez,J.R., Houck,J., Hostin,D., Houston,K.A., Howland,T.J., Wei,M.H., Ibegwam,C., Jalali,M., Kalush,F., Karpen,G.H., Ke,Z., Kennison,J.A., Ketchum,K.A., Kimmel,B.E., Kodira,C.D., Kraft,C., Kravitz,S., Kulp,D., Lai,Z., Lasko,P., Lei,Y., Levitsky,A.A., Li,J., Li,Z., Liang,Y., Lin,X., Liu,X., Mattei,B., McIntosh,T.C., McLeod,M.P., McPherson,D., Merkulov,G., Milshina,N.V., Mobarry,C., Morris,J., Moshrefi,A., Mount,S.M., Moy,M., Murphy,B., Murphy,L., Muzny,D.M., Nelson,D.L., Nelson,D.R., Nelson,K.A., Nixon,K., Nusskern,D.R., Pacleb,J.M., Palazzolo,M., Pittman,G.S., Pan,S., Pollard,J., Puri,V., Reese,M.G., Reinert,K., Remington,K., Saunders,R.D., Scheeler,F., Shen,H., Shue,B.C., Siden-Kiamos,I., Simpson,M., Skupski,M.P., Smith,T., Spier,E., Spradling,A.C., Stapleton,M., Strong,R., Sun,E., Svirskas,R., Tector,C., Turner,R., Venter,E., Wang,A.H., Wang,X., Wang,Z.Y., Wassarman,D.A., Weinstock,G.M., Weissenbach,J., Williams,S.M., Woodage,T., Worley,K.C., Wu,D., Yang,S., Yao,Q.A., Ye,J., Yeh,R.F., Zaveri,J.S., Zhan,M., Zhang,G., Zhao,Q., Zheng,L., Zheng,X.H., Zhong,F.N., Zhong,W., Zhou,X., Zhu,S., Zhu,X., Smith,H.O., Gibbs,R.A., Myers,E.W., Rubin,G.M., and Venter,J.C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
2. Adamson,A.L. and Shearn,A. (1996). Molecular genetic analysis of *Drosophila ash2*, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation. *Genetics* **144**, 621-633.

3. Adelman, J.P., Shen, K.Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y.N., Lagrutta, A., Bond, C.T., and North, R.A. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* **9**, 209-216.
4. Akasu, T., Shoji, S., and Hasuo, H. (1993). Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Pflugers Arch.* **425**, 109-116.
5. Allada, R., Emery, P., Takahashi, J.S., and Rosbash, M. (2001). Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu.Rev.Neurosci.* **24**, 1091-1119.
6. Allada, R., Kadener, S., Nandakumar, N., and Rosbash, M. (2003). A recessive mutant of *Drosophila* Clock reveals a role in circadian rhythm amplitude. *EMBO J.* **22**, 3367-3375.
7. Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**, 791-804.
8. Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **25**, 11-28.
9. Aschoff, J. (1976). Circadian systems in man and their implications. *Hosp.Pract.* **11**, 51-97.
10. Atkinson, N.S., Brenner, R., Bohm, R.A., Yu, J.Y., and Wilbur, J.L. (1998). Behavioral and electrophysiological analysis of Ca-activated K-channel transgenes in *Drosophila*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **860**, 296-305.
11. Atkinson, N.S., Brenner, R., Chang, W., Wilbur, J., Larimer, J.L., and Yu, J. (2000). Molecular separation of two behavioral phenotypes by a mutation affecting the promoters of a Ca-activated K channel. *J.Neurosci.* **20**, 2988-2993.
12. Atkinson, N.S., Robertson, G.A., and Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* **253**, 551-555.
13. Balsalobre, A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* **309**, 193-199.
14. Bao, L., Kaldany, C., Holmstrand, E.C., and Cox, D.H. (2004). Mapping the BKCa channel's "Ca²⁺ bowl": side-chains essential for Ca²⁺ sensing. *J.Gen.Physiol* **123**, 475-489.
15. Bargiello, T.A., Jackson, F.R., and Young, M.W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* **312**, 752-754.
16. Beaver, L.M., Gvakharia, B.O., Vollintine, T.S., Hege, D.M., Stanewsky, R., and Giebultowicz, J.M. (2002). Loss of circadian clock function decreases

reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *99*, 2134-2139.

17. Becker,M.N., Brenner,R., and Atkinson,N.S. (1995). Tissue-specific expression of a *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J.Neurosci.* *15*, 6250-6259.
 18. Behrens,U.D., Kasten,P., and Wagner,H.J. (1998). Adaptation-dependent plasticity of rod bipolar cell axon terminal morphology in the rat retina. *Cell Tissue Res.* *294*, 243-251.
 19. Bell-Pedersen,D., Cassone,V.M., Earnest,D.J., Golden,S.S., Hardin,P.E., Thomas,T.L., and Zoran,M.J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat.Rev.Genet.* *6*, 544-556.
 20. Bezanilla,F. and Perozo,E. (2002). Structural biology. Force and voltage sensors in one structure. *Science* *298*, 1562-1563.
 21. Bhattacharjee,A., Joiner,W.J., Wu,M., Yang,Y., Sigworth,F.J., and Kaczmarek,L.K. (2003). Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J.Neurosci.* *23*, 11681-11691.
 22. Blanchard E,G.B.K.A.C.E.H.P.T.R.F. Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian rhythms in motor activity and eclosion by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *Eur J Neurosci.* *13*[5], 871--88. 2001.
- Ref Type: Journal (Full)
23. Blau,J. and Rothenfluh,A. (1999). Siesta-time is in the genes. *Neuron* *24*, 4-5.
 24. Blau,J. and Young,M.W. (1999). Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* *99*, 661-671.
 25. Block,G.D. (1981). In vivo recording of the ocular circadian rhythm in *Aplysia*. *Brain Res.* *222*, 138-143.
 26. Block,G.D. and Wallace,S.F. (1982). Localization of a Circadian Pacemaker in the Eye of a Mollusc, *Bulla*. *Science* *217*, 155-157.
 27. Bohm,R.A., Wang,B., Brenner,R., and Atkinson,N.S. (2000). Transcriptional control of Ca(2+)-activated K(+) channel expression: identification of a second, evolutionarily conserved, neuronal promoter. *J.Exp.Biol.* *203 Pt 4*, 693-704.
 28. Boothroyd,C.E., Wijnen,H., Naef,F., Saez,L., and Young,M.W. (2007). Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. *PLoS.Genet.* *3*, e54.
 29. Bos,N.P. and Mirmiran,M. (1990). Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* *511*, 158-162.

