

Tesis Doctoral

La vía de BMP modula las propiedades básicas del reloj circadiano de *Drosophila*

Beckwith, Esteban Javier

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Beckwith, Esteban Javier. (2012). La vía de BMP modula las propiedades básicas del reloj circadiano de *Drosophila*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Beckwith, Esteban Javier. "La vía de BMP modula las propiedades básicas del reloj circadiano de *Drosophila*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

La vía de BMP modula las propiedades básicas
del reloj circadiano de *Drosophila*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Esteban Javier Beckwith

Director de tesis: Dra. María Fernanda Ceriani
Consejero de Estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir; Instituto de Investigaciones Bioquímicas
de Buenos Aires, CONICET.

Buenos Aires, Noviembre de 2011

La vía de BMP modula las propiedades básicas del reloj circadiano de *Drosophila*

El reloj circadiano controla los ritmos comportamentales, fisiológicos y metabólicos en todos los organismos en los que se lo ha estudiado. Este oscilador, cuya periodicidad es cercana a las 24 hs, se mantiene sincronizado gracias a diversas claves ambientales. En *Drosophila*, como en otros organismos, se han identificado algunos de los componentes responsables de generar y mantener las oscilaciones moleculares. Asimismo se han caracterizado circuitos neuronales en los que componentes del reloj fluctúan con un período cercano a 24 hs.

A lo largo de esta tesis se estudió el rol de la vía de *bone morphogenetic protein* (BMP) en *Drosophila* en el circuito neuronal que controla el comportamiento rítmico. Esta vía de señalización, además de estar involucrada en la organogénesis y el crecimiento, funciona como una señal sináptica retrógrada involucrada en la sinaptogénesis, la morfología sináptica y el control de la homeostasis en *Drosophila* y en otros organismos.

La alteración de esta vía en el circuito PDF en estadios adultos conlleva un alargamiento del período endógeno de la actividad locomotora, que correlaciona con el ritmo de acumulación y localización subcelular de *period*, un componente central del reloj molecular. Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo permiten proponer que la vía de BMP es capaz de modular la transcripción de genes centrales del reloj molecular y que *schnurri* podría constituir un regulador negativo determinante del nivel de expresión de los genes reloj en *Drosophila*.

Palabras claves

Drosophila, comportamiento, ritmos circadianos, genética molecular, regulación de la transcripción, Transforming Growth Factor β (TGF β), Bone Morphogenetic Protein (BMP), *schnurri* (*shn*).

The BMP pathway modulates basic properties of the *Drosophila* circadian clock

The circadian clock controls rhythms in behavior, physiology and metabolism in all living organisms. This internal timekeeping system is entrained by environmental cues such as light and temperature. In *Drosophila* and other species some of the molecular components as well as the neuronal network responsible to generate and sustain this process have been identified.

The long term goal of this thesis has been to study the role of the the *bone morphogenetic protein* (BMP) in *Drosophila* in the neural circuit that controls circadian locomotor activity rhythms. This signal transduction pathway is a general regulator of organogenesis and growth in *Drosophila* and other species, but specifically in the nervous system it constitutes a retrograde signal crucial for processes like synaptogenesis, synaptic morphology and the homeostatic response.

Adult-specific alteration of this pathway within the fly circadian network produces a long period phenotype in locomotor behavior, that correlates with an altered (i.e. delayed) accumulation and subcellular localization of PERIOD, a core component of the molecular clock. Our results lend support to the view that the BMP pathway modulates transcription of clock genes, and more specifically, that *schnurri* could be a negative regulator crucial to determine clock gene expression levels in *Drosophila*.

Key words

Drosophila, behavior, circadian rhythms, molecular genetics, transcription regulation, Transforming Growth Factor β (TGF β), Bone Morphogenetic Protein (BMP), *schnurri* (*shn*).

It is well established that the genes speak strongly in determining anatomical and biochemical features. It should not be surprising if, to a large degree, the **genes** also determine behavioral temperament, although, of course, **environmental** influences can also play a large role. **All behavior is inevitably the resultant of both components.** To discern the genetic contribution clearly, **the thing to do is to keep the environment constant and change the genes.** This is not easy to do with **human beings; they are notoriously uncooperative** and unwieldy experimental subjects, particularly if one must wait generations for the results. For this reason, the molecular biologists who have turned to studying behavior have cast around for more favorable model organisms. **There immediately arises the problem that the simpler an organism is, the less likely it is to exhibit behavioral patterns that are relevant to man,** while the more complex it is, the more difficult it may be to analyze. A wide range of organisms is under attack by genetic methods, including **Escherichia coli, paramecium, phycomyces, the rotifer (C. Levinthal, oral communication), the nematode (S. Brenner, oral communication), and the mouse.** **The fruit fly, *Drosophila*, represents a compromise.**

Benzer, S. (1971). From the gene to behavior. *JAMA* 218, 1015-1022.

Agradecimientos

El desarrollo de una tesis doctoral es mucho más que experimentos, implica un crecimiento personal dentro de un grupo humano el cual es inseparable de la formación que un tesista se lleva junto con el título de doctor. Yo tuve la fortuna de formar parte en un grupo excepcional dirigido por una persona llena de virtudes para desarrollar su rol; y nada de lo que he volcado en estas páginas hubiese sido posible sin el esfuerzo y la dedicación de Fernanda y de todos los que forman parte (estén ahora o no) del laboratorio.

Gracias Fernanda por tu infinita calidad humana y tu gran capacidad académica, por confiar en mí y ayudarme a crecer, por siempre tirar para adelante y construir el grupo que tenemos.

Gracias a todos los integrantes del 109;

Caro, María, Santi, aprendí mucho con ustedes y sigo aprendiendo a la distancia;

Ana, Axel, Pau y Guille, compañeritos de doctorado, pero por sobre todo amigos con los que crecer a la par, gracias por todo;

Marta, gracias por ese confesional cuarto de moscas;

Lore, Lía, Marian y Nara, gracias doctoras por volcar tanta experiencia y amistad;

Agus y Juli, irresponsables que dejan que uno les enseñe;

de todos aprendí y aprendo;

no alcanzan las palabras para expresar el agradecimiento, los quiero, gracias.

Otro grupo de gente, casi indistinguible al ojo externo, son los amigos del 112, a ellos también tengo mucho que agradecerles;

Maxi, Marian y Lachi, luego Andrés y Nuria, gracias por hacerme sentir parte de algo más grande;

Y el equipo actual, que me dio más amigos y compañero de doctorado;

Juli, mi gemela en el 112, gracias por las infinitas charlas;

Maxi, Diego, Joel, gracias por ser parte de un equipo que no reconoce la barra del pasillo;

Ana y Marian, que se sumaron a esta loca mística del 112-109.

Gracias a todos los que hacen de la FIL una verdadera comunidad, en definitiva como alguien ya dijo alguna vez, gracias al pasillo.

Los amigos que da la carrera han sido también fundamentales para este proceso; Cece y Javi dos neurobiólogos de raza, gracias por estar siempre; Die, Lucas, Pablo, Guille, Colin, Mery, Ro, y muchos otros. Gracias por dejarme compartir con ustedes mis frustraciones, alegrías y enojos, y gracias por compartir los suyos conmigo.

Quiero agradecer a Sabrina Sánchez, Marcelo Yanovsky y Horacio de la Iglesia, tres excepcionales cronobiólogos, por dejarme formar parte de sus trabajos y compartir hermosas experiencias de aprendizaje y colaboración mutua. Han sido muy importantes para mi formación.

Corresponde también agradecer a las instituciones que financiaron tanto mis becas como los subsidios que hicieron posible el trabajo realizado, CONICET, Agencia, HHMI, IBRO, NIH.

Quiero dedicar uno reglones para agradecer a otro grupo del que tengo el orgullo de formar parte. En este país tenemos la fortuna de contar con un sistema universitario muy particular si pensamos en el contexto mundial. Obtuve mi título de grado y este posgrado en la UBA, una Universidad pública, gratuita, de masa y cogobernada. Esta universidad no es fortuita, no se hace sola y se defiende todos los días. Como estudiante desde SINERGIA y como graduado desde SUMATORIA siento que he formado parte de ese mundo, de esa construcción. Pero en particular quiero agradecer a todos los que hacen SUMATORIA por hacerme sentir parte de este grupo; por su infinita calidad humana, por ser compañeros en una tarea pocas veces reconfortante y por ser un núcleo de personas valiosísimas de las que también me nutro y que son parte de mi formación académica y personal.

En este camino la encontré a Agos, el amor, la compañera, la alegría. Con una capacidad, un talento y una generosidad infinita que admiro, de quien aprendo cotidianamente y a quien agradezco por estos años que disfrutamos juntos, y toda la vida que nos queda por delante.

Y por último aquellos que están desde el principio y siempre van a estar. Tengo la suerte de tener una gran familia y puedo decir que nada de lo que emprendo les es ajeno, por lo

que nada de lo que logro les es ajeno. Abuel@s, ti@s, prim@s, todos son parte de mi vida y me hace quien soy, gracias. Leila, la persona más cariñosamente sensible que conozco, gracias por llenar la palabra hermana de un significado que no tiene límites ni explicación. Y Dani y Gra, papá y mamá, esa fórmula indisoluble, son EL ejemplo, la moral inquebrantable, el empeño, el esfuerzo, la dedicación. Porque siempre preguntan, ya que no importa entender, sino estar presente; porque siempre se preocupan y se alegran, porque viven sus vidas a pleno y también la mía, dando siempre apoyo y el estímulo necesario, gracias.

A Agos,
por la perspectiva

Índice

ÍNDICE	10
INTRODUCCIÓN	14
El reloj circadiano	15
Propiedades de los relojes circadianos	15
<i>Drosophila</i> , un elemento clave para el campo circadiano	16
La ingeniería molecular del reloj circadiano de <i>Drosophila</i>	19
El período de la actividad locomotora descansa sobre un delicado equilibrio	21
El circuito neuronal detrás del reloj de <i>Drosophila</i>	22
Desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso	24
Mecanismos involucrados en la estructuración del sistema nervioso	24
La vía de señalización de TGF β	25
La vía de TGF β en <i>Drosophila</i>	27
Los receptores de la vía de BMP pueden funcionar sinérgicamente	30
Regulación transcripcional de la vía de BMP	30
BMP y la interacción con otras vías de señalización	32
BMP como un mensajero retrógrado en el sistema nervioso	34
La vía de BMP regula el desarrollo sináptico	35
La vía de BMP es determinante en la expresión neuronal de neuropéptidos	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
<i>Drosophila</i>, sujeto de estudio	39
Cría y mantenimiento de moscas	39
Líneas de <i>Drosophila</i> utilizadas	39
El sistema GAL4/UAS	40
Cromosomas balanceadores	41
Líneas recombinantes	42
Análisis del comportamiento circadiano	43
Análisis automatizado de la actividad locomotora	43
Cálculo del período de la actividad locomotora	45
Análisis de la relación de cantidad actividad entre el día y la noche subjetiva	45
Análisis automatizado de la ecdisis de imagos (eclosión)	46
Biología molecular	47
Rescate del elemento transponible en la línea 756	47
Oligonucleótidos utilizados	48
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
Extracción de RNA	49
Obtención de ADNc (RT)	49
PCR en tiempo real	49
Análisis inmunohistológicos	50

Inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas	50
Anticuerpos	50
Microscopía y procesamiento de imágenes	51
Curvas de tiempo	51
Análisis de la longitud del circuito PDF	52
Cuantificación de partículas BRP positivas	52
Ensayo de actividad de luciferasa	53
Medición de los niveles de GFP en las sLNvs	53
RESULTADOS	55
Identificación de un mutante circadiano	56
Un relevamiento genético diseñado para encontrar nuevos componentes del sistema circadiano	56
Generación de una colección de individuos mutantes	56
Evaluación comportamental de los mutantes obtenidos	58
La cepa 756 produce un cambio de período en la actividad locomotora	59
El ritmo circadiano de eclosión también se encuentra afectado	62
La cepa 756 permite la sobreexpresión de la variante B del gen <i>schnurri</i>	63
El fenotipo de la línea 756 es específico de <i>schnurri</i>	66
La escisión del transposón revierte el fenotipo comportamental	66
Reversión del fenotipo de período por disminución de los niveles de <i>schnurri</i>	67
La sobreexpresión de <i>schnurri</i> de modo independiente de la línea 756 también genera alargamiento de período	69
La expresión de <i>schnurri</i> en las LNvs es determinante para el comportamiento locomotor	70
<i>schnurri</i> se expresa en las LNvs	70
Las neuronas PDF positivas son necesarias y suficientes para el cambio de período	71
Niveles constitutivamente elevados de <i>schnurri</i> generan un acortamiento de los axones de las sLNvs	73
El alargamiento del período en <i>pdfG4> shn</i> depende de la acción de PDF	76
La vía de BMP impacta sobre el comportamiento circadiano	77
La falta de receptores de la vía de BMP desconsolida el comportamiento	78
La activación de la vía de BMP alarga el período endógeno	80
<i>schnurri</i> altera el período endógeno en el estadio adulto	82
Puesta a punto del sistema TARGET para el análisis de la actividad locomotora circadiana de <i>Drosophila</i>	82
La sobreexpresión de <i>schnurri</i> afecta el reloj circadiano específicamente en individuos adultos	84
El alargamiento del período endógeno es independiente del defecto estructural	86
<i>schnurri</i> modula el engranaje del reloj molecular	88
La acumulación y entrada de PER al núcleo es demorada por la sobreexpresión de <i>schnurri</i>	88
El fenotipo de período largo es rescatado por <i>period</i> y <i>timeless</i>	90
La quinasa <i>shaggy</i> modula los fenotipos de sobreexpresión de SHN	93
El factor de transcripción <i>clock</i> modula el fenotipo de sobreexpresión de SHN	97
Los promotores de <i>period</i> y <i>timeless</i> son modulados por <i>schnurri</i>	99

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	102
Sobreexpresar <i>schnurri</i> modula el comportamiento locomotor circadiano	104
<i>schnurri</i> se expresa en el circuito PDF y su función es central para el período circadiano	104
La vía de BMP es determinante para actividad locomotora rítmica	105
El circuito PDF es particularmente afectado por esta vía de señalización	106
La vía de BMP cumple un papel fundamental en el estadio adulto.	107
La neurotransmisión química en el circuito PDF	108
Interacción entre la vía de BMP y el reloj molecular	109
REFERENCIAS	114

Introducción

El reloj circadiano

Los procesos evolutivos han dado origen a todos los organismos vivos y los han adaptado a su actual existencia. La adaptación a los diferentes ambientes como los océanos, los bosques o las montañas ha dado lugar a muy variadas formas de vida, permitiendo la conquista de nuevos territorios y la utilización de nichos ecológicos vacantes. De todos los parámetros de nuestro ambiente, hay una serie de ellos que, por ser tan obvios, muchas veces son descuidados o dados por sentado; esos parámetros son los cambios ambientales producto de la sucesión de los días y las noches. La Tierra, girando sobre su propio eje, impone cambios rítmicos con un período de 24hs en iluminación, temperatura y otras variables ambientales a las que todos los organismos que habitan el planeta están expuestos. No es sorprendente que existan numerosas adaptaciones a estos ciclos de 24hs. De hecho, la existencia de especies diurnas, nocturnas y crepusculares todas conviviendo en el mismo hábitat hace posible la ocupación de nichos ecológicos en términos de tiempo y no sólo de espacio.