30. Brand,A.H. and Perrimon,N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
 31. Brenner,R. and Atkinson,N. (1996). Developmental- and eye-specific transcriptional control elements in an intronic region of a Ca(2+)-activated K+ channel gene. *Dev.Biol.* **177**, 536-543.
 32. Brenner,R. and Atkinson,N.S. (1997). Calcium-activated potassium channel gene expression in the midgut of *Drosophila*. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **118**, 411-420.
 33. Brenner,R., Thomas,T.O., Becker,M.N., and Atkinson,N.S. (1996). Tissue-specific expression of a Ca(2+)-activated K+ channel is controlled by multiple upstream regulatory elements. *J.Neurosci.* **16**, 1827-1835.
 34. Brenner,R., Yu,J.Y., Srinivasan,K., Brewer,L., Larimer,J.L., Wilbur,J.L., and Atkinson,N.S. (2000). Complementation of physiological and behavioral defects by a slowpoke Ca(2+) -activated K(+) channel transgene. *J.Neurochem.* **75**, 1310-1319.
 35. Brown,F.A. Response to pervasive geophysical factors and the biological clock problem. **25**, 57-72. 1960. Cold Spring Harb. Symp.Quant.Biol.
- Ref Type: Generic
36. Brunner,M. and Schafmeier,T. (2006). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and *Neurospora*. *Genes Dev.* **20**, 1061-1074.
 37. Butler,A., Tsunoda,S., McCobb,D.P., Wei,A., and Salkoff,L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224.
 38. Ceriani,M.F., Darlington,T.K., Staknis,D., Mas,P., Petti,A.A., Weitz,C.J., and Kay,S.A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* **285**, 553-556.
 39. Ceriani,M.F., Hogenesch,J.B., Yanovsky,M., Panda,S., Straume,M., and Kay,S.A. (2002). Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J.Neurosci.* **22**, 9305-9319.
 40. Chang,W.M., Bohm,R.A., Strauss,J.C., Kwan,T., Thomas,T., Cowmeadow,R.B., and Atkinson,N.S. (2000). Muscle-specific transcriptional regulation of the slowpoke Ca(2+)- activated K(+) channel gene. *J.Biol.Chem.* **275**, 3991-3998.
 41. Claridge-Chang,A., Wijnen,H., Naef,F., Boothroyd,C., Rajewsky,N., and Young,M.W. (2001). Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* **32**, 657-671.

42. Cloues,R.K. and Sather,W.A. (2003). Afterhyperpolarization regulates firing rate in neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J.Neurosci.* *23*, 1593-1604.
43. Colwell,C.S. (2006). BK channels and circadian output. *Nat.Neurosci.* *9*, 985-986.
44. Cui,J. and Aldrich,R.W. (2000). Allosteric linkage between voltage and Ca(2+)-dependent activation of BK-type mslo1 K(+) channels. *Biochemistry* *39*, 15612-15619.
45. Cyran,S.A., Buchsbaum,A.M., Reddy,K.L., Lin,M.C., Glossop,N.R., Hardin,P.E., Young,M.W., Storti,R.V., and Blau,J. (2003). *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* *112*, 329-341.
46. Darlington,T.K., Wager-Smith,K., Ceriani,M.F., Staknis,D., Gekakis,N., Steeves,T.D., Weitz,C.J., Takahashi,J.S., and Kay,S.A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* *280*, 1599-1603.
47. De Jeu,M., Hermes,M., and Pennartz,C. (1998). Circadian modulation of membrane properties in slices of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* *9*, 3725-3729.
48. de Jeu,M.T. and Pennartz,C.M. (1997). Functional characterization of the H-current in SCN neurons in subjective day and night: a whole-cell patch-clamp study in acutely prepared brain slices. *Brain Res.* *767*, 72-80.
49. Derst,C., Messutat,S., Walther,C., Eckert,M., Heinemann,S.H., and Wicher,D. (2003). The large conductance Ca²⁺-activated potassium channel (pSlo) of the cockroach *Periplaneta americana*: structure, localization in neurons and electrophysiology. *Eur.J.Neurosci.* *17*, 1197-1212.
50. Diaz,L., Meera,P., Amigo,J., Stefani,E., Alvarez,O., Toro,L., and Latorre,R. (1998). Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J.Biol.Chem.* *273*, 32430-32436.
51. Dockendorff,T.C., Su,H.S., McBride,S.M., Yang,Z., Choi,C.H., Siwicki,K.K., Sehgal,A., and Jongens,T.A. (2002). *Drosophila* lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron* *34*, 973-984.
52. Dunlap,J.C., Loros,J.J., Liu,Y., and Crosthwaite,S.K. (1999). Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes Cells* *4*, 1-10.
53. Dushay,M.S., Rosbash,M., and Hall,J.C. (1989). The disconnected visual system mutations in *Drosophila melanogaster* drastically disrupt circadian rhythms. *J.Biol.Rhythms* *4*, 1-27.

54. Edery, I., Zwiebel, L.J., Dembinska, M.E., and Rosbash, M. (1994). Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *91*, 2260-2264.
55. Elkins, T., Ganetzky, B., and Wu, C.F. (1986). A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *83*, 8415-8419.
56. Emery, P., Stanewsky, R., Hall, J.C., and Rosbash, M. (2000a). A unique circadian-rhythm photoreceptor. *Nature* *404*, 456-457.
57. Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Forster, C., Emery-Le, M., Hall, J.C., and Rosbash, M. (2000b). *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* *26*, 493-504.
58. Erxleben, C., Everhart, A.L., Romeo, C., Florance, H., Bauer, M.B., Alcorta, D.A., Rossie, S., Shipston, M.J., and Armstrong, D.L. (2002). Interacting effects of N-terminal variation and *stx* exon splicing on *slo* potassium channel regulation by calcium, phosphorylation, and oxidation. *J.Biol.Chem.* *277*, 27045-27052.
59. Esguerra, M., Wang, J., Foster, C.D., Adelman, J.P., North, R.A., and Levitan, I.B. (1994). Cloned Ca(2+)-dependent K⁺ channel modulated by a functionally associated protein kinase. *Nature* *369*, 563-565.
60. Eskin, A. (1979). Identification and physiology of circadian pacemakers. Introduction. *Fed.Proc.* *38*, 2570-2572.
61. Ewer, J., Frisch, B., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1992). Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J.Neurosci.* *12*, 3321-3349.
62. Frisch, B., Hardin, P.E., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1994). A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* *12*, 555-570.
63. Ghezzi, A., Al Hasan, Y.M., Larios, L.E., Bohm, R.A., and Atkinson, N.S. (2004). *slo* K(+) channel gene regulation mediates rapid drug tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *101*, 17276-17281.
64. Giebultowicz, J.M. (2001). Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* *356*, 1791-1799.
65. Giebultowicz, J.M., Stanewsky, R., Hall, J.C., and Hege, D.M. (2000). Transplanted *Drosophila* excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host. *Curr.Biol.* *10*, 107-110.

66. Gillette, M.U. and Reppert, S.M. (1987). The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res. Bull.* **19**, 135-139.
67. Glossop, N.R., Houl, J.H., Zheng, H., Ng, F.S., Dudek, S.M., and Hardin, P.E. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* **37**, 249-261.
68. Glossop, N.R., Lyons, L.C., and Hardin, P.E. (1999). Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* **286**, 766-768.
69. Golden, S.S., Ishiura, M., Johnson, C.H., and Kondo, T. (1997). CYANOBACTERIAL CIRCADIAN RHYTHMS. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **48**, 327-354.
70. Goldin, M., Segal, M., and Avignone, E. (2001). Functional plasticity triggers formation and pruning of dendritic spines in cultured hippocampal networks. *J. Neurosci.* **21**, 186-193.
71. Gorska-Andrzejak, J., Keller, A., Raabe, T., Kilianek, L., and Pyza, E. (2005). Structural daily rhythms in GFP-labelled neurons in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 721-726.
72. Green, D.J. and Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* **245**, 198-200.
73. Griffith, L.C. and Budnik, V. (2006). Plasticity and second messengers during synapse development. *Int. Rev. Neurobiol.* **75**, 237-265.
74. Grima, B., Chelot, E., Xia, R., and Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* **431**, 869-873.
75. Groos, G. and Hendriks, J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* **34**, 283-288.
76. Gulbis, J.M. and Doyle, D.A. (2004). Potassium channel structures: do they conform? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 440-446.
77. Hall, J.C. (1998). Genetics of biological rhythms in *Drosophila*. *Adv. Genet.* **38**, 135-184.
78. Hall, J.C. (2005). Systems approaches to biological rhythms in *Drosophila*. *Methods Enzymol.* **393**, 61-185.
79. Hamasaka, Y. and Nassel, D.R. (2005). Mapping of serotonin, dopamine, and histamine in relation to different clock neurons in the brain of *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* **494**, 314-330.

-
80. Hamasaka,Y., Rieger,D., Parmentier,M.L., Grau,Y., Helfrich-Forster C., and Nassel,D.R. (2007). glutamata and its metabotropic receptor in *Drosophila* clock neuron circuits. *J Biol Rhythms*. *22*, 387-399.
81. Hanaoka,K., Wright,J.M., Cheglakov,I.B., Morita,T., and Guggino,W.B. (1999). A 59 amino acid insertion increases Ca(2+) sensitivity of rbsl01, a Ca2+ - activated K(+) channel in renal epithelia. *J.Membr.Biol*. *172*, 193-201.
82. Hardin,P.E., Hall,J.C., and Rosbash,M. (1992). Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *89*, 11711-11715.
83. Hartley,D.A., Preiss,A., and Artavanis-Tsakonas,S. (1988). A deduced gene product from the *Drosophila* neurogenic locus, enhancer of split, shows homology to mammalian G-protein beta subunit. *Cell* *55*, 785-795.
84. Hege,D.M., Stanewsky,R., Hall,J.C., and Giebultowicz,J.M. (1997). Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*: evidence for a brain-independent circadian clock. *J.Biol.Rhythms* *12*, 300-308.
85. Heginbotham,L., Abramson,T., and MacKinnon,R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K+ channels. *Science* *258*, 1152-1155.
86. Helfrich C. Role of the optic lobes in the regulation of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster*: behavioral analysis of neural mutants. *J Neurogenet*. 3[(6):], 321--43. 1986.
- Ref Type: Journal (Full)
87. Helfrich,C. and Engelmann,W. (1987). Evidences for circadian rhythmicity in the *pero* mutant of *Drosophila melanogaster*. *Z.Naturforsch.[C.]* *42*, 1335-1338.
88. Helfrich-Forster,C. (1995). The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *92*, 612-616.
89. Helfrich-Forster,C. (1997). Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J.Comp Neurol*. *380*, 335-354.
90. Helfrich-Forster,C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *J.Comp Physiol [A]* *182*, 435-453.
91. Helfrich-Forster,C. (2004). The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J.Comp Physiol A Neuroethol.Sens.Neural Behav.Physiol* *190*, 601-613.