Hoy en día, los seres humanos basamos nuestras vidas principalmente en relojes externos, artificiales, producto de las nuevas tecnologías. A pesar de eso, nuestros organismos siguen dependiendo de un reloj codificado en nuestro genoma, el cual ejerce control sobre una gran parte de nuestra fisiología y nuestro comportamiento. Este reloj biológico es intensamente investigado en muchas especies, como hongos, cianobacterias, moscas, peces, aves, roedores y humanos. Los principios generales de funcionamiento que subyacen estos relojes se encuentran conservados evolutivamente, lo cual ha estimulado aun más los esfuerzos para desentrañar los procesos que los gobiernan.

Propiedades de los relojes circadianos

En el primer reporte de la era moderna que da cuenta de la existencia de un reloj biológico el astrónomo francés Jean de Mairan resaltó una de las propiedades básicas de su funcionamiento. Este pionero observó la apertura y cierre de las hojas de una planta del género *Heliotropium*, fenómeno que ocurría diariamente. El aporte fundamental de Jean de Mairan fue aislar a la planta encerrándola en un armario y ver si los cambios seguían ocurriendo en la ausencia de la principal clave ambiental, la luz. Como la planta siguió abriendo y cerrando sus hojas, con este simple diseño propuso que las oscilaciones biológicas diarias se sustentan en un proceso endógeno capaz de persistir en condiciones ambientales constantes (De Mairan, 1729). Es claro que estos experimentos no descartan

la existencia de otras claves menos obvias que persisten al encerrar la planta, pero experimentos más complejos en condiciones muy controladas, incluso algunos experimentos realizados fuera de la atmósfera terrestre, nos permiten afirmar, con certeza, que los ritmos biológicos se sustentan en osciladores endógenos (Ferraro et al., 1989; Fuller et al., 1989; Sulzman et al., 1984). En ausencia de claves ambientales los relojes circadianos presentan un período cercano a las 24 horas (de ahí el nombre en latín *circa*= cercano *diem*= día).

Otra de las propiedades que definen a los relojes circadianos es su capacidad de ser sincronizados, o “puestos en hora”, por los ritmos ambientales, como los ciclos de luz y de temperatura. Esta característica permite la adaptación a los cambios estacionales, así como la corrección de las pequeñas desviaciones de período que tienen los relojes endógenos.

Por último, los relojes se caracterizan por poseer mecanismos de compensación de temperatura, los cuales posibilitan que el período de las oscilaciones no se modifique al variar la temperatura dentro de un rango fisiológico, el cual es diferente para cada especie.

Todas estas propiedades permiten constituir una relación de fase estable con los ciclos externos, alargando o acortando el período del reloj endógeno e igualándolo al del ciclo ambiental.

Drosophila, un elemento clave para el campo circadiano

Thomas Hunt Morgan comenzó a utilizar *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio para sus experimentos sobre la herencia alrededor del año 1910, trabajos que le valieron el premio Nobel en el año 1933. Estos aportes y los de muchos otros han establecido a *Drosophila* como uno de los primeros organismos utilizados para el análisis genético. Años más tarde, a fines de la década del 60 y también utilizando *Drosophila*, el laboratorio de Seymour Benzer revolucionó el campo de la genética del comportamiento y en pocos años estableció simultáneamente avances sustanciales en el estudio del comportamiento sexual, de los sistemas sensoriales, el aprendizaje y la memoria y los ritmos circadianos, entre otros (Benzer, 1971; Vosshall, 2007). En particular, Ron Konopka en el laboratorio de Benzer fue quien utilizó *Drosophila* para identificar genes involucrados en los ritmos circadianos. En el primer trabajo Konopka y Benzer describen tres alelos de un mismo gen, que abarcan los tres fenotipos básicos existentes en el campo de los ritmos circadianos: período largo, corto y arritmicidad (Konopka and Benzer, 1971). Este trabajo describió las consecuencias de la disfunción de un gen que

años más tarde sería identificado como *period (per)*, y con el esfuerzo de otros laboratorios constituyó el primer caso inequívoco en el que un gen se vinculaba directamente a un fenotipo comportamental (Bargiello et al., 1984; Zehring et al., 1984). Los trabajos pioneros de Benzer utilizaron el patrón de eclosión para reportar el funcionamiento del reloj, pero una de las ventajas de *Drosophila* es que presenta muchos patrones circadianos de comportamiento fácilmente medibles en el laboratorio. En particular, la actividad locomotora es el más estudiado ya que existen sistemas automatizados de evaluación comportamental. Siendo un animal crepuscular, la mosca presenta dos picos de actividad, uno al amanecer y otro al atardecer, separados por una fase de baja actividad durante el día la cual es especialmente evidente en los machos (Figura 1). Este esquema persiste, aunque con ciertas variaciones, en condiciones ambientales constantes.

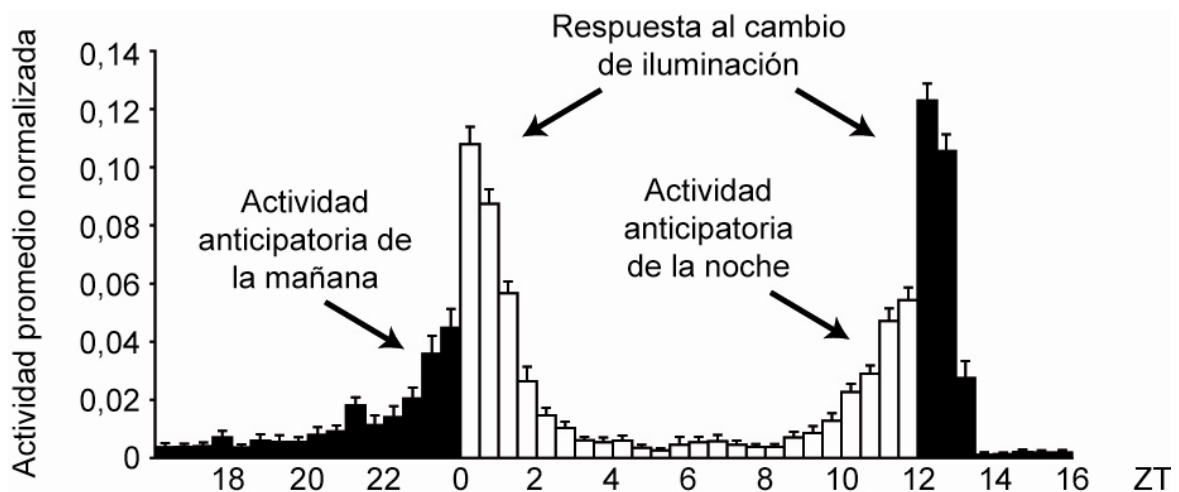


Figura 1. Patrón poblacional de actividad locomotora para moscas silvestres. Se muestra el promedio de actividad normalizada por la actividad total para una población de 30 animales en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las barras negras y blancas representan períodos de oscuridad y luz respectivamente, e indican la actividad desarrollada cada 30 minutos con el correspondiente error estándar. ZT: *Zeitgeber Time*, denominación utilizada para indicar el tiempo pasado desde la última transición oscuridad-luz, usualmente indicado en horas.

Al transferir las moscas a oscuridad constante (condición que permite la manifestación del reloj endógeno) el patrón comportamental se caracteriza por un pequeño aumento de actividad en torno al inicio del día subjetivo, y luego una actividad más o menos constante durante el resto del día subjetivo que culmina con un nuevo aumento, más pronunciado, en torno al comienzo de la noche subjetiva, remedando lo que se observa

en condiciones de luz y oscuridad. Cabe recalcar que durante la noche la actividad locomotora es muy esporádica en animales silvestres.

Aunque es el más estudiado, la actividad locomotora no es el único comportamiento controlado por el reloj; también se encuentran bajo control circadiano la eclosión (Konopka and Benzer, 1971), la sensibilidad olfativa (Krishnan et al., 1999), puesta de huevos (Howlader et al., 2006; Howlader and Sharma, 2006), ciertos aspectos del cortejo (Fujii and Amrein, 2010; Fujii et al., 2007) y el aprendizaje y la memoria de corto plazo (Lyons and Roman, 2009).

Un factor importante que ha permitido sostener a *Drosophila* como organismo modelo para el estudio del reloj es la relativa simplicidad de las redes neuronales que controlan su actividad locomotora rítmica (Sheeba, 2008). Han sido descritas alrededor de 150 neuronas reloj en el cerebro de la mosca (Figura 2), de un total de alrededor de 250.000 neuronas. Sin duda, este número de componentes permite el estudio de su funcionamiento a nivel de pequeños grupos o de neuronas individuales.

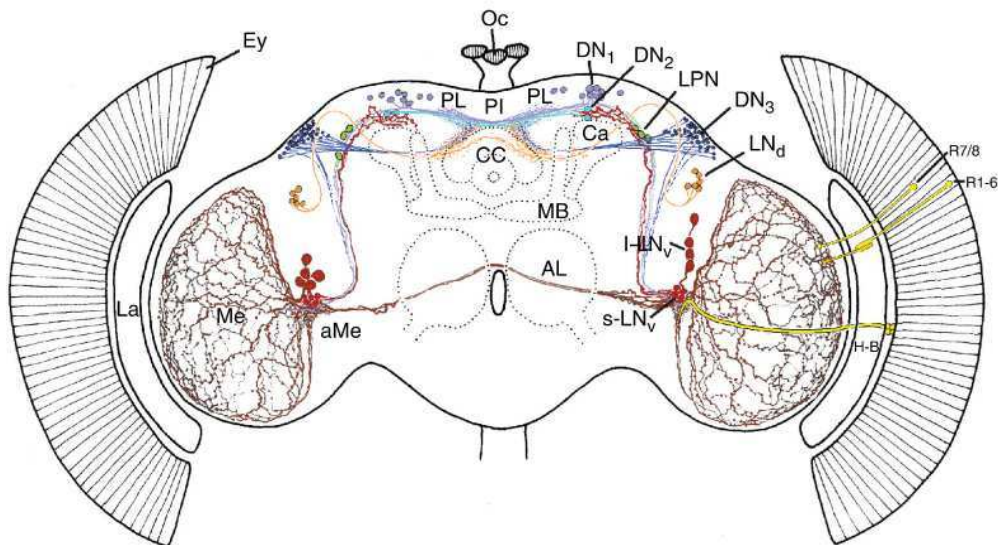


Figura 2. Esquema del cerebro de una mosca adulta en el que se resaltan las neuronas reloj con sus somas y sus proyecciones. La: lámina, Me: médula, Ey: ojo compuesto, aMe: médula accesoria, PL: *pars lateralis*, PI: *pars intercerebralis*, Oc: ocelos, CC: complejo central, MB: cuerpos pedunculados, Ca: cáliz del cuerpo pedunculado, AL: lóbulo antenal, DN1: neuronas dorsales 1, DN2: neuronas dorsales 2, LPN: neuronas laterales posteriores, DN3: neuronas dorsales 3, LNd: neuronas laterales dorsales, I-LNv: neuronas laterales ventrales grandes, s-LNv: neuronas laterales ventrales pequeñas, H-B: órgano de Hofbauer-Buchner, R7/8: fotorreceptores 7 y 8, R1-6: fotorreceptores 1 a 6. Tomado de C. Helfrich-Förster, *Genes, Brain and Behavior* (2005).

La ingeniería molecular del reloj circadiano de *Drosophila*

El análisis genético del comportamiento circadiano, estudiando principalmente la actividad locomotora, ha permitido modelar la existencia de dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa, los cuales son fundamentales para la generación y mantenimiento del reloj circadiano en *Drosophila*. El panorama actual propone que en el denominado primer ciclo (Figura 3), dos proteínas de unión a ADN estimulan la transcripción de sus propios represores, y retrasos temporales entre la activación y la represión genera las oscilaciones de 24 horas sobre las que se sustenta el reloj. Específicamente, el heterodímero CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) se une a las secuencias E-box (por lo general CACGTG) en los promotores de sus genes blanco para activar la expresión génica. En el primer circuito de retroalimentación, el heterodímero CLK/CYC activa la transcripción de *timeless* (*tim*) y *per*, los cuales tienen su pico máximo al inicio del día subjetivo. Las proteínas TIM y PER se acumulan y dimerizan en el citoplasma a lo largo de la noche y translocan al núcleo hacia la medianoche, en un proceso regulado por la proteína quinasa SHAGGY (SGG) (Martinek et al., 2001). Una vez en el núcleo PER y TIM se unen a CLK/CYC, inhibiendo su unión al ADN y la activación de la transcripción (Figura 3). Este panorama pone a la retroalimentación transcripcional como un mecanismo determinante del período circadiano (Kadener et al., 2008).

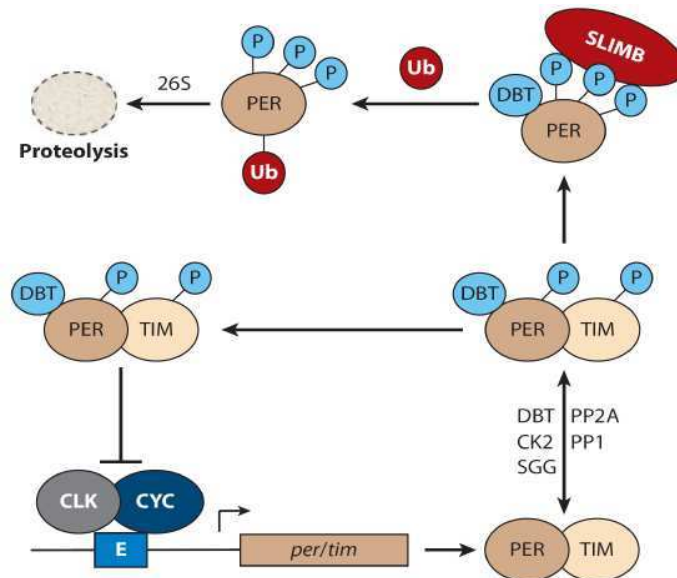


Figura 3: Primer ciclo de retroalimentación negativa. CLK/CYC se unen a los elementos E-box de los promotores de *per* y *tim* activando su transcripción. Las proteínas PER y TIM son modificadas por las quinasas DBT, CK2, y SGG y las fosfatasas PP2A y PP1. PER y TIM dimerizan y translocan al núcleo donde reprimen la actividad de dímero CLK/CYC. La hiperfosforilación de PER y TIM lleva a su unión con la E3 ubiquitina ligasa SLIMB, llevando a su ubiquitinación y posterior proteólisis en el proteasoma 26S. Tomado de Ravi Allada and Brian Y. Chung; Annu Rev Physiol (2010).