92. Helfrich-Forster,C. (2005). Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes Brain Behav.* *4*, 65-76.
93. Helfrich-Forster,C. and Homberg,U. (1993). Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. *J.Comp Neurol.* *337*, 177-190.
94. Helfrich-Forster,C., Shafer,O.T., Wulbeck,C., Grieshaber,E., Rieger,D., and Taghert,P. (2007). Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *J.Comp Neurol.* *500*, 47-70.
95. Helfrich-Forster,C., Stengl,M., and Homberg,U. (1998). Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol.Int.* *15*, 567-594.
96. Helfrich-Forster,C., Winter,C., Hofbauer,A., Hall,J.C., and Stanewsky,R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* *30*, 249-261.
97. Herzog,E.D., Geusz,M.E., Khalsa,S.B., Straume,M., and Block,G.D. (1997). Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multimicroelectrode plates. *Brain Res.* *757*, 285-290.
98. Hille,B. (1989). The Sharpey-Schafer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Q.J.Exp.Physiol* *74*, 785-804.
99. Hille,B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes.* (**Sunderland, MA.**)
100. Horn,R. (2004). How S4 segments move charge. Let me count the ways. *J.Gen.Physiol* *123*, 1-4.
101. Hoshi,T., Zagotta,W.N., and Aldrich,R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* *250*, 533-538.
102. Hu,H., Shao,L.R., Chavoshy,S., Gu,N., Trieb,M., Behrens,R., Laake,P., Pongs,O., Knaus,H.G., Ottersen,O.P., and Storm,J.F. (2001). Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J.Neurosci.* *21*, 9585-9597.
103. Hubner,C.A. and Jentsch,T.J. (2002). Ion channel diseases. *Hum.Mol.Genet.* *11*, 2435-2445.
104. Hyun,S., Lee,Y., Hong,S.T., Bang,S., Paik,D., Kang,J., Shin,J., Lee,J., Jeon,K., Hwang,S., Bae,E., and Kim,J. (2005). *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* *48*, 267-278.
105. Itri,J.N., Michel,S., Vansteensel,M.J., Meijer,J.H., and Colwell,C.S. (2005). Fast delayed rectifier potassium current is required for circadian neural activity. *Nat.Neurosci.* *8*, 650-656.

106. Ivanchenko, M., Stanewsky, R., and Giebultowicz, J.M. (2001). Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. *J.Biol.Rhythms* *16*, 205-215.
107. Jacklet, J.W. (1969). Circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from isolated eye of *Aplysia*. *Science* *164*, 562-563.
108. Jackson, F.R., Bargiello, T.A., Yun, S.H., and Young, M.W. (1986). Product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature* *320*, 185-188.
109. Jaramillo, A.M., Zheng, X., Zhou, Y., Amado, D.A., Sheldon, A., Sehgal, A., and Levitan, I.B. (2004). Pattern of distribution and cycling of SLOB, Slowpoke channel binding protein, in *Drosophila*. *BMC.Neurosci.* *5*, 3.
110. Jentsch, T.J., Hubner, C.A., and Fuhrmann, J.C. (2004). Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nat.Cell Biol.* *6*, 1039-1047.
111. Johnson, C.H. and Golden, S.S. (1999). Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism. *Annu.Rev.Microbiol.* *53*, 389-409.
112. Joiner, W.J., Tang, M.D., Wang, L.Y., Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Gan, L., Gribkoff, V.K., and Kaczmarek, L.K. (1998). Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. *Nat.Neurosci.* *1*, 462-469.
113. Kaneko, M. and Hall, J.C. (2000). Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J.Comp Neurol.* *422*, 66-94.
114. Kaneko, M., Helfrich-Forster, C., and Hall, J.C. (1997). Spatial and temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J.Neurosci.* *17*, 6745-6760.
115. Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhee, C., Picot, M., Chelot, E., and Rouyer, F. (2004). Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J.Neurosci.* *24*, 1468-1477.
116. Knaus, H.G., Schwarzer, C., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M.L., and Sperk, G. (1996). Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J.Neurosci.* *16*, 955-963.
117. Kononenko, N.I., Medina, I., and Dudek, F.E. (2004). Persistent subthreshold voltage-dependent cation single channels in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience* *129*, 85-92.
118. Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *68*, 2112-2116.

119. Konopka,R.J., Wells,S., and Lee,T. (1893). Mosaic analysis of a *Drosophila* clock mutant. *Molec.General Genet.* *190*, 284-288.
120. Krishnan,B., Dryer,S.E., and Hardin,P.E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* *400*, 375-378.
121. Kuhlman,S.J. and McMahon,D.G. (2004). Rhythmic regulation of membrane potential and potassium current persists in SCN neurons in the absence of environmental input. *Eur.J.Neurosci.* *20*, 1113-1117.
122. Kuhlman,S.J., Silver,R., Le Sauter,J., Bult-Ito,A., and McMahon,D.G. (2003). Phase resetting light pulses induce *Per1* and persistent spike activity in a subpopulation of biological clock neurons. *J.Neurosci.* *23*, 1441-1450.
123. Kula,E., Levitan,E.S., Pyza,E., and Rosbash,M. (2006). PDF cycling in the dorsal protocerebrum of the *Drosophila* brain is not necessary for circadian clock function. *J.Biol.Rhythms* *21*, 104-117.
124. Lagrutta,A., Shen,K.Z., North,R.A., and Adelman,J.P. (1994). Functional differences among alternatively spliced variants of Slowpoke, a *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J.Biol.Chem.* *269*, 20347-20351.
125. Lancaster,B., Hu,H., Ramakers,G.M., and Storm,J.F. (2001). Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol* *536*, 809-823.
126. Lancaster,B., Nicoll,R.A., and Perkel,D.J. (1991). Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *J.Neurosci.* *11*, 23-30.
127. Lear,B.C., Lin,J.M., Keath,J.R., McGill,J.J., Raman,I.M., and Allada,R. (2005a). The ion channel narrow abdomen is critical for neural output of the *Drosophila* circadian pacemaker. *Neuron* *48*, 965-976.
128. Lear,B.C., Merrill,C.E., Lin,J.M., Schroeder,A., Zhang,L., and Allada,R. (2005b). A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron* *48*, 221-227.
129. Lee,T. and Luo,L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* *22*, 451-461.
130. Lin,Y., Stormo,G.D., and Taghert,P.H. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J.Neurosci.* *24*, 7951-7957.
131. Littleton,J.T. and Ganetzky,B. (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* *26*, 35-43.
132. Liu,X., Yu,Q.A., Huang,Z.S., Zwiebel,L.J., Hall,J.C., and Rosbash,M. (1991). The strength and periodicity of *D. melanogaster* circadian rhythms are

- differentially affected by alterations in period gene expression. *Neuron* **6**, 753-766.
133. Lovell,P.V. and McCobb,D.P. (2001). Pituitary control of BK potassium channel function and intrinsic firing properties of adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* **21**, 3429-3442.
134. Marrion,N.V. and Tavalin,S.J. (1998). Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature* **395**, 900-905.
135. Marshall,D.L., Vatanpour,H., Harvey,A.L., Boyot,P., Pinkasfeld,S., Doljansky,Y., Bouet,F., and Menez,A. (1994). Neuromuscular effects of some potassium channel blocking toxins from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebreus*. *Toxicon* **32**, 1433-1443.
136. McDonald,M.J. and Rosbash,M. (2001). Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* **107**, 567-578.
137. Meech,R.W. and Standen,N.B. (1974). Calcium-mediated potassium activation in *Helix* neurones. *J.Physiol* **237**, 43P-44P.
138. Meera,P., Wallner,M., Song,M., and Toro,L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 14066-14071.
139. Mehnert,K.I., Beramendi,A., Elghazali,F., Negro,P., Kyriacou,C.P., and Cantera,R. (2007). Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. *Dev.Neurobiol.* **67**, 415-421.
140. Meir,A., Ginsburg,S., Butkevich,A., Kachalsky,S.G., Kaiserman,I., Ahdut,R., Demirgoren,S., and Rahamimoff,R. (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev.* **79**, 1019-1088.
141. Meredith,A.L., Wiler,S.W., Miller,B.H., Takahashi,J.S., Fodor,A.A., Ruby,N.F., and Aldrich,R.W. (2006). BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat.Neurosci.* **9**, 1041-1049.
142. Mertens,I., Vandingenen,A., Johnson,E.C., Shafer,O.T., Li,W., Trigg,J.S., De Loof,A., Schoofs,L., and Taghert,P.H. (2005). PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* **48**, 213-219.
143. Michel,S., Geusz,M.E., Zaritsky,J.J., and Block,G.D. (1993). Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* **259**, 239-241.

144. Michel,S., Manivannan,K., Zaritsky,J.J., and Block,G.D. (1999). A delayed rectifier current is modulated by the circadian pacemaker in *Bulla*. *J.Biol.Rhythms* *14*, 141-150.
145. Miller,C. (1992). Ion channel structure and function. *Science* *258*, 240-241.
146. Miller,C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* *1*, REVIEWS0004.
147. Miyasako,Y., Umezaki,Y., and Tomioka,K. (2007). Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J.Biol.Rhythms* *22*, 115-126.
148. Moore,R.Y. (1996). Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog.Brain Res.* *111*, 103-119.
149. Moore,R.Y. and Eichler,V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* *42*, 201-206.
150. Morgan,T.H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science* *32*, 120-122.
151. Morin,L.P. and Allen,C.N. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Res.Brain Res.Rev.* *51*, 1-60.
152. Morin,L.P., Goodless-Sanchez,N., Smale,L., and Moore,R.Y. (1994). Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience* *61*, 391-410.
153. Morita,T., Hanaoka,K., Morales,M.M., Montrose-Rafizadeh,C., and Guggino,W.B. (1997). Cloning and characterization of maxi K⁺ channel alpha-subunit in rabbit kidney. *Am.J.Physiol* *273*, F615-F624.
154. Mrosovsky,N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol.Int.* *16*, 415-429.
155. Myers,E.M., Yu,J., and Sehgal,A. (2003). Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Curr.Biol.* *13*, 526-533.
156. Myers,M.P., Wager-Smith,K., Rothenfluh-Hilfiker,A., and Young,M.W. (1996). Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* *271*, 1736-1740.
157. Myers,M.P., Wager-Smith,K., Wesley,C.S., Young,M.W., and Sehgal,A. (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science* *270*, 805-808.
158. Navaratnam,D.S., Bell,T.J., Tu,T.D., Cohen,E.L., and Oberholtzer,J.C. (1997). Differential distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea. *Neuron* *19*, 1077-1085.

159. Nawatheatan,P. and Rosbash,M. (2004). The doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate Drosophila PER transcriptional repressor activity. *Mol.Cell* *13*, 213-223.
160. Newby,L.M. and Jackson,F.R. (1991). Drosophila ebony mutants have altered circadian activity rhythms but normal eclosion rhythms. *J.Neurogenet.* *7*, 85-101.
161. Nitabach,M.N., Blau,J., and Holmes,T.C. (2002). Electrical silencing of Drosophila pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell* *109*, 485-495.
162. Nitabach,M.N., Sheeba,V., Vera,D.A., Blau,J., and Holmes,T.C. (2005). Membrane electrical excitability is necessary for the free-running larval Drosophila circadian clock. *J.Neurobiol.* *62*, 1-13.
163. Nitabach,M.N., Wu,Y., Sheeba,V., Lemon,W.C., Strumbos,J., Zelensky,P.K., White,B.H., and Holmes,T.C. (2006). Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *J.Neurosci.* *26*, 479-489.
164. Orío,P., Rojas,P., Ferreira,G., and Latorre,R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci.* *17*, 156-161.
165. Ouyang,Y., Andersson,C.R., Kondo,T., Golden,S.S., and Johnson,C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *95*, 8660-8664.
166. Pallanck,L. and Ganetzky,B. (1994). Cloning and characterization of human and mouse homologs of the Drosophila calcium-activated potassium channel gene, slowpoke. *Hum.Mol.Genet.* *3*, 1239-1243.
167. Panda,S., Antoch,M.P., Miller,B.H., Su,A.I., Schook,A.B., Straume,M., Schultz,P.G., Kay,S.A., Takahashi,J.S., and Hogenesch,J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* *109*, 307-320.
168. Papazian,D.M., Schwarz,T.L., Tempel,B.L., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science* *237*, 749-753.
169. Park,J.H. and Hall,J.C. (1998). Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment- dispersing factor gene in Drosophila melanogaster. *J.Biol.Rhythms* *13*, 219-228.
170. Park,J.H., Helfrich-Forster,C., Lee,G., Liu,L., Rosbash,M., and Hall,J.C. (2000). Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in Drosophila. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *97*, 3608-3613.