Sin embargo, la regulación postraduccional ejercida sobre los componentes de este primer ciclo impone retrasos temporales entre la activación transcripcional de CLK/CYC y la represión ejercida por TIM y PER. PER es fosforilado por CASEÍNA QUINASA 1E (CK1ε)/DOUBLETIME (DBT) y CASEÍNA QUINASA 2 (CK2), mientras que TIM es fosforilado por GLUCOGENOSINTETASA QUINASA 3β/SHAGGY (GSK3β/SGG) y CK2. La fosforilación por parte de SGG es de crucial importancia debido a que además de estar involucrada en la estabilidad de TIM (Stoleru et al., 2007), es crucial para la translocación al núcleo del dímero PER/TIM (Martinek et al., 2001), constituyendo por tanto una pieza clave en el establecimiento del período endógeno. A su vez, PER y TIM son sustratos de las fosfatasa PROTEIN FOSFATASA 2A (PP2A) y PROTEIN FOSFATASA 1 (PP1), respectivamente. Las diversas fosforilaciones a las que son sujetos PER y TIM conducen a su degradación; en el caso de PER, su fosforilación por parte de DBT media la ubiquitinación mediada por la E3 ligasa SUPERNUMERARY LIMBS (SLIMB), lo cual gatilla la degradación por el proteasoma al comienzo del día. La falta de PER libera la represión sobre su propia transcripción dando comienzo a un nuevo ciclo.

CLK/CYC también funcionan como activadores transcripcionales de un segundo ciclo entrelazado con el primero, el cual es importante para asegurar la fase y amplitud del oscilador y sus vías de salida (Figura 4). En este ciclo, el dímero CLK/CYC activa directamente la transcripción de *Par domain protein 1 (Pdp1)* y *vri*, dos reguladores transcripcionales cuyos productos proteicos se unen al promotor de *clk* pero con funciones opuestas; mientras que VRI inhibe la transcripción de *clk*, PDP1 la estimula. La acumulación retrasada de PDP1 respecto de VRI establece el ritmo de acumulación de *clk*, el cual es antifásico respecto de *per* y *tim*.

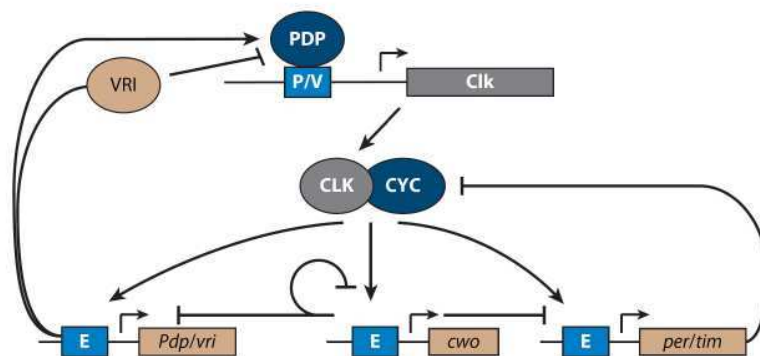


Figura 4. Segundo ciclo de retroalimentación negativa. El dímero CLK/CYC, además de unirse a los elementos E-box de los promotores de *per* y *tim*, activa los genes *clockwork orange (cwo)*, *pdp1*, y *vri* a través del mismo elemento. PDP1 activa la transcripción de *clk*, mientras que VRI compite con PDP1 para reprimir la expresión de *clk*. Por su parte, CWO reprime la activación media

por CLK/CYC confiriendo robustez a las oscilaciones transcripcionales. P/V: sitio de unión al ADN para PDP y VRI. Tomado de Ravi Allada and Brian Chung; *Annu Rev Physiol* (2010).

Los dos ciclos interconectados de retroalimentación negativa logran establecer un período endógeno muy cercano a 24hs. Pero una propiedad central de los relojes circadianos es la capacidad de ser entrenados por las claves ambientales, las cuales constituyen las vías de entrada al oscilador y a las que se denomina globalmente como “*zeitgebers*”, que en alemán significa “dador de tiempo”. La intensidad lumínica es, sin dudas, el parámetro más preponderante en la oscilación entre el día y la noche (Helfrich-Forster, 2002), pero también la temperatura (Glaser and Stanewsky, 2007), las claves sociales (Levine et al., 2002) e incluso el magnetismo terrestre pueden entrenar el reloj circadiano de *Drosophila* (Yoshii et al., 2009a).

Las moscas poseen tres órganos fotoperceptivos diferentes; el ojo compuesto, los ocelos y el órgano de Hofbauer–Buchner (HB); estos órganos forman parte de las vías de entrada de la información lumínica, pero el principal mecanismo sincronizador es autónomo de célula y recae en el pigmento fotosensible a la luz azul CRYPTOCHROME (CRY) (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). CRY es una proteína activable por luz que promueve la degradación de TIM (Busza et al., 2004; Ceriani et al., 1999); para esto la luz induce un cambio conformacional en CRY que facilita su unión a TIM. La falta de TIM vuelve inestable a PER debido a que queda expuesta a la fosforilación por parte de DBT (Kloss et al., 2001; Price et al., 1998); como ya se ha mencionado, la hiperfosforilación media la degradación de PER y el reseteo del reloj.

El período de la actividad locomotora descansa sobre un delicado equilibrio

Lo mecanismos moleculares descritos en la sección anterior representan un engranaje en el que la abundancia y funcionalidad de cada componente está finamente regulada para asegurar una periodicidad cercana a las 24hs. Para estudiar la función de cada uno de los componentes en un organismo modelo como *Drosophila* las herramientas genéticas disponibles han permitido perturbar los balances de abundancia y función, demostrando la relevancia de cada molécula en este proceso (Rosbash, 2009). Sin duda el ejemplo más paradigmático que demuestra la capacidad de los genes centrales del reloj de controlar el período proviene del trabajo de Konopka y Benzer en 1971; dos de los tres mutantes en el gen *period* que aislaron (*per^S* y *per^L*) representaban mutantes de período. Años después se caracterizaron las mutaciones en estos genes demostrándose que el efecto central es sobre la estabilidad de la proteína PER: mientras que aumentando su estabilidad se prolonga el período endógeno, disminuyéndola se acorta. Pero ésta no es la

única evidencia de que el gen *period* regula el período, el mismo Konopka demostró que aumentando la dosis génica de *per* el reloj molecular acortaba su período (Smith and Konopka, 1982), observación que fue luego ratificada por trabajos que incorporaron mediciones en los niveles transcripcionales de *per*, confirmando la correlación entre los niveles de expresión de *per* y el período endógeno (Baylies et al., 1987; Rutila et al., 1992). De hecho, *per* no es el único regulador transcripcional capaz de modular el período endógeno; la disminución de la dosis génica de *vrille* acorta el período locomotor (Blau and Young, 1999) y el aumento de la dosis génica de *clock* también es capaz de acelerar levemente el reloj molecular (Kadener et al., 2008).

Además de la regulación transcripcional sobre el período, el ciclo circadiano es muy sensible a la actividad de las quinasas que lo conforman. La acción que ejercen las quinasas *double-time* y *shaggy* sobre el reloj es mediado por su estado de activación y su abundancia a nivel de proteína (Kloss et al., 1998; Martinek et al., 2001; Price et al., 1998; Suri et al., 2000). Por el contrario, no hay reportes que demuestren que un incremento de dosis génica de estas quinasas puede afectar el paso del reloj.

Además del efecto que la dosis génica de *per* tiene sobre el reloj (a mayor número de copias, menor el período), un efecto contrario fue reportado sobre el incremento de la proteína PER regulada por un promotor constitutivo (Kadener et al., 2008; Yang and Sehgal, 2001). Aumentar la cantidad de PER por medio de la sobreexpresión del marco abierto de lectura (ORF) que codifica para esta proteína retarda el paso del reloj, aumentando el período, probablemente a través de aumentar exacerbadamente los niveles de PER, con la consiguiente disminución transcripcional del locus endógeno.

El circuito neuronal detrás del reloj de *Drosophila*

A partir de la identificación de mutantes circadianos y la posterior identificación de los genes y las proteínas afectadas, fue posible desarrollar anticuerpos dirigidos contra las proteínas claves del reloj biológico. Utilizando esas nuevas herramientas fue posible identificar las neuronas reloj en el cerebro de la mosca (Helfrich-Forster, 1995; Kaneko et al., 1997).

Hoy en día se define como el circuito circadiano a alrededor de 150 neuronas que expresan PER y TIM en el cerebro de *Drosophila*. En función de su localización anatómica, su tamaño celular y su patrón de expresión génica las neuronas reloj han sido divididas en grupos y subgrupos. A grandes rasgos es posible distinguir un grupo de neuronas con ubicación dorsal y otro grupo de ubicación lateral dentro del protocerebro. A su vez, el grupo dorsal ha sido dividido en tres subgrupos denominados DN1, DN2 y DN3 (por sus

siglas en inglés). Mientras que las DN1 son alrededor de 15 neuronas, las DN2 son sólo 2 neuronas y las DN3 son alrededor de 40 neuronas. Por su parte, el grupo de neuronas con ubicación lateral ha sido subdividido en cuatro subgrupos de pocas neuronas cada uno; 3 o 4 neuronas conforman el grupo posterior lateral, 6 neuronas son denominadas laterales dorsales, 5 definen el grupo de las neuronas laterales ventrales pequeñas y 4 el de las neuronas laterales ventrales grandes (LPN, LN_d, sLN_v y ILN_v respectivamente, por sus siglas en inglés) (Figura 2) (Peschel and Helfrich-Forster, 2011).

Es importante destacar que un gran número de células gliales son inmunoreactivas para PER y TIM, aunque los niveles de expresión son menores que los presentes en neuronas. El sistema glial, vital para el funcionamiento del sistema nervioso, es también clave para el correcto desenvolvimiento del sistema circadiano (Ng et al., 2011). A su vez, muchas evidencias indican que el sistema circadiano controla la morfología y el funcionamiento bioquímico de la glía (Jackson, 2010).

Los distintos subgrupos neuronales cumplen funciones más o menos específicas sobre distintos aspectos de la actividad locomotora rítmica a lo largo de los distintos momentos del día y bajo diferentes condiciones ambientales (Peschel and Helfrich-Forster, 2011). Dentro de esta red de neuronas, es de particular relevancia el grupo de las LN_vs, cuya característica saliente es que, a excepción de una de ellas, expresan el neuropéptido PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF). En *Drosophila*, se ha demostrado que PDF es la señal responsable de sincronizar los distintos osciladores en el cerebro de la mosca (Lin et al., 2004; Park et al., 2000; Peng et al., 2003; Renn et al., 1999). Si bien tanto las ILN_vs como las sLN_vs expresan PDF, son estas últimas las que se han señalado como el oscilador central en *Drosophila*. Además, el correcto funcionamiento de las neuronas sLN_v PDF positivas es de particular importancia para la actividad anticipatoria de la mañana, y son determinantes para sostener el ritmo locomotor en condiciones de oscuridad constante (Grima et al., 2004; Shigeyoshi et al., 2002; Stoleru et al., 2004).

Desde un punto de vista neuronanatómico, las sLN_vs envían sus proyecciones axonales hacia la región dorsal del cerebro donde se encuentran las DN1 y la *pars intercerebralis* (PI), un área compuesta por neuronas de sistema neuroendocrino. Por su parte, las ILN_vs proyectan sus axones hacia la médula ipsilateral y contralateral (Figura 5). Es importante destacar que si bien las sLN_vs constituyen las neuronas marcapaso, el resto de la red es fundamental para lograr un correcto control de la actividad locomotora rítmica.

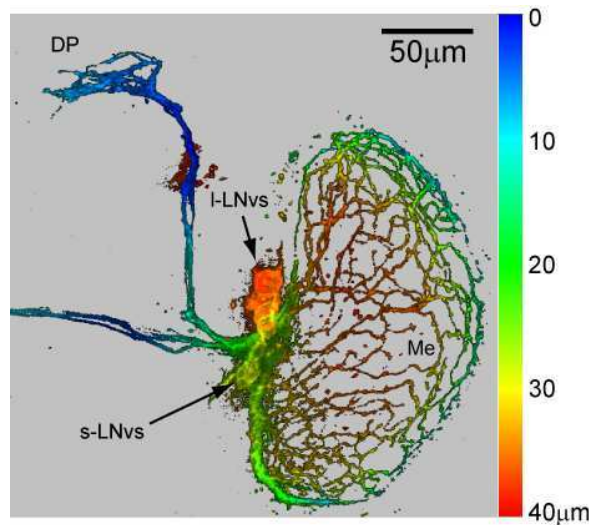


Figura 5: Circuito PDF. La figura muestra un hemisferio de mosca adulta del genotipo *pdfG4>CD8RFP* marcado por inmunohistoquímica contra la proteína RFP. El código de colores indica la profundidad en el tejido. Las flechas señalan los cuerpos celulares de las s-LNvs (neuronas laterales ventrales pequeñas) y las l-LNvs (neuronas laterales ventrales grandes). DP: protocerebro dorsal, Me: médula.

Desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso

Mecanismos involucrados en la estructuración del sistema nervioso

Los morfógenos son moléculas señalizadoras secretadas por diversos tipos celulares capaces de organizar células de su entorno en patrones determinados. Estas moléculas forman gradientes de concentración desde los centros de liberación, y determinan el arreglo espacial y el destino funcional de las células blanco, lo cual depende de la concentración alcanzada por el morfógeno en cada tipo celular capaz de reconocerlo, y las vías de señalización presentes en cada uno de ellos. Los ejemplos más clásicos de morfógenos incluyen al ácido retinoico y péptidos de la vía de *Wnt*, del *transforming growth factor- β* (TGF β), del *fibroblast growth factor* (FGF), y de la familia *Hedgehog*. Estos morfógenos y sus cascadas de trasducción de señales están presentes en casi todos los metazoos, constituyendo componentes homólogos tanto en estructura proteica como en función (Wu and Hill, 2009). En particular, el uso de *Drosophila* como modelo de estudio ha contribuido de manera sustancial a entender cómo estos factores actúan. En las últimas décadas el análisis molecular y genético de la actividad de los distintos morfógenos y del establecimiento de sus gradientes dentro de los organismos ha sido un tema central de la biología del desarrollo. Más recientemente se ha encontrado que muchas de estas moléculas son también factores claves en el guiado axonal y la

formación de sinapsis (Bayat et al., 2011; Marques and Zhang, 2006; Salinas, 2003); por lo tanto, en el establecimiento y función del sistema nervioso.

La vía de señalización de TGF β

Hacia el final de la década del 70 y principio de la década del 80 muchas eran las evidencias de que el crecimiento celular era controlado en gran medida por polipéptidos y hormonas que se encuentran en los fluidos provenientes de los diferentes órganos. En ese contexto, un concepto central era la idea de que la células transformadas o malignas eran células que habían escapado a los controles impuestos por esas hormonas y factores proteicos (Holley, 1975; Sporn and Todaro, 1980). Con el objetivo de entender los procesos de control del crecimiento celular, el laboratorio de Michael Sporn se embarcó en la caracterización bioquímica de cierto tipo de células transformadas aislando dos fracciones con capacidad de inducir la proliferación celular, las cuales denominaron “transforming growth factor α y β ” (TGF α y TGF β) (Anzano et al., 1982). El factor α resultó ser el “epidermal growth factor” (EGF) (Smith et al., 1985), factor que ya se encontraba descrito; el β representó un nuevo ejemplo de un potente inductor del crecimiento celular (Anzano et al., 1982). A pesar de haber sido encontrado como un estimulador del crecimiento celular TGF β es capaz, en ciertos contextos celulares, de funcionar inhibiendo la proliferación celular (Roberts et al., 1985; Tucker et al., 1984). Estas observaciones rompieron con una visión simplista que entendía a TGF β como un simple promotor del crecimiento celular y demostraron por primera vez la multifuncionalidad de esta vía de señalización (Sporn, 2006).

A lo largo de los años se ha descrito que la familia de factores de crecimiento TGF β incluye varias subfamilias, entre ellas la de TGF β , *bone morphogenic proteins* (BMP), *nodals*, *activins*, y la hormona anti-Mulleriana, además de muchos otros factores estructuralmente relacionados en vertebrados, insectos y nematodos (Tabla 1) (Moustakas and Heldin, 2009). Esta plétora de factores activa diversas vías de señalización y regula una variedad de procesos celulares incluyendo la proliferación y diferenciación, el establecimiento del eje dorso-ventral, la apoptosis, la adhesión y migración, media la respuesta a lesiones, modula la respuesta inmune y está involucrada en el control de la carcinogénesis (Santibanez et al., 2011; Wharton and Derynck, 2009).

<i>H. sapiens</i>						
Vía de señalización	BMP	GDF	Activin	TGFβ	AMH	Inhibidores
Ligando	BMP2, 4 BMP5, 6, 7 BMP8A, 8B BMP9, 10	GDF5, 6, 7 GDF9b GDF10, 11 GDF15 (MIC1) ----- GDF1, 3 GDF8 (MYO) GDF9	Inhibin βA Inhibin βB Nodal	TGFβ1 TGFβ2 TGFβ3	AMH (MIS)	BMP3 Inhibin α Inhibin βC Inhibin βE LEFTYA LEFTYB
Receptor tipo II	BMPRII ActRIIA, ActRIIB	BMPRII ActRIIA, ActRIIB	ActRIIA ActRIIB	TβRII	AMHRII	N/A
Receptor tipo I	BMPRIA (ALK3) BMPRI6 (ALK6) ALK2 ALK1	BMPRIA (ALK3) BMPRI6 (ALK6) ALK2 ----- ActRIB (ALK4) ALK7 TβRI (ALK5)	ActRIB (ALK4) ALK7	TβRI (ALK5) ----- ALK1 ALK2 BMPRIA (ALK3)	BMPRIA (ALK3) BMPRI6 (ALK6) ALK2	N/A
Receptor tipo III	RGMa, b, c (+)	Cripto 3 (+)	Cripto 3 (-) Cripto 1 (+)	TβRIII (+) Endoglin (+) Cripto 3 (-)	?	TβRIII (-) Cripto 3 (-)
R-Smad	SMAD1, 5, 8	SMAD1, 5, 8 ----- SMAD2, 3	SMAD2, 3	SMAD2, 3 ----- SMAD1, 5, 8	SMAD1, 5, 8	N/A
Co-Smad	SMAD4	SMAD4	SMAD4	SMAD4	SMAD4	N/A
I-Smad	SMAD6, 7	SMAD6, 7	SMAD7	SMAD7	SMAD6, 7	N/A
<i>D. melanogaster</i>						
Vía de señalización	BMP	Activin	Otros	Sma/Mab	Dauer	
Ligando	Dpp Gbb Scw	dActivin Daw	Mav Myo	DBL-1	DAF-7	
Receptor tipo II	Put Wit	Put Wit	?	DAF-4	DAF-4	
Receptor tipo I	Tkv Sax	Babo	?	SMA-6	DAF-1	
Receptor tipo III	?	?	?	?	?	
R-Smad	Mad	dSmad2	?	SMA-2 SMA-3 SMA-4	DAF-8 DAF-14 DAF-3 (?)	
Co-Smad	Medea	Medea	?			
I-Smad	Dad	?	?	TAG-68 (?)	TAG-68 (?)	
<i>C. elegans</i>						

Tabla 1. La vía de TGFβ en humanos, moscas y gusanos. Los ligandos, los receptores tipo I y las proteínas R-Smads responden a un código de color: azul, vía de BMP; rojo vía de TGFβ/activin. Los signos de pregunta indican que no hay información disponible. En el grupo de los receptores tipo III, los símbolos (+) o (-) indican efectos positivos o negativos, respectivamente. N/A, no corresponde. Modificado de Aristidis Moustakas and Carl-Henrik Heldin, *Development*, 2009, The regulation of TGFβ signal transduction.

La vía de señalización común a esta familia de péptidos transduce su señal desde la membrana hasta el núcleo a través de dos tipos de receptores transmembrana del tipo serina/treonina quinasa, que a su vez señalizan a través de las proteínas denominadas Smad. Los receptores de esta vía representan dos sub-familias estructuralmente muy similares, denominadas receptores de tipo I y de tipo II; los receptores tipo I poseen un dominio conservado rico en glicinas y serinas (secuencia GS) muy cercano a su dominio quinasa. Los ligandos permiten la formación de complejos estables de receptores que constan de dos receptores de cada tipo, en los que los receptores de tipo II fosforilan la

secuencia GS, y esta fosforilación activa los receptores tipo I que primero se autofosforilan, y luego fosforilan a las proteínas Smad (Moustakas and Heldin, 2009). Han sido descritas tres tipos de proteínas Smad: las R-Smads interactúan directamente con los receptores transmembrana y son fosforiladas por los receptores de tipo I en sus residuos C-terminales; las Co-Smads forman complejos con las R-Smad y translocan al núcleo donde regulan la transcripción en conjunto con otros cofactores; y las I-Smads son reguladores claves de la señal de TGF β constituyendo un mecanismo de retroalimentación negativo que regula el funcionamiento de la vía de señalización (Moustakas and Heldin, 2009).

La vía de TGF β en *Drosophila*

Drosophila melanogaster tiene siete miembros de la familia de TGF β . DECAPENTAPLEGIC (DPP) y SCREW (SCW) son homólogos de BMP, y determinan el eje dorsoventral y la diferenciación en diversos tejidos, siendo el ala de la mosca el modelo de estudio más difundido (Affolter and Basler, 2007). Otro homólogo de BMP es GLASS BOTTOM BOAT (GBB), que además de regular el desarrollo del ala está involucrado en el desarrollo del cerebro (Keshishian and Kim, 2004; Marques and Zhang, 2006; Salinas, 2003). Los ligandos tipo *activin* son dACTIVIN (ACT β) y DAWDLE (DAW), y cumplen un rol tejido-específico, por ejemplo en el desarrollo del sistema nervioso larval (Zhu et al., 2008). A estos cinco ligandos se suman MAVERICK y MYOGLIANIN, que se expresan en células del endodermo y el mesodermo, pero cuya función no ha sido caracterizada en detalle (Lee-Hoeflich et al., 2005; Nguyen et al., 2000).

En cuanto a los receptores transmembrana, *Drosophila* tiene 5 miembros. THICKVEINS (TKV), SAXOPHONE (SAX) y BABOON (BABO) constituyen receptores de tipo I, mientras que PUNT (PUT) y WISHFUL THINKING (WIT) son de tipo II. Los ligandos tipo BMP se unen a los receptores tipo I TKV y SAX, mientras que BABO media la actividad de ACT β y DAW (Affolter and Basler, 2007; Zhu et al., 2008).

Las proteínas Smad forman un grupo numeroso en vertebrados, en cambio *Drosophila* muestra un número limitado de genes homólogos. MOTHERS AGAINST DPP (MAD) representa la única R-Smad blanco de los receptores serina/tirosina quinasa SAX y TKV; por su parte, BABO señala a través de dSmad2. Mientras tanto MEDEA (MED) constituye la única Co-Smad. También existe sólo una I-Smad, denominada DAUGHTERS AGAINST DPP (DAD) (Tsuneizumi et al., 1997) que inhibe los receptores TKV y SAX pero no a BABO (Kamiya et al., 2008).

Además de las proteínas homólogas a Smad se han caracterizado dos proteínas claves para la respuesta a DPP en el desarrollo embrionario de *Drosophila*, BRINKER (BRK) y SCHNURRI (SHN). Las mutaciones en *brinker* producen efectos muy sutiles, con fenotipos similares a los producidos por la sobreactivación de DPP en ciertas células del embrión, y esto es producto de que DPP regula negativamente su expresión (Campbell and Tomlinson, 1999; Jazwinska et al., 1999). Los experimentos de sobreexpresión de *brk* demostraron que BRK es capaz de contraponerse a los efectos de la activación de la vía en un modo autónomo de célula silenciando la expresión de los genes blanco. Estas evidencias llevaron a caracterizar a BRK como un represor transcripcional que, unido a los promotores de los genes blancos de la vía, los mantiene inactivos en ausencia de los ligandos (Sivasankaran et al., 2000).

Por su parte, el primer reporte sobre los efectos de mutaciones en *shn* se encuentra en el trabajo pionero de C. Niisslein-Volhard, E. Wieschaus y H. Kluding de 1984 utilizando fenotipos de cutícula de embriones de *Drosophila*, en los que mutaciones para *shn* muestran los mismo fenotipos de falla en el cierre dorsal que mutaciones en los receptores *tkv* y *punt* (Niisslein-Volhard et al., 1984). Luego se demostró que los embriones mutantes para *shn* presentan otros fenotipos similares a los de mutaciones en *dpp*, *tkv* y *punt*, ya que son incapaces de generar una respuesta a DPP, incluso ante la adición de variantes constitutivamente activas del receptor TKV (Arora et al., 1995; Grieder et al., 1995; Staehling-Hampton et al., 1995). Estas evidencias experimentales, y el hecho de que SHN es una proteína nuclear con ocho dominios de dedos de zinc, llevaron a proponer a SHN como un cofactor nuclear que contribuyen en la respuesta a la señal de DPP. Trabajos posteriores determinaron que SHN es capaz de formar un complejo proteico junto con MAD y MEDEA en respuesta a la fosforilación y translocación al núcleo de MAD. Este complejo regula negativamente la expresión de BRK, mediando así buena parte de la respuesta transcripcional a DPP (Dai et al., 2000; Marty et al., 2000; Udagawa et al., 2000). También se ha propuesto que SHN tiene funciones adicionales a las de reprimir a *brk* ya que los embriones doble mutantes para *shn* y *brk* no tiene los mismos fenotipos embrionarios que el mutante *brk* (Affolter et al., 2001; Torres-Vazquez et al., 2001). Asimismo, ha sido descripta la función del trímero MAD-MED-SHN como regulador negativo de la transcripción de genes blanco de la vía como son *bag of marbles* (*bam*) y *gooseberry* (*gsb*) (Pyrowolakis et al., 2004). También existen evidencias de que SHN puede actuar como activador de la transcripción en conjunto con MAD, reconociendo de modo específico una secuencia consenso en el ADN (Dai et al., 2000), aunque esta posibilidad no ha sido explorada en profundidad.

Las co-Smad y estos coreguladores transcripcionales de la respuesta a DPP son los únicos componentes citoplasmático o nucleares descritos para esta vía en *Drosophila*. La multifuncionalidad y versatilidad de esa vía de señalización ha demostrado, en otros sistemas modelo, la necesidad de diversos factores tejido específico que permiten mediar la respuesta a TGF β según el contexto fisiológico de la célula blanco. Esto marca un desafío aún pendiente en el estudio de la respuesta celular a esta importante vía de señalización en *Drosophila* (Affolter and Basler, 2007; Wu and Hill, 2009).

En resumen, el funcionamiento canónico de la vía en el desarrollo de *Drosophila* implica la llegada de los ligandos tipo BMP a la superficie celular donde es reconocido por receptores de tipo II y luego de tipo I, lo que resulta en la fosforilación de MAD. pMAD recluta a MED y luego a SHN y otros coreguladores controlando así la expresión génica (Figura 6).

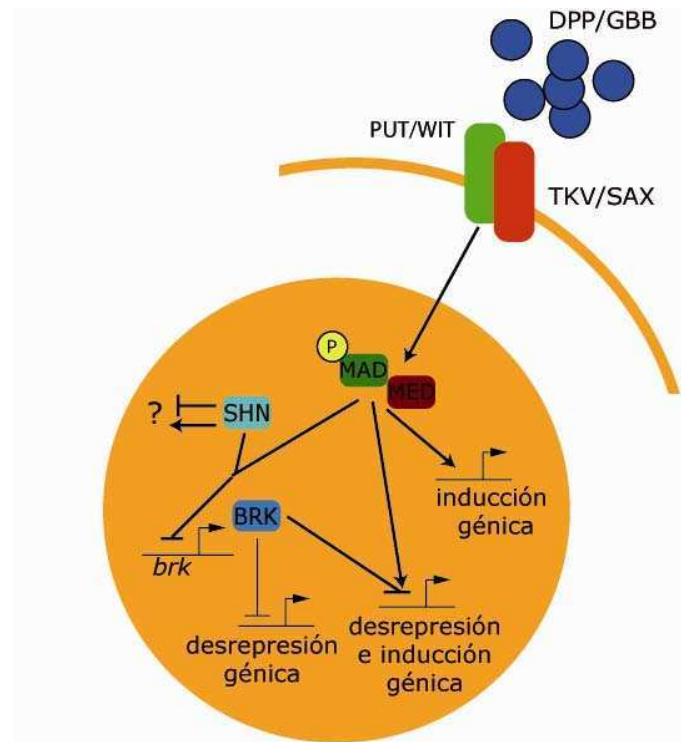


Figura 6. Vía canónica de señalización. Se muestra un esquema de los componentes principales y su función caracterizada principalmente en el desarrollo embrionario y larval de *Drosophila*. El signo de interrogación responde a la posibilidad de que SHN cumpla otros roles más allá de la regulación transcripcional de *brinker* (Affolter and Basler, 2007; Affolter et al., 2001).