-
171. Pattillo, J.M., Yazejian, B., DiGregorio, D.A., Vergara, J.L., Grinnell, A.D., and Meriney, S.D. (2001). Contribution of presynaptic calcium-activated potassium currents to transmitter release regulation in cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses. *Neuroscience* *102*, 229-240.
172. Peixoto, A.A. and Hall, J.C. (1998). Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*. *Genetics* *148*, 827-838.
173. Peng, Y., Stoleru, D., Levine, J.D., Hall, J.C., and Rosbash, M. (2003). *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol.* *1*, E13.
174. Pennartz, C.M., de Jeu, M.T., Bos, N.P., Schaap, J., and Geurtsen, A.M. (2002). Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* *416*, 286-290.
175. Pietrzykowski, A.Z., Martin, G.E., Puig, S.I., Knott, T.K., Lemos, J.R., and Treistman, S.N. (2004). Alcohol tolerance in large-conductance, calcium-activated potassium channels of CNS terminals is intrinsic and includes two components: decreased ethanol potentiation and decreased channel density. *J. Neurosci.* *24*, 8322-8332.
176. Piskorowski, R.A. and Aldrich, R.W. (2006). Relationship between pore occupancy and gating in BK potassium channels. *J. Gen. Physiol.* *127*, 557-576.
177. Pittendrigh, C.S. (1954). **On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *40*, 1018-1029.
178. Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *25*, 159-184.
179. Pittendrigh, C.S. and Caldarola, P.C. (1973). General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *70*, 2697-2701.
180. Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1974). Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science* *186*, 548-550.
181. Pittendrigh, C.S. and Skopik, S.D. (1970). Circadian systems. V. The driving oscillation and the temporal sequence of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *65*, 500-507.
182. Pitts, G.R., Ohta, H., and McMahon, D.G. (2006). Daily rhythmicity of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* *1071*, 54-62.
183. Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C., and Kay, S.A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* *278*, 1632-1635.

184. Pongs,O., Kecskemethy,N., Muller,R., Krah-Jentgens,I., Baumann,A., Kiltz,H.H., Canal,I., Llamazares,S., and Ferrus,A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* *7*, 1087-1096.
185. Preiss,A., Hartley,D.A., and Artavanis-Tsakonas,S. (1988). The molecular genetics of Enhancer of split, a gene required for embryonic neural development in *Drosophila*. *EMBO J.* *7*, 3917-3927.
186. Price,J.L., Blau,J., Rothenfluh,A., Abodeely,M., Kloss,B., and Young,M.W. (1998). double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* *94*, 83-95.
187. Pyza,E. and Gorska-Andrzejak,J. (2004). Involvement of glial cells in rhythmic size changes in neurons of the housefly's visual system. *J.Neurobiol.* *59*, 205-215.
188. Quintero,J.E., Kuhlman,S.J., and McMahon,D.G. (2003). The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J.Neurosci.* *23*, 8070-8076.
189. Rajashekhar,K.P. and Singh,R.N. (1994). Neuroarchitecture of the tritocerebrum of *Drosophila melanogaster*. *J.Comp Neurol.* *349*, 633-645.
190. Ralph,M.R. and Block,G.D. (1990). Circadian and light-induced conductance changes in putative pacemaker cells of *Bulla gouldiana*. *J.Comp Physiol [A]* *166*, 589-595.
191. Ralph,M.R., Foster,R.G., Davis,F.C., and Menaker,M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* *247*, 975-978.
192. Reddy,P., Zehring,W.A., Wheeler,D.A., Pirrotta,V., Hadfield,C., and Rosbash,M. (1984). Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* *38*, 701-710.
193. Renn,S.C., Park,J.H., Rosbash,M., Hall,J.C., and Taghert,P.H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* *99*, 791-802.
194. Reppert,S.M. and Weaver,D.R. (2000). Comparing clockworks: mouse versus fly. *J.Biol.Rhythms* *15*, 357-364.
195. Reppert,S.M. and Weaver,D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu.Rev.Physiol* *63*, 647-676.
196. Reppert,S.M. and Weaver,D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* *418*, 935-941.

197. Rieger,D., Shafer,O.T., Tomioka,K., and Helfrich-Forster,C. (2006). Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *J.Neurosci.* *26*, 2531-2543.
198. Rieger,D., Stanewsky,R., and Helfrich-Forster,C. (2003). Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J.Biol.Rhythms* *18*, 377-391.
199. Roberts,M.H. and Block,G.D. (1983). Mutual coupling between the ocular circadian pacemakers of *Bulla gouldiana*. *Science* *221*, 87-89.
200. Robitaille,R., Garcia,M.L., Kaczorowski,G.J., and Charlton,M.P. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* *11*, 645-655.
201. Roenneberg,T. and Merrow,M. (2005). Timeline: Circadian clocks - the fall and rise of physiology. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* *6*, 965-971.
202. Rohrbough,J., O'dowd,D.K., Baines,R.A., and Broadie,K. (2003). Cellular bases of behavioral plasticity: establishing and modifying synaptic circuits in the *Drosophila* genetic system. *J Neurobiol.* *54*, 254-271.
203. Rosbash,M. and Hall,J.C. (1985). Biological clocks in *Drosophila*: finding the molecules that make them tick. *Cell* *43*, 3-4.
204. Rosenblatt,K.P., Sun,Z.P., Heller,S., and Hudspeth,A.J. (1997). Distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel isoforms along the tonotopic gradient of the chicken's cochlea. *Neuron* *19*, 1061-1075.
205. Rubin,G.M. and Spradling,A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* *218*, 348-353.
206. Rutila,J.E., Maltseva,O., and Rosbash,M. (1998). The timSL mutant affects a restricted portion of the *Drosophila melanogaster* circadian cycle. *J.Biol.Rhythms* *13*, 380-392.
207. Saez,L. and Young,M.W. (1996). Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* *17*, 911-920.
208. Sah,P. and Davies,P. (2000). Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* *27*, 657-663.
209. Sakaba,T., Ishikane,H., and Tachibana,M. (1997). Ca²⁺ -activated K⁺ current at presynaptic terminals of goldfish retinal bipolar cells. *Neurosci.Res.* *27*, 219-228.
210. Salkoff,L. (2006). A tail of multiple calcium-sensing domains. *J.Gen.Physiol* *128*, 387-388.