Los receptores de la vía de BMP pueden funcionar sinérgicamente

La activación de los receptores depende de la recepción del ligando y la formación de un complejo compuesto por dos ligandos y cuatro receptores, dos de cada tipo. La utilización de receptores tipo I constitutivamente activados ha demostrado que, en la mayoría de los sistemas tisulares que emplean esta vía de señalización, la activación de la vía se logra con un representante de cada tipo de receptor. Si bien esta situación es la regla general existen excepciones que marcan que, dependiendo del contexto celular, los ligandos que llegan a la superficie celular, y sobre todo los niveles de expresión de los receptores tipo I, es necesaria la activación conjunta de complejos ligando-receptor formados por diferentes receptores tipo I. Específicamente, durante el desarrollo del ala el receptor tipo II involucrado es *punt* y el ligando principal es *dpp* aunque *gbb* también es relevante para el proceso; por su parte, ambos receptores tipo I, *tkv* y *sax*, son necesarios. En ciertos dominios en los que *tkv* se expresa en baja concentración, la activación conjunta de complejos DPP-PUNT-TKV no es suficiente para lograr un correcto desarrollo y es necesaria la activación de complejos GBB-PUNT-SAX (Haerry et al., 1998; Khalsa et al., 1998).

En el caso de la regulación por parte de *gbb* de la identidad peptidérgica de las neuronas CCAP (Veverytza and Allan, 2011; y ver sección “La vía de BMP es determinante en la expresión neuronal de neuropéptidos” en esta introducción), sólo se logra un rescate del fenotipo producido por la ausencia de *wit* al expresar variantes constitutivamente activas de ambos receptores tipo I, *sax* y *tkv*, ya que la expresión de cada uno de ellos por separado no es suficiente para obtener fenotipos silvestres.

Regulación transcripcional de la vía de BMP

Ante la llegada de los ligandos a la célula, la activación de receptores lleva a la fosforilación de las proteínas Smad (MAD en *Drosophila*) y su traslocación al núcleo donde regulan la transcripción. La lista de los factores regulatorios de la transcripción que se unen a las proteínas Smad y regulan la transcripción es extensa (para una revisión detallada de los coreguladores en diversas especies ver Moustakas, A., y Heldin, C.H., 2009). En términos generales, las proteínas Smad se unen con poca afinidad a los elementos SBE (*Smad-binding elements*) en el ADN y el reclutamiento de complejos Smad a la cromatina depende de la interacción directa con otros factores que le dan la afinidad necesaria. Luego de unirse al ADN, Smad y sus coreguladores reclutan activadores de la transcripción y enzimas acetiltransferasas de histonas para lograr la iniciación de la transcripción (Schmierer and Hill, 2007).

En cuanto a los elementos regulatorios de la transcripción que median la respuesta a la vía de TGF β en *Drosophila*, se han identificado dos que son capaces de mediar la activación o la represión de la transcripción (Figura 7). Estos elementos, denominados AE y SE (por *Activating Element* y *Silencing Element*) se caracterizan por ser secuencias cortas, poco conservadas entre los distintos genes blanco de la vía, y muy similares entre sí (Gao et al., 2005; Pyrowolakis et al., 2004; Weiss et al., 2010).

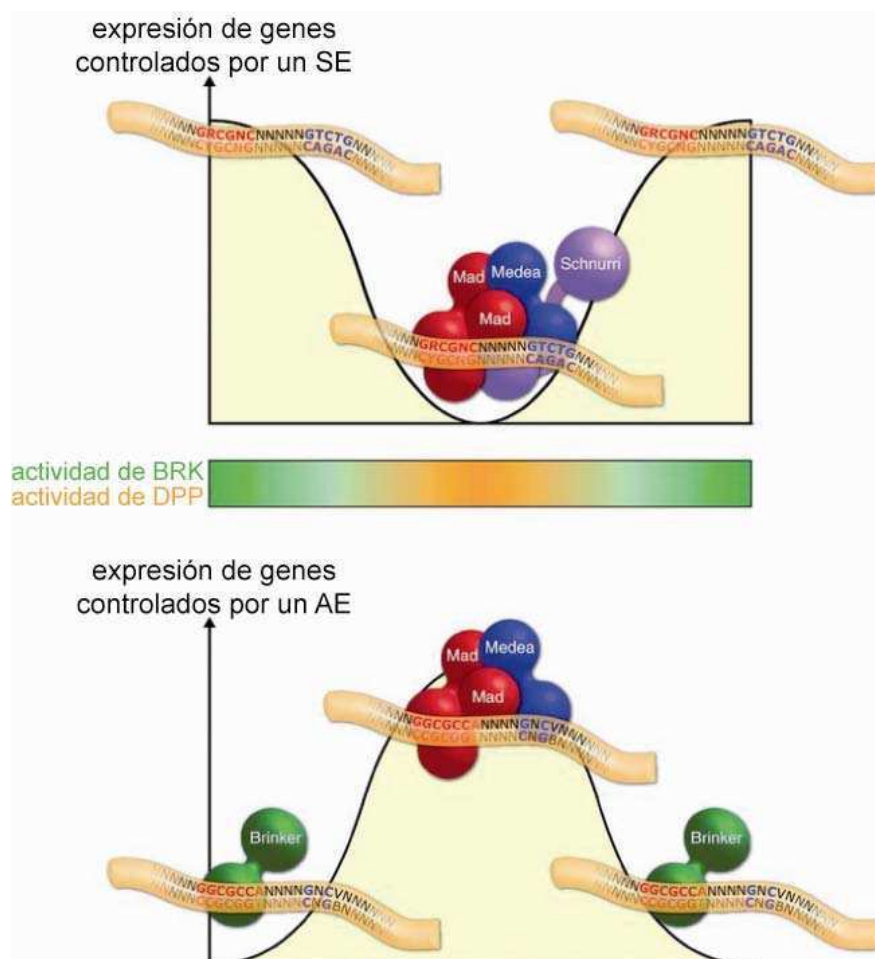


Figura 7. Modelo del funcionamiento de los elementos regulatorios que responden a DPP. Dos elementos levemente diferentes controlan la activación y la represión de la transcripción mediada por MAD y MED. Los genes controlados por los elementos SE (arriba) son reprimidos por el complejo MAD-MED-SHN en respuesta a elevados niveles de DPP; ante bajos niveles de DPP la represión es liberada porque no se forma dicho complejo. El caso más estudiado de este tipo de regulación es el elemento SE que se encuentra en el promotor de *brinker*. Los genes regulados por elementos AE son activados en regiones de altos niveles de DPP, es decir, por altos niveles de MAD fosforilada capaz de competir por los sitios AE. Con bajos niveles de DPP, BRK compete por los sitios AE mediando la represión transcripcional. El ejemplo más estudiado de este tipo de regulación es el promotor del gen *dad*.

La similitud de secuencia de ambos sitios permite reclutar al trímero compuesto por dos proteínas MAD y una MED, que luego es capaz de unirse a factores específicos que median la activación o represión. Además, el AE también es capaz de unir a BRK (represor transcripcional) que compite con la forma fosforilada de MAD por dicho sitio; esto permite que en condiciones de bajo nivel de activación BRK se una al ADN inhibiendo la transcripción, y que en regiones tisulares con elevados niveles de DPP, fosfo-MAD lo desplace mediando la activación transcripcional (Weiss et al., 2010).

BMP y la interacción con otras vías de señalización

Está firmemente establecido que las proteínas Smad son mediadores centrales de las señales que los receptores que responden a TGF β transducen al núcleo celular. Sin embargo, cada vez más pruebas bioquímicas y de la biología del desarrollo apoyan la idea de la existencia de vías alternativas que también participan en la señalización de TGF β . Hay tres mecanismos básicos por los que la vía de TGF β interactúa con otras vías de señalización para regular las respuestas fisiológicas: (1) vías de señalización diferentes capaces de modificar directamente (fosforilar, por ejemplo) a proteínas Smad y así modular la actividad de los efectores central; (2) proteínas Smad que directamente interactúan y modulan la actividad de otras proteínas de señalización (quinasas, por ejemplo) y por consiguiente modulan la transmisión de señales de otras vías, y (3) receptores de la vía de TGF β que interactúan o fosforilan directamente otras proteínas, iniciando así vías de señalización paralelas (Moustakas and Heldin, 2005) (Figura 8). Este último mecanismo es el más estudiado y del cual existen ejemplos en mamíferos e insectos. Los receptores ALK5 (receptores tipo I en mamíferos) son capaces de activar la vías de señalización de MAPK, tanto las mediadas por ERK (Lee et al., 2007) como las de JNK y p38 (Sorrentino et al., 2008; Yamashita et al., 2008). En *Drosophila*, se ha demostrado que el receptor tipo II *wit* interactúa directamente con la serina-treonina quinasa LIMK1, regulando la estabilidad sináptica en la sinapsis neuromuscular (Eaton and Davis, 2005). Esta quinasa está involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina a través de la regulación de *cofilina*, tanto en neuronas como en otros tejidos (Arber et al., 1998; Ng and Luo, 2004). Además, ratones *knockout* para LIMK1 presentan defectos morfológicos en las espinas dendritas y en la plasticidad sináptica dependiente de actividad (Endo et al., 2003).

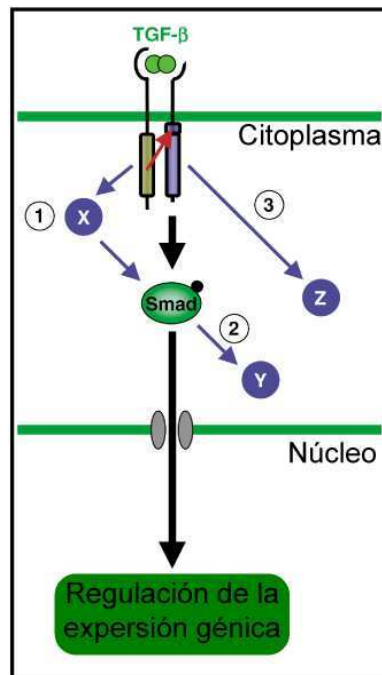


Figura 8. Mecanismos alternativos para la interacción de la vía de TGF β con otras vías de señalización. Se esquematizan tres mecanismos alternativos: (1) distintas vías de señalización son capaces de modificar proteínas Smads interactuando o no con los receptores de TGF β ; (2) proteínas Smads interactúan y modulan otras vías de señalización, y (3) receptores de la vía de TGF β que interactúan o fosforilan directamente otras proteínas, iniciando así vías de señalización paralelas (independientes de Smad). Tomado de Moustakas y Heldin (2005).

Así como la señalización por los ligandos de la familia de TGF β es capaz de regular otras vías de señalización, también es cierto que existe modulación de la vía de TGF β por parte de otras vías. En particular, la actividad de las proteínas Smad y co-Smad está regulada de modo directo por la vía de señalización de receptores tirosina quinasa. La estructura molecular de las proteínas Smad está conservada a lo largo de la evolución y se caracteriza por tener dos dominios globulares denominados MH1 y MH2, unidos por un dominio bisagra rico en prolinas. Este dominio bisagra presenta además varios residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados. Proteínas de la vía de MAPK activadas por receptores tirosina quinasa fosforilan el dominio bisagra de Smad1, promoviendo su degradación en el proteasoma y reduciendo así la activación de la vía de BMP (Sapkota et al., 2007). Otra quinasa del dominio bisagra en Smad1 es GSK3 (cuyo homólogo en *Drosophila* es *shaggy*), y su actividad reduce la señalización de la vía de BMP al inhibir el funcionamiento de Smad1. Dado que GSK3 se encuentra negativamente regulada por la vía de Wnt esta vía actúa de forma sinérgica con BMP aumentando la

duración de la señales, lo cual representa un claro ejemplo de interacción entre diferentes vías de señalización (Fuentealba et al., 2007; Wu and Hill, 2009).

En resumen, ninguna de las vías de señalización actúa de modo aislado en el contexto celular y tisular, siendo la regulación cruzada entre los diferentes mecanismos lo que proporciona una regulación fina al flujo de información que conduce los procesos celulares.

BMP como un mensajero retrógrado en el sistema nervioso

La caracterización del funcionamiento de la vía de BMP se ha realizado principalmente durante el desarrollo embrionario y larval. Sin embargo, en los últimos años ha sido creciente el número de reportes que apuntan a una función de la vía de BMP en el establecimiento y funcionamiento del sistema nervioso tanto en la fisiología normal (Keshishian and Kim, 2004; Marques, 2005; Sanyal et al., 2004) como en procesos patológicos (Bayat et al., 2011). Más allá del rol que esta vía tiene en el establecimiento del plan anatómico general de los organismos, en el sistema nervioso la vía de BMP funciona como una señal retrógrada vinculada a la función sináptica y a la expresión génica (Figura 9).

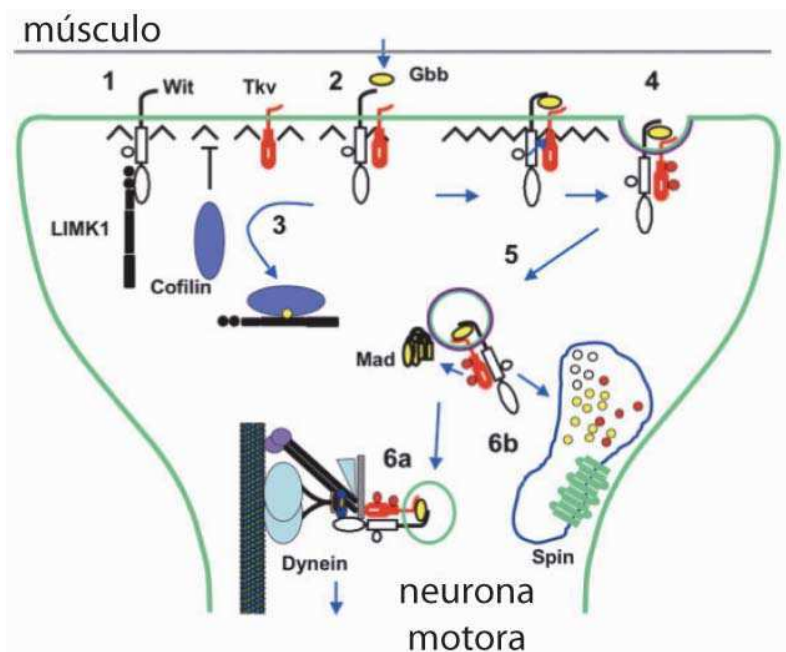


Figura 9. Modelo del funcionamiento de la vía de BMP como señal retrógrada en la sinapsis neuromuscular. (1) El receptor tipo I TKV y el receptor tipo II WIT se localizan en la

región presináptica, donde WIT interactúa con la quinasa dLIMK1. (2) Los receptores se unen al ligando GBB secretado por el músculo, forman un complejo proteico y se activan. (3) El complejo activado puede causar la activación de dLIMK1 modificando la dinámica de F-actina. (4) El complejo formado por los receptores y el ligando se internaliza y es dirigido al sistema endosomal temprano. (5) Una vez internalizado el complejo TKV fosforila a MAD en la terminal presináptica. (6a) De modo alternativo, el endosoma temprano puede unirse a DINEINA y ser transportado al soma de la neurona motora para ejercer, en ese compartimento, su función sobre MAD. (6b) Como parte del sistema de regulación negativa de la vía, el endosoma formado por la internalización del complejo de receptores y ligandos puede ser degradado por el sistema lisosomal. Modificado de Márques, J Neurobiol (2005)

Este tipo de señalización en el sistema nervioso no es exclusiva de esta vía, y ha sido descrita para factores de crecimiento como las neurotrofinas (Barker et al., 2002), y para moléculas pequeñas capaces de difundir a través de la membrana plasmática, como el ácido araquidónico, el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Baranano et al., 2001).

La vía de BMP regula el desarrollo sináptico

El rol pleiotrópico que la vía de BMP tiene a lo largo del desarrollo ha restringido en buena medida el análisis de su función en el sistema nervioso en estadios avanzados del desarrollo o en individuos adultos. Sin embargo, desde fines de los años 90 existen evidencia *in vitro* de su rol en el establecimiento y funcionamiento de circuitos neuronales. Utilizando *Aplysia* como sistema modelo se ha demostrado que TGF β es necesario y suficiente para inducir facilitación sináptica en el ganglio sensorial (Chin et al., 1999; Zhang et al., 1997). Por otra parte, en vertebrados, la administración de ligandos de la vía sobre preparaciones agudas de neuronas hipocámpales (Withers et al., 2000) o del sistema simpático (Lein et al., 1995) produce la promoción del crecimiento dendrítico. Además, la inducción y mantenimiento de fenotipo colinérgico en neuronas del sistema nervioso central está fuertemente controlado por uno de los ligandos de la vía de BMP (Lopez-Coviella et al., 2000).

Sin embargo, las primeras evidencias *in vivo* del rol de la vía de BMP como un mensajero retrógrado en la diferenciación sináptica fueron obtenidas trabajando en la sinapsis neuromuscular de la larva III de *Drosophila*, una preparación ampliamente estudiada y con innumerables ventajas experimentales. Estos trabajos seminales demostraron que animales con mutaciones en el receptor tipo II *wit* mostraban sinapsis muy reducidas pero no presentaban cambios morfológicos notorios en el músculo ni la motoneurona (Aberle et al., 2002; Marques et al., 2002).

Posteriormente, otros trabajos profundizaron el estudio de la vía clásica en este proceso determinando que el receptor tipo I *tkv* está enriquecido en las terminales de los axones motores y que mutaciones en los receptores tipo I *tkv* y *sax*, así como mutaciones en el ligando *gbb*, mostraban también diversas alteraciones. Además de una reducción de tamaño en la sinapsis neuromuscular (lo cual fue evaluado por microscopía óptica), los fenotipos más salientes a nivel de ultraestructura son la reducción de las estructuras de tipo “T Bars”, la reducción del área de los botones sinápticos, y la presencia de desprendimientos de la membrana presináptica. Por otra parte, estos mutantes también muestran una disminución en la transmisión sináptica caracterizada por una reducida liberación de neurotransmisores (McCabe et al., 2004; McCabe et al., 2003; Rawson et al., 2003). Como es de esperar la disfunción de ligandos y receptores conlleva, en la sinapsis neuromuscular, a una falta de fosforilación de MAD, la cual ha sido estudiada con diversos anticuerpos fosfo-específicos. Asimismo, la ausencia de *mad* o *medea* también generan los defectos en la estructura sináptica, los cuales pueden ser rescatados por la reconstitución de su expresión en el músculo (Dudu et al., 2006; McCabe et al., 2004). La función de la vía de BMP en la placa neuromuscular no se reduce al crecimiento, sino que también es necesaria para garantizar la capacidad neuronal de montar una respuesta homeostática y así mantener la funcionalidad de la transmisión sináptica en la placa neuromuscular (Goold and Davis, 2007).

Si bien la sinapsis neuromuscular de la larva III de *Drosophila* ha sido la preparación elegida para caracterizar *in vivo* la función de esta vía de señalización como un mensajero retrógrado, hay reportes que extienden esta observación a otros sistemas. En particular un trabajo utilizando la larva I de *Drosophila* demuestra el requerimiento de esta vía, y en particular del ligando *gbb* y el receptor *tkv*, para el funcionamiento de una sinapsis central que forma parte de los circuitos pre-motores (Baines, 2004), sin encontrar evidencia de señal positiva para fosfo-MAD en la preparación estudiada. Este trabajo propone que *gbb*, por medio de *tkv*, puede mediar la potenciación de la transmisión sináptica en el sistema nervioso central.

Cabe destacar que los trabajos que han evaluado la función de la vía de BMP como mensajero retrógrado en el sistema nervioso no han evaluado el requerimiento o la función de *schnurri* ni *brinker* en estos procesos; y hasta el momento se cuenta con poca información respecto de como es que esta vía de señalización regula la expresión génica para lograr los efectos fisiológicos que gobierna.

La vía de BMP es determinante en la expresión neuronal de neuropéptidos

Otra de las funciones de la vía de BMP descritas en la bibliografía, aunque mucho menos explorada, es la capacidad de determinar la identidad neuronal modulando la expresión génica. Un grupo particular de células neurosecretorias denominadas neuronas "Tv", que se caracterizan por expresar el neuropéptido FMRFamida, es particularmente sensible a la vía de BMP ya que en los mutantes para el receptor *wit* la expresión del neuropéptido está completamente abolida (Marques et al., 2003). Estas neuronas integran la señal retrógrada de BMP que, junto con dos factores de transcripción, funciona como paso limitante en la determinación de la identidad peptidérgica de estas neuronas (Allan et al., 2003). Los péptidos de la familia de FMRFamida son neuromoduladores que ejercen su función a través de receptores acoplados a proteína G y son capaces de modular la eficiencia de transmisión en la sinapsis neuromuscular. Es decir, la vía de BMP estaría regulando la sinapsis neuromuscular no sólo a nivel de su crecimiento y su capacidad homeostática, sino también contribuiría con su modulación sistémica a través del sistema neurohemal. En un trabajo posterior se describió que esta misma vía es necesaria para mantener la expresión de este neuropéptido en el cerebro adulto más allá de su rol permisivo en el desarrollo temprano (Eade and Allan, 2009).

Las neuronas Tv no son las únicas células peptidérgicas cuya identidad está controlada por la vía de BMP. En un trabajo reciente Veverytsa y Allan demostraron que la vía de BMP es crucial para determinar la identidad peptidérgica de las neuronas CCAP (Veverytsa and Allan, 2011), un subconjunto de las células neurosecretorias que controlan el programa comportamental de ecdisis (Ewer, 2005). Las neuronas CCAP coexpresan CCAP (Crustacean cardioacceleratory peptide) y MIP (Myoinhibiting peptide), y además dos subunidades de la hormona peptídica *bursicon*, Bursicon ($Burs\alpha$) y Partner of Burs ($Burs\beta$). La expresión de estos péptidos en las neuronas CCAP está controlada por la vía de BMP y se encuentra fuertemente disminuida en el mutante de *wit*, cuya mutación, además de muchos otros déficits, impide la ecdisis de las moscas adultas. Conjuntamente con el rol de *wit*, el trabajo demuestra que el aporte de GBB desde el músculo y la fosforilación de MAD en la neurona es parte de la vía de señalización que media la expresión de los neuropéptidos (Veverytsa and Allan, 2011). Este trabajo, analizando in vivo el comportamiento de ecdisis es el primer reporte hasta el momento de un rol de la vía de BMP en individuos adultos.

Materiales y Métodos

***Drosophila*, sujeto de estudio**

Cría y mantenimiento de moscas

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis se mantuvieron en viales de vidrio o plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de alto con 10 ml de un medio de cultivo estándar preparado a base de polenta, agar, levadura, sacarosa, *Nipagin* y ácido propiónico. Al momento de amplificar las líneas se utilizaron botellas de 250 ml con 50 ml del mismo medio de cultivo, dada su mayor capacidad.

Los cruzamientos destinados a realizar experimentos de actividad locomotora se realizaron sólo en viales y se utilizaron 3 hembras y 2 machos. Para seleccionar los individuos, éstos se anestesiaron utilizando CO₂ y fueron observados bajo lupa sobre una plataforma porosa con un flujo continuo de CO₂. En todos los casos se procuró minimizar el tiempo de exposición al CO₂, debido a que se ha reportado que este gas causa defectos en la fisiología y comportamiento de las moscas (Seiger and Kink, 1993). Los períodos de ovipuesta fueron de tres días y los cruzamientos fueron mantenidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y a 25°C. Se agregó una punta de espátula de levadura hidratada a los viales para optimizar la ovipuesta. Además se controló que los mismos se mantuvieran hidratados a lo largo del tiempo, y que no se encontrasen sobrepoblados, utilizándose como criterio de selección la ausencia de larvas de estadios 1 o 2 fuera del alimento. Se trató de evitar el hacinamiento de las moscas ya que se ha demostrado que las moscas hambreadas muestran mayor actividad (Martin, 2003).

Líneas de *Drosophila* utilizadas

Genotipo	Procedencia	Observaciones
<i>w</i> ¹¹¹⁸	Bloomington Stock Center	
<i>shn</i> ⁴⁷³⁸	Markus Affolter (Basel University)	Mutante nulo en <i>shn</i>
<i>pdf</i> ^{f01}	Paul Taghert (Washington Univ)	Fondo genético <i>y w</i>
<i>pdfGAL4</i>	Bloomington Stock Center	Altos niveles de expresión
<i>timGAL4</i>	Bloomington Stock Center	Altos niveles de expresión
<i>perGAL4</i>	Bloomington Stock Center	Bajos niveles de expresión
<i>pdfGAL80</i>	Michael Rosbash (Brandeis University)	
<i>tubGAL80</i> ^{ts}	Bloomington Stock Center	crIII
<i>heatshockGAL4</i>	Bloomington Stock Center	crII
UAS <i>dicer2</i>	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center	Dos líneas, crII y crIII
UAS <i>gfpn</i>	Ben-Zion Shilo (Weizmann Institute)	crIII, obtenida por medio del Dr. Wappner
UAS <i>cd8gfp</i>	Liqun Luo (Stanford University)	
UAS <i>myrrfp</i>	Henry Chang (Purdue University)	

UAS <i>cd8rfp</i>	Bloomington Stock Center	
UAS <i>brpgfp</i>	Eric Buchner (University Wuerzburg, Alemania)	
UAS <i>shn</i>	Markus Affolter (Basel University)	Dos líneas, crII y crIII
UAS <i>tkv</i> ^{QD}	Kristy Wharthon (Brown University)	
UAS <i>sax</i> ^A	Kristy Wharthon (Brown University)	
UAS <i>limk1</i>	Bloomington Stock Center	Línea 9116, la versión silvestre de la quinasa
UAS <i>per</i>	Amita Sehgal (University of Pennsylvania)	
UAS <i>tim</i>	Amita Sehgal (University of Pennsylvania)	
UAS <i>sgg</i>	Bloomington Stock Center (Martinek et al. 2001)	crX
UAS <i>vri</i>	Justin Blau (NYU)	
UAS <i>clk</i>	Ravi Allada (Northwestern University)	
<i>clkG</i>	Michael Rosbash (Brandeis Univ)	Transgen con todo el locus de <i>clock</i>
<i>perG</i>	Paul Hardin (Texas A&M)	Transgen con todo el locus de <i>period</i>
<i>timLuc</i>	Ralph Stanewsky (Queen Mary University of London)	
<i>perLuc</i>	Ralph Stanewsky (Queen Mary University of London)	Es la línea denominada BGluc
UAS ARNi <i>wit</i>	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center	crIII
UAS ARNi <i>sax</i>	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center	crIII
UAS ARNi <i>tkv</i>	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center	crIII
UAS ARNi <i>mad</i>	Bloomington Stock Center y VDRC	
UAS ARNi <i>shn</i>	Bloomington Stock Center	
UAS ARNi <i>sgg</i>	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center	
UAS ARNi <i>med</i>	Bloomington Stock Center y VDRC	
UAS ARNi <i>limk1</i>	Bloomington Stock Center	
<i>pdfGAL4</i> , UAS <i>dicer2</i>	Generada en el laboratorio	Línea recombinante
<i>timGAL4</i> , <i>pdfGAL80</i> ^{TS}	Generada en el laboratorio	Línea recombinante
<i>timGAL4</i> , UAS <i>dicer2</i>	Generada en el laboratorio	Línea recombinante
<i>pdfGAL4</i> , 756	Generada en el laboratorio	Línea recombinante
dBw	Generada en el laboratorio	Línea doble balanceadora, en fondo genético <i>w</i> ¹¹¹⁸

El sistema GAL4/UAS

Esta es probablemente la herramienta más ampliamente utilizada por los laboratorios que utilizan *Drosophila* como sistema modelo. Este sistema heterólogo (proveniente 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 and Perrimon, 1993) (Figura 10).

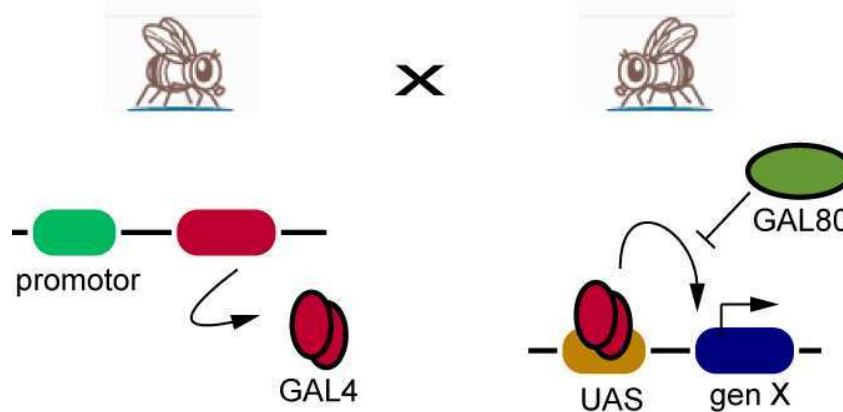


Figura 10. Sistema GAL4-UAS. Se muestra un esquema del funcionamiento del sistema de expresión heteróloga por excelencia de *Drosophila*. Dos líneas transgénicas, una portando una construcción que alberga un promotor particular controlando la expresión del factor de transcripción GAL4, y otra cuya construcción porta la secuencia UAS controlando un gen de interés, se cruzan para obtener en la progenie moscas que expresen el gen de interés en el patrón espacial y temporal del promotor utilizado.