211. Salkoff,L., Butler,A., Ferreira,G., Santi,C., and Wei,A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat.Rev.Neurosci.* 7, 921-931.
212. Saunders,D.S. (1997). Insect circadian rhythms and photoperiodism. *Invert.Neurosci.* 3, 155-164.
213. Schibler,U., Ripperger,J., and Brown,S.A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J.Biol.Rhythms* 18, 250-260.
214. Schopperle,W.M., Holmqvist,M.H., Zhou,Y., Wang,J., Wang,Z., Griffith,L.C., Keselman,I., Kusnitz,F., Dagan,D., and Levitan,I.B. (1998). Slob, a novel protein that interacts with the Slowpoke calcium- dependent potassium channel. *Neuron* 20, 565-573.
215. Schreiber,M. and Salkoff,L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys.J.* 73, 1355-1363.
216. Schreiber,M., Wei,A., Yuan,A., Gaut,J., Saito,M., and Salkoff,L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J.Biol.Chem.* 273, 3509-3516.
217. Schreiber,M., Yuan,A., and Salkoff,L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat.Neurosci.* 2, 416-421.
218. Schubert,R. and Nelson,M.T. (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 505-512.
219. Sehgal,A., Price,J.L., Man,B., and Young,M.W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263, 1603-1606.
220. Sehgal,A., Rothenfluh-Hilfiker,A., Hunter-Ensor,M., Chen,Y., Myers,M.P., and Young,M.W. (1995). Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* 270, 808-810.
221. Shafer,O.T., Helfrich-Forster,C., Renn,S.C., and Taghert,P.H. (2006). Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J.Comp Neurol.* 498, 180-193.
222. Shafer,O.T., Rosbash,M., and Truman,J.W. (2002). Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J.Neurosci.* 22, 5946-5954.
223. Shearn,A., Rice,T., Garen,A., and Gehring,W. (1971). Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 68, 2594-2598.
224. Shi,J., Krishnamoorthy,G., Yang,Y., Hu,L., Chaturvedi,N., Harilal,D., Qin,J., and Cui,J. (2002). Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature* 418, 876-880.

-
225. Shibata,S., Oomura,Y., Kita,H., and Hattori,K. (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* *247*, 154-158.
226. Shiga,S. (2003). Introduction. *The brain. Microsc.Res.Tech.* *62*, 93.
227. SHOLL,D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J.Anat.* *87*, 387-406.
228. Siegmund,T. and Korge,G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J.Comp Neurol.* *431*, 481-491.
229. Skinner,L.J., Enee,V., Beurg,M., Jung,H.H., Ryan,A.F., Hafidi,A., Aran,J.M., and Dulon,D. (2003). Contribution of BK Ca²⁺-activated K⁺ channels to auditory neurotransmission in the Guinea pig cochlea. *J.Neurophysiol.* *90*, 320-332.
230. Skopik,S.D. and Pittendrigh,C.S. (1967). Circadian systems, II. The oscillation in the individual *Drosophila* pupa; its independence of developmental stage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *58*, 1862-1869.
231. Spradling,A.C. and Rubin,G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* *218*, 341-347.
232. Stanewsky,R. (2003). Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J.Neurobiol.* *54*, 111-147.
233. Stanewsky,R., Kaneko,M., Emery,P., Beretta,B., Wager-Smith,K., Kay,S.A., Rosbash,M., and Hall,J.C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* *95*, 681-692.
234. Stephan,F.K. and Zucker,I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *69*, 1583-1586.
235. Stoleru,D., Nawathean,P., Fernandez,M.L., Menet,J.S., Ceriani,M.F., and Rosbash,M. (2007). The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell* *129*, 207-219.
236. Stoleru,D., Peng,Y., Agosto,J., and Rosbash,M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* *431*, 862-868.
237. Stoleru,D., Peng,Y., Nawathean,P., and Rosbash,M. (2005). A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature* *438*, 238-242.
238. Swensen,A.M. and Bean,B.P. (2005). Robustness of burst firing in dissociated purkinje neurons with acute or long-term reductions in sodium conductance. *J.Neurosci.* *25*, 3509-3520.

-
239. Taghert, P.H. and Shafer, O.T. (2006). Mechanisms of clock output in the *Drosophila* circadian pacemaker system. *J. Biol. Rhythms* *21*, 445-457.
240. Takeuchi, T., Hinohara, T., Kurosawa, G., and Uchida, K. (2007). A temperature-compensated model for circadian rhythms that can be entrained by temperature cycles. *J. Theor. Biol.* *246*, 195-204.
241. Teshima, K., Kim, S.H., and Allen, C.N. (2003). Characterization of an apamin-sensitive potassium current in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience* *120*, 65-73.
242. Thain, S.C., Hall, A., and Millar, A.J. (2000). Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.* *10*, 951-956.
243. Thomas, T., Wang, B., Brenner, R., and Atkinson, N.S. (1997). Novel embryonic regulation of Ca(2+)-activated K⁺ channel expression in *Drosophila*. *Invert. Neurosci.* *2*, 283-291.
244. Tian, L., Coghill, L.S., McClafferty, H., MacDonald, S.H., Antoni, F.A., Ruth, P., Knaus, H.G., and Shipston, M.J. (2004). Distinct stoichiometry of BKCa channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 11897-11902.
245. Tian, L., Duncan, R.R., Hammond, M.S., Coghill, L.S., Wen, H., Rusinova, R., Clark, A.G., Levitan, I.B., and Shipston, M.J. (2001). Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *276*, 7717-7720.
246. Toro, L., Wallner, M., Meera, P., and Tanaka, Y. (1998). Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci.* *13*, 112-117.
247. Tseng-Crank, J., Foster, C.D., Krause, J.D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T.J., and Reinhart, P.H. (1994). Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron* *13*, 1315-1330.
248. Ueda, H.R., Matsumoto, A., Kawamura, M., Iino, M., Tanimura, T., and Hashimoto, S. (2002). Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* *277*, 14048-14052.
249. Veleri, S., Brandes, C., Helfrich-Forster, C., Hall, J.C., and Stanewsky, R. (2003). A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* *13*, 1758-1767.
250. Veleri, S. and Wulbeck, C. (2004). Unique self-sustaining circadian oscillators within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Chronobiol. Int.* *21*, 329-342.