En términos generales, este sistema se basa en la utilización de dos tipos de cepas de moscas transgénicas. Una cepa de moscas que expresa el factor de transcripción GAL4 bajo un promotor específico de tejido (P) es cruzada con otra que posee un gen X controlado por la secuencia UAS (por ejemplo, UAS-GFP). El resultado es que sólo en aquellos individuos de la progenie que posean ambos elementos se expresará el gen X bajo el promotor P. La nomenclatura abreviada utilizada en esta tesis fue $pG4 > x$. A lo largo de esta tesis se utilizaron múltiples líneas GAL4 y UAS para expresar transgenes y ARNs de interferencia.

A este sistema también se ha incorporado la utilización del inhibidor de GAL4, GAL80 (Ma and Ptashne, 1987), también proveniente de levaduras (Figura 10). Esto permite restringir la función de GAL4 en el patrón de expresión que determine el promotor utilizado para expresar a GAL80.

Cromosomas balanceadores

Una de las herramientas más útiles del repertorio disponible para estudios genéticos en *Drosophila* son los cromosomas balanceadores, ya que impiden la recombinación entre cromátidas hermanas. Estos cromosomas están formados por múltiples inversiones y

translocaciones, lo cual evita el entrecruzamiento entre cromosomas homólogos. Cuando además poseen mutaciones que les atribuyen marcadores fenotípicos dominantes son sumamente útiles para el análisis de segregación en la progenie y la construcción de genotipos definidos. Los cromosomas balanceadores pueden, además, llevar marcadores moleculares (como los genes LacZ o GFP) que permiten su identificación por tinción directa u observación al microscopio de fluorescencia.

Estos cromosomas poseen mutaciones letales recesivas, lo que impide que en la progenie se obtengan individuos homocigotas para el balanceador. La ventaja de esto es que permite la construcción y el mantenimiento de líneas que portan mutaciones que son letales en homocigosis, asegurando que las mismas se mantengan de generación en generación.

En el transcurso de esta tesis se utilizaron los cromosomas balanceadores CyO (crII), TM6 (crIII) y TM3 (crIII). En particular, se utilizó la línea dBw (doble balanceador en fondo genético w^{1118}), que posee los balanceadores CyO y TM3 como complemento cromosómico de una fusión entre el segundo y tercer cromosoma denominada ES. Esta fusión no es un balanceador ya que no impide la recombinación en algunas regiones de los cromosomas II y III.

Líneas recombinantes

Debido a que *Drosophila* cuenta sólo con 4 cromosomas, de los cuales uno está ligado al sexo y otro es muy pequeño, la utilidad de generar líneas recombinantes consiste en que se puede tener en un mismo cromosoma dos (o más) construcciones de interés. Esto permite, por ejemplo, analizarlas en combinación con otras construcciones o con mutaciones presentes en otros cromosomas. En *Drosophila* la recombinación meiótica ocurre únicamente en las gametas femeninas por lo que para generar líneas recombinantes se parte de hembras transheterocigotas para los dos elementos a recombinar, para luego cruzarlas con machos que aporten un cromosoma balanceador para el cromosoma de interés. De la progenie se recuperan machos individuales balanceados en los que se analiza la presencia de ambas construcciones a recombinar. Para los experimentos de esta tesis se utilizaron las líneas recombinantes detalladas más arriba. La generación de estas líneas permitió analizar a nivel comportamental y morfológico animales genéticamente modificados con un alto número de elementos transponibles utilizando un esquema de cruzamientos sencillo.

Análisis del comportamiento circadiano

Análisis automatizado de la actividad locomotora

El monitoreo automatizado de la actividad locomotora se llevó a cabo colocando a las moscas individualmente en tubos pyrex de 0,3 cm de diámetro interno y éstos a su vez en una de las 32 posiciones que poseen los equipos de monitoreo. Cada posición se encuentra flanqueada por un emisor y detector de luz infrarroja (Figura 11). La luz infrarroja no afecta el patrón de comportamiento estudiado, ya que tanto el sistema visual como el sistema circadiano de *Drosophila* son insensibles a la luz de longitud de onda entre 850 y 950 nm. Los monitores fueron conectados a una computadora que adquiere los datos de cada canal (32 por monitor) en intervalos predeterminados (usualmente 30 minutos) y colocados en incubadoras capaces de controlar las condiciones de luz y temperatura.

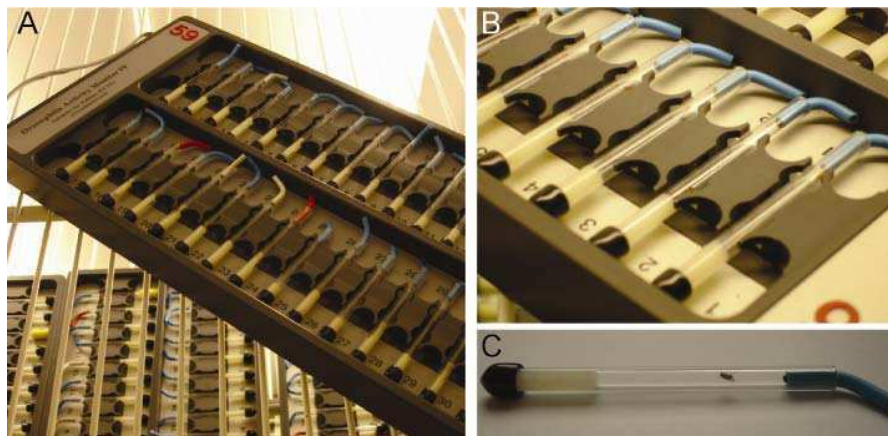


Figura 11. Monitor de registro automatizado de la actividad locomotora. (A) Se muestra un monitor cargado en sus 32 posiciones con tubos conteniendo comida en un extremo, una mosca y un tapón en el otro extremo. (B) En cada posición del monitor la actividad es registrada con un emisor y un detector de luz infrarroja; el desplazamiento de las moscas dentro del tubo interrumpe el haz de luz; cada interrupción es contabilizada como un evento. (C) Una mosca colocada en el tubo y lista para ser montada en el monitor de registro.

Cada desplazamiento de la mosca hacia o desde la comida interrumpe el haz de luz y se considera un “movimiento”. Periódicamente estos datos fueron adquiridos por una computadora conectada al sistema de adquisición de datos. Los datos se visualizaron utilizando una aplicación comercial, ClockLab, a través del programa Matlab. ClockLab permite seguir individualmente el patrón de actividad de cada individuo al generar

actogramas y calcular el período asociado a través de periodogramas. Asimismo, este programa cuenta con un paquete estadístico que permite validar cada observación con un cálculo de probabilidad asociada (Figura 12).

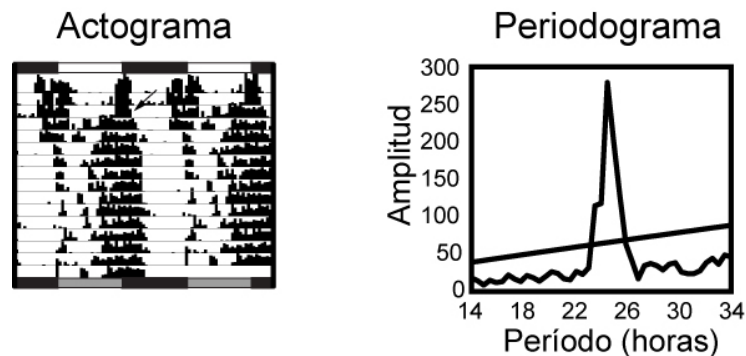


Figura 12. Actograma y periodograma de una mosca silvestre. A través de Clocklab es posible evaluar el comportamiento locomotor circadiano, determinando ritmicidad y periodicidad. En el actograma, la flecha indica el momento de pasaje a oscuridad constante; las barras blancas y grises indican los días y días subjetivos, respectivamente, y las barras negras indican oscuridad. En el periodograma la barra diagonal indica la línea de corte para una significancia de 0,05 en la determinación del período.

Para este tipo de experimentos las moscas se sincronizaron a un ciclo de 12 hs luz: 12 hs oscuridad por espacio de 4 días y usualmente a 25°C (en caso contrario se indica en la descripción de la figura correspondiente), en lo que se determina como fase de entrenamiento o sincronización. Al 5^{to} día los animales se transfieren a oscuridad constante entrando en lo que se determina como fase de libre curso.

Del análisis del comportamiento desplegado por cada individuo es posible definir distintos comportamientos (Figura 13):

Rítmico: cuando los datos se ajustan a una función con un período de una sola frecuencia (entre 14 y 34h).

Arrítmico: cuando los datos no se ajustan a ninguna función periódica.

Débilmente Rítmico: cuando existe uno o más componentes rítmicos pero la probabilidad asociada a esta determinación es cercana a $p=0,05$.

Ritmos Complejos: cuando existe más de un componente rítmico con una probabilidad asociada superior a $p=0,05$.

Diferentes patrones de comportamiento de una mosca se ejemplifican en la Figura 13, en donde se muestra un actograma representativo de individuos silvestres de la cepa w^{1118} , un actograma representativo de individuos arrítmicos (nulo para un componente del reloj), un actograma débilmente rítmico y un actograma que muestra ritmos complejos.

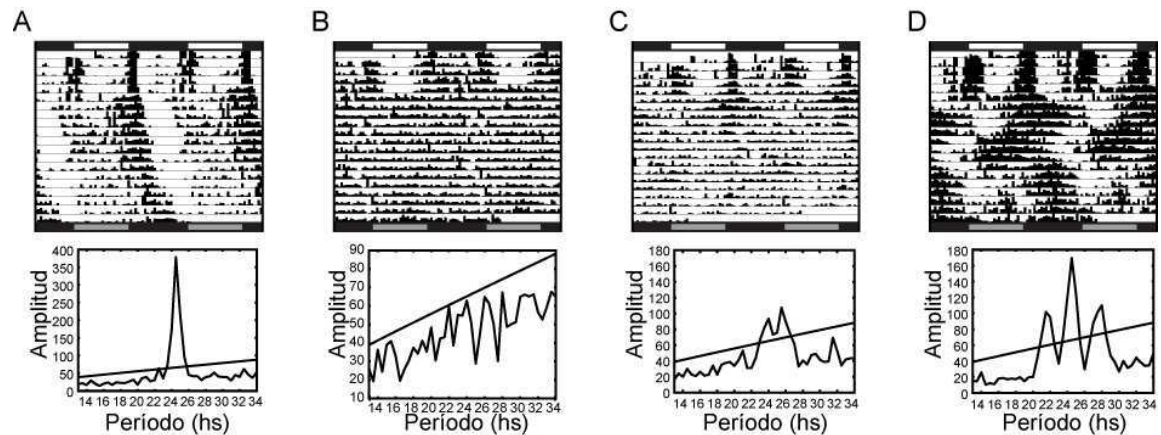


Figura 13. Categorización de patrones comportamentales. Se muestran actogramas y periodogramas representativos de las cuatro categorías comportamentales definidas a lo largo de la tesis. (A) Una mosca silvestre w^{1118} ; (B) un ejemplo de animal arrítmico (nulo para un componente del reloj); (C) un animal débilmente rítmico en el que se observa la desconsolidación de la actividad locomotora con elevados niveles de actividad durante la noche subjetiva; (D) un animal que presenta ritmos complejos caracterizados por tres componentes de período, corto, largo y silvestre. Los registros mostrados corresponden a experimentos inusualmente largos con el objetivo de poder visualizar con facilidad las componentes de período presentes en D.

Cálculo del período de la actividad locomotora

Una vez adquiridos los datos de la actividad locomotora, los periodogramas se evalúan utilizando ClockLab. Para cada individuo se determina si presentó un comportamiento rítmico teniendo en cuenta 8 días de oscuridad constante (el primer día de curso libre no se utiliza para el análisis debido a que pueden existir aun procesos fisiológicos gobernados por la última transición de luz a oscuridad). Obtenidos los períodos, se utiliza el programa GraphPad Prism, Excel y/o InfoStat para el cálculo de los períodos promedios, realización de gráficos y los respectivos análisis estadísticos.

Análisis de la relación de cantidad actividad entre el día y la noche subjetiva

Con el objetivo de analizar en mayor profundidad los fenotipos de falta de consolidación de la actividad locomotora en el laboratorio se ha establecido un índice capaz de describir este tipo de comportamiento. Este índice es la relación entre la actividad locomotora total del día y la noche subjetiva (es decir, en la fase de oscuridad constante). Para construir el índice se suma la actividad total de cada porción del día a lo largo de todos los días de oscuridad constante para cada animal. Se obtiene la relación entre día y noche subjetiva para cada individuo y se promedia el valor de todos los individuos de un dado genotipo.

Este tipo de análisis sólo es correcto en genotipos que presentan un período endógeno cercano a 24hs debido a que si no fuera éste el caso se estarían asignando

incorrectamente porciones de los días y noche subjetivas, sobre todo luego de varios días de curso libre.

Análisis automatizado de la ecdisis de imagos (eclosión)

Dado el gran número de animales que se necesitan para evaluar este comportamiento (alrededor de 800) los cruzamientos destinados a obtener los genotipos evaluados en este paradigma se realizan en botellas de 250 ml conteniendo medio normal y agregando una punta de espátula de levadura hidratada para estimular la ovipuesta. Las botellas se sincronizan en ciclos de 12 hs luz: 12 hs oscuridad a 20°C. Esta temperatura genera una dispersión mayor en el tiempo de desarrollo y hace que las hembras ovipongan con menor frecuencia respecto de lo que ocurre a 25°C, dando así la posibilidad de analizar durante más días el comportamiento de eclosión. Larvas de tercer estadio y pupas de todos los estadios se colocan en las platinas de los monitores de eclosión (Trikinetics, Waltham, MA) sobre cinta adhesiva de doble faz durante el último día de entrenamiento (Figura 5).

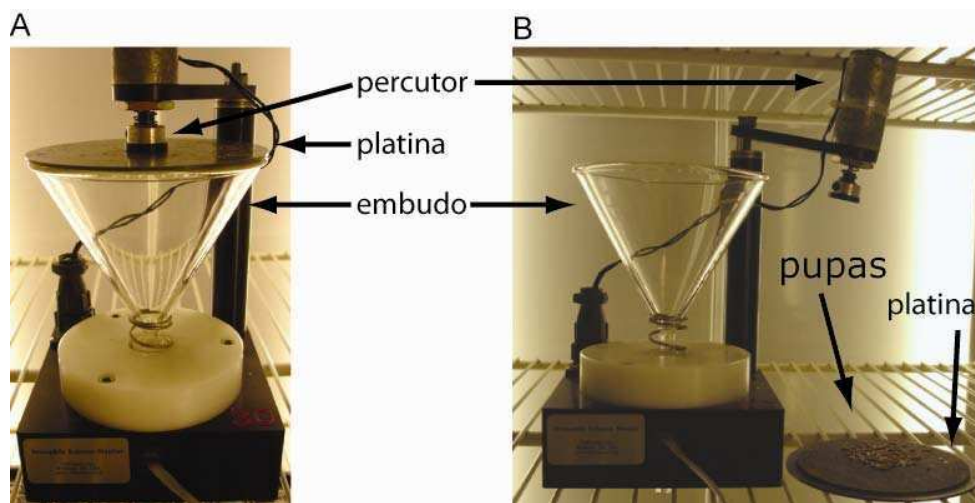


Figura 14. Monitor de registro automatizado de la ecdisis del imago (eclosión). (A) Se muestra un monitor de registro preparado para medir. Con las moscas cargadas en la platina el percutor se activa cada 5 minutos, de modo de empujar levemente en su caída a las moscas emergidas en ese período a través del cuello del embudo donde se encuentra el sensor. La interrupción del haz de luz infrarroja permite contabilizar el número de individuos eclosionados en cada momento del día. (B) Se muestra el monitor desarmado y en la platina se observan las pupas preparadas para ser colocadas en el monitor.

A partir de ese momento el registro del patrón de eclosión de la población es monitoreado en condiciones constantes de luz (oscuridad) y temperatura (20°C), mediante un sistema de haz infrarrojo similar al utilizado en los monitores de actividad locomotora. En el 4^{to}

día de oscuridad constante las platinas (ya sin moscas por eclosionar) son reemplazadas por nuevas platinas cargadas bajo luz roja con larvas y pupas que también se encontraban en su 4to día de oscuridad constante. Este reemplazo de discos permite obtener registros prolongados (8 a 9 días) de la actividad de la población permitiendo así observar potenciales diferencias en el período endógeno de la eclosión.

Los datos obtenidos se analizan mediante ClockLab que asigna un periodograma a cada uno de los registros en forma idéntica al análisis de los registros provenientes de actividad locomotora individual.

Biología molecular

Rescate del elemento transponible en la línea 756

El protocolo de rescate de ADN plásmidico se tomó de *Drosophila* Protocols (Sullivan et al., 2000). Se juntan 15 moscas anestesiadas en un tubo de 1,5 ml y se las mantiene en hielo. Luego se homogeneizan las moscas en 100 µl de Buffer A (100 mM Tris-Cl (pH 7,5), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS), a los que se le agregan otros 100 µl de Buffer A, para continuar la ruptura del tejido. A continuación las muestras se incuban a 65 °C por 30 minutos, y luego se agregan 200µl de Buffer B (200 ml de AcK 5 M, 500 ml de LiCl 6M), mezclando por inversión, y se incuba en hielo por 10 minutos. Luego se centrifuga a 12000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo al que se agregan 600 µl de isopropanol y se mezcla por inversión. Se centrifuga a 12000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos y se descarta el sobrenadante. El pellet se lava con EtOH 70%, se deja secar al aire y se resuspende en 150 µl de H₂O. Para garantizar una mayor pureza de la extracción se realiza una extracción orgánica con 25:24:1 volúmenes de fenol:cloroformo:isoamílico, seguido por un paso de precipitación. El ADN precipitado se resuspende en 100 µl de H₂O de máxima calidad. El ADN se guarda a -20 °C.

Una fracción de 10 µl del ADN obtenido se corta con la enzima de restricción Sac I (New England BioLabs), la cual corta sólo una vez sobre el transposón; esto se hace en presencia de ARNasa y en un volumen final de 25 µl. Las digestiones se incuban a 37 °C por 16 hs. Luego se inactiva la enzima de restricción por calor. Se analizan 5 µl de la digestión en un gel de agarosa para corroborar la efectividad de la misma. Unos 10 µl del ADN genómico digerido se liga con la T4 ADN Ligasa (Invitrogen) en un volumen final de 400 µl, a 4 °C y durante 16hs. Para precipitar el ADN se agregan 40 µl de 3 M NaAc (pH 5.2) y 1 ml de EtOH absoluto. Se mezcla por inversión e incuba a -20 °C por dos horas.

Luego se centrifuga a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante, se lava el pellet con EtOH 70% y se deja secar al aire. Finalmente, se resuspende en 10 µl de H₂O estéril. Una parte (2µl) del material ligado se electropora en bacterias electro-competentes (Jacobsson et al., 2003), que se plaquean en medio sólido LB conteniendo kanamicina (el plásmido que se genera a partir del transposón contiene la resistencia a este antibiótico). Los plásmidos recuperados se secuencian utilizando el primer *Spep1*, el cual se posiciona en el extremo 3' del transposón EP y permite conocer la secuencia aledaña al sitio de inserción (Figura 20). Con el resultado de la secuenciación se realizó un *megablast* contra el genoma de *Drosophila melanogaster* utilizando las herramientas disponibles en www.flybase.org (financiado por el National Institute of Health de Estados Unidos), identificando así el sitio y sentido de la inserción del elemento transponible en el genoma de la línea analizada.

Oligonucleótidos utilizados

Número	Oligonucleótido	Secuencia
1	<i>spep1</i>	GAC ACT CAG AAT ACT ATT C
2	<i>shn A/D F2</i>	TTC ACG CAA GAG TGC TTT GGA AAC G
3	<i>shn B F1</i>	CGG GCC GCA ATA TCT CTC AGA TTA GT
4	<i>shn C F1</i>	TTC GAT TTC TTG CTA TTC GCG CCG
5	<i>shn D F1</i>	AAC GGG ACA CCA ACT TTG AAG CAG
6	<i>shn F1E8</i>	GTG CAG CAA CCG GAT GTC AAT GAA
7	<i>shn R3</i>	GGC ACG TCG CGT ATT GTT CAC TTT
8	<i>actina F</i>	GAG CGC GGT TAC AGC TTC AC
9	<i>actina R</i>	ACT CTT GCT TCG AGA TCC ACA
10	<i>n-syb F</i>	GGC TTC AGA ACT TAA AGA TGA
11	<i>n-syb R</i>	CAC TAA TCG AGA AAC TTT CGT
12	<i>rpl49 F</i>	GAA CAA GAA GGC CCA TCG TA
13	<i>rpl49 R</i>	AGT AAC AGG CTT RGG CTT GC
14	<i>tub F</i>	GCC TGA ACA TAG CGG TGA AC
15	<i>tub R</i>	ATC CCC AAC AAC GTG AAG AC
16	<i>pdf F</i>	GCC ACT CTC TGT CGC TAT CC
17	<i>pdf R</i>	CAG TGG TGG GTC GTC CTA AT

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 1 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,2 µM de oligonucleótidos, buffer de PCR 1X (Invitrogen) y Taq polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 50 µl o 20 µl. Las condiciones de cada reacción fueron puestas a punto en cada caso, partiendo de las recomendaciones de las empresas proveedoras de oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies) y enzimas.

Extracción de RNA

Para la preparación de ARNm se utiliza el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se parte de 30 o 40 cabezas de moscas adultas, se utilizan 200µl de TRIzol y se resuspende el ARN en 20 µl de H₂O calidad ARN (Water – Molecular Laboratory Reagent - SIGMA).

Para confirmar la calidad de la preparación se corren geles de agarosa analíticos (al 1,2%) de modo de observar las bandas características de los ARN ribosomales de *Drosophila*. La cuantificación de las muestras se realiza mediante el NanoDrop (Thermo), midiendo a 230, 260 y 280nm. Para determinar la calidad de ARN obtenido se utilizaron las relaciones 260/280 y 260/230, considerándose aceptables en el rango de 1,6 a 2,0 para la primera relación y de 0,5 a 1,2 para la segunda.

Obtención de ADNc (RT)

Partiendo de 1 µg de ARN total, de los cuales se eliminan las trazas de ADN mediante la digestión con DNasa I (Invitrogen), se procede a realizar la reacción de retrotranscripción utilizando oligonucleótidos oligo-(dT)12-18 (Invitrogen) y la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo las directivas del fabricante.

PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR realizadas para evaluar la abundancia relativa de ARNm se llevaron a cabo en el equipo Mx3005P (Stratagene).

Para las determinaciones de niveles de ARNm de *schnurri*, durante la caracterización inicial de la cepa obtenida a partir de relevamiento genético, las reacciones se llevaron adelante sin emplear un kit comercial. Las reacciones se realizaron en 25 µl finales, utilizando SYBRGreen como intercalante, ROX como fluoróforo de referencia y PlatinumTaq (Invitrogen) como polimerasa. La puesta a punto de las reacciones se realizó de modo de obtener eficiencias de amplificación de $100 \pm 10\%$ y se utilizó el método de cuantificación conocido como $\Delta\Delta C_t$ (AppliedBiosystems, 2008; Pfaffl, 2001). Los genes normalizadores utilizados en estos experimentos fueron *actina* y *tubulina*, *n-syb* y/o *rpl49*.

Análisis inmunohistológicos

Inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas

Las moscas son decapitadas en buffer fosfato con detergente (PT, PBS 0,1% Tritón X-100) utilizando pinzas de disección nº5 (Dumont) bajo una lupa (Leica CLS 100X). Una vez decapitadas, las cabezas se transfirieren a solución de fijación (paraformaldehído 4%, 0,1M PB) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, las cabezas se enjuagan en PT y se disecan en PT utilizando pinzas de disección y bajo lupa. Las disecciones se realizan sobre placas de SYLGARD 184 (Dow Corning), bajo una fuente de luz fría. Una vez disecados los cerebros se lavan con 3 enjuagues de PT de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con el objetivo de eliminar los restos de fijador. A continuación se bloquean durante una hora con suero normal de cabra 7% en PT.

Los cerebros se incuban con los anticuerpos primarios a 4°C. El tiempo de incubación con el anticuerpo primario varía según cada caso, siendo el tiempo estándar 16 horas. Posteriormente se realizan 3 lavados con PT en agitación suave, de 15 minutos cada uno. A continuación se agregan los anticuerpos secundarios diluidos en PT (habitualmente 1:250) y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. En los casos en los que el anticuerpo primario genera una gran cantidad de señal inespecífica, se incuban tanto el anticuerpo primario como el secundario con 7% de suero normal de cabra. Luego de remover el/los anticuerpos secundarios los cerebros se lavan mediante 3 enjuagues en PT de 15 minutos cada uno en tubos cubiertos por papel de aluminio. Finalmente, los cerebros se montan (este paso se realiza con la menor cantidad de luz ambiental posible ya que los anticuerpos conjugados a compuestos fluorescentes son fotosensibles) en portaobjetos de 25 x 76 mm (Tecnon) en aproximadamente 20 µl de una solución conteniendo 80% de glicerol en PT y se cubren con cubreobjetos. Los cerebros se colocan en el centro de un cuadrado realizado con esmalte de uñas y luego de cubrirse con un cubreobjetos de 24 mm de lado se sellan con el mismo esmalte.

Anticuerpos

Anticuerpos primarios:

IgG anti PER (policlonal, en conejo) 1:500. Donado por el laboratorio de Ralf Stanewsky (Queens Colleague, London, UK).

IgG anti PDF (policlonal, en rata) 1:500, generado en el laboratorio.

IgG anti PDF (policlonal, en conejo) 1:1000. Generado por NeMPs (Francia) a pedido del laboratorio.

IgG anti GFP (policlonal en conejo), 1:500. Disponible en Invitrogen Technologies (USA).

IgG anti GFP (policlonal, en pollo) 1:500. Disponible en Upstate Technologies (USA).

IgG anti RFP (policlonal en conejo). 1:1000. Disponible en Rockland (USA).

Anticuerpos secundarios:

Todos los anticuerpos secundarios utilizados provienen de Jackson ImmunoResearch (USA). Se utilizan en una dilución de 1:250 en PT y se incuban durante 2 hs a temperatura ambiente.

IgG anti conejo: Cy2 Cy3 y Cy5.

IgG anti pollo: Cy2.

IgG anti rata: Cy3 y Cy5.

Microscopía y procesamiento de imágenes

Las imágenes de esta tesis fueron obtenidas en dos microscopio confocales Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, NJ); en particular, en un Pascal y Meta 510. El *pinhole* utilizado es siempre de 1 unidad *airy*.

Las imágenes individuales o galerías se procesan utilizando el programa ImageJ y se guardan como extensión TIFF de modo de preservar las imágenes con la mayor calidad posible. En los casos en los que, luego de las cuantificaciones, se realizaron protocolos de filtrado de las imágenes, estos siempre se realizaron a la totalidad de la imagen y a todas las imágenes que se muestran con la intención de comparación. Para el armado de figuras con múltiples paneles se utilizaron los programas Adobe Illustrator o Adobe Photoshop, en los cuales no se ha realizado procesamiento de las imágenes más que recortar o escalar las imágenes al tamaño mostrado.

Curvas de tiempo

Para la realización de curvas de tiempo destinadas a análisis inmunohistológicos en la fase de oscuridad constante las muestras fueron obtenidas en oscuridad y trabajando bajo luz roja, la cual es imperceptible para el sistema visual y el sistema circadiano de las moscas.

Las reacciones de inmunomarcación fueron desarrolladas de igual modo a las descriptas más arriba.

Para cuantificar la intensidad y localización subcelular de PER en las neuronas laterales ventrales pequeñas se adquieren imágenes confocales de 1 μm de grosor, seleccionando el plano donde el tamaño nuclear es máximo. La cuantificación se realiza a partir de un

solo plano utilizando el software Image J. Para cada una de las neuronas individualizables de cada cerebro se determina manualmente el perímetro alrededor del núcleo delimitado por la señal de GFPn y el perímetro del citoplasma delimitado por la señal del neuropéptido PDF. Definidos los compartimentos celulares se obtiene la intensidad promedio de la señal de PER (pixels/área) para cada uno. Con el objetivo de reducir las diferencias de intensidades absolutas entre experimentos, cada valor de intensidad se normaliza respecto del valor máximo dentro de un mismo experimento. Luego de la normalización se promedian 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. Sólo se consideraron cerebros en los que entre 2 y 4 neuronas fuesen cuantificables.

Análisis de la longitud del circuito PDF

Con el objetivo de cuantificar la extensión de los procesos PDF positivos se adaptó el método de Sholl (Sholl, 1953), originalmente diseñado para la caracterización de los árboles dendríticos de neuronas en cultivo. Para esto se utiliza el programa ImagenJ y se realizan proyecciones 2-D de las galerías de imágenes obtenidas por microscopía confocal las cuales incluyen la totalidad de las proyecciones en las que se detecta señal de GFP o RFP en cada uno de los cerebros. Sobre