-
251. Venken, K.J. and Bellen, H.J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat.Rev.Genet.* **6**, 167-178.
252. Vosshall, L.B. and Young, M.W. (1995). Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron* **15**, 345-360.
253. Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 14922-14927.
254. Walsh, I.B., van den Berg, R.J., and Rietveld, W.J. (1995). Ionic currents in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Neuroscience* **69**, 915-929.
255. Wang, Z.W., Saifee, O., Nonet, M.L., and Salkoff, L. (2001). SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* **32**, 867-881.
256. Warbington, L., Hillman, T., Adams, C., and Stern, M. (1996). Reduced transmitter release conferred by mutations in the slowpoke-encoded Ca²⁺-activated K⁺ channel gene of *Drosophila*. *Invert.Neurosci.* **2**, 51-60.
257. Wegener, C., Hamasaka, Y., and Nassel, D.R. (2004). Acetylcholine increases intracellular Ca²⁺ via nicotinic receptors in cultured PDF-containing clock neurons of *Drosophila*. *J.Neurophysiol.* **91**, 912-923.
258. Wei, A., Solaro, C., Lingle, C., and Salkoff, L. (1994). Calcium sensitivity of BK-type K⁺ channels determined by a separable domain. *Neuron* **13**, 671-681.
259. Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**, 697-706.
260. Wever, R. (1964). [ON THE MECHANISM OF BIOLOGICAL 24-HOUR PERIODICITY. 3. APPLICATION OF THE MODEL EQUATION.]. *Kybernetik.* **2**, 127-144.
261. Wheeler, D.A., Hamblen-Coyle, M.J., Dushay, M.S., and Hall, J.C. (1993). Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J.Biol.Rhythms* **8**, 67-94.
262. Whitmore, D., Cermakian, N., Crosio, C., Foulkes, N.S., Pando, M.P., Travnickova, Z., and Sassone-Corsi, P. (2000). A clockwork organ. *Biol.Chem.* **381**, 793-800.
263. Williams, J.A., Su, H.S., Bernards, A., Field, J., and Sehgal, A. (2001). A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science* **293**, 2251-2256.

-
264. Womack, M.D. and Khodakhah, K. (2004). Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* **24**, 3511-3521.
265. Wulbeck, C., Szabo, G., Shafer, O.T., Helfrich-Forster, C., and Stanewsky, R. (2005). The novel *Drosophila* tim(blind) mutation affects behavioral rhythms but not periodic eclosion. *Genetics* **169**, 751-766.
266. Xia, X.M., Zeng, X., and Lingle, C.J. (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 880-884.
267. Xie, J. and McCobb, D.P. (1998). Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* **280**, 443-446.
268. Yang, Z., Emerson, M., Su, H.S., and Sehgal, A. (1998). Response of the timeless protein to light correlates with behavioral entrainment and suggests a nonvisual pathway for circadian photoreception. *Neuron* **21**, 215-223.
269. Yang, Z. and Sehgal, A. (2001). Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron* **29**, 453-467.
270. Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 308-312.
271. Yoshii, T., Fujii, K., and Tomioka, K. (2007). Induction of *Drosophila* behavioral and molecular circadian rhythms by temperature steps in constant light. *J. Biol. Rhythms* **22**, 103-114.
272. Yoshii, T., Heshiki, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., and Tomioka, K. (2005). Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 1176-1184.
273. Yoshii, T., Sakamoto, M., and Tomioka, K. (2002). A temperature-dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoolog. Sci.* **19**, 841-850.
274. Young, M.W., Jackson, F.R., Shin, H.S., and Bargiello, T.A. (1985). A biological clock in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **50**, 865-875.
275. Young, M.W. and Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 702-715.
276. Yu, J.Y., Upadhyaya, A.B., and Atkinson, N.S. (2006). Tissue-specific alternative splicing of BK channel transcripts in *Drosophila*. *Genes Brain Behav.* **5**, 329-339.
277. Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., and Salkoff, L. (2000). SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat. Neurosci.* **3**, 771-779.

278. Yuan,Q., Lin,F., Zheng,X., and Sehgal,A. (2005). Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron* *47*, 115-127.
279. Zehring,W.A., Wheeler,D.A., Reddy,P., Konopka,R.J., Kyriacou,C.P., Rosbash,M., and Hall,J.C. (1984). P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* *39*, 369-376.
280. Zeng,H., Hardin,P.E., and Rosbash,M. (1994). Constitutive overexpression of the *Drosophila* period protein inhibits period mRNA cycling. *EMBO J.* *13*, 3590-3598.
281. Zeng,X.H., Xia,X.M., and Lingle,C.J. (2005). Divalent cation sensitivity of BK channel activation supports the existence of three distinct binding sites. *J.Gen.Physiol* *125*, 273-286.
282. Zerr,D.M., Hall,J.C., Rosbash,M., and Siwicki,K.K. (1990). Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *J.Neurosci.* *10*, 2749-2762.
283. Zhou,Y., Reddy,S., Murrey,H., Fei,H., and Levitan,I.B. (2003). Monomeric 14-3-3 protein is sufficient to modulate the activity of the *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel. *J.Biol.Chem.* *278*, 10073-10080.
284. Zhou,Y., Schopperle,W.M., Murrey,H., Jaramillo,A., Dagan,D., Griffith,L.C., and Levitan,I.B. (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron* *22*, 809-818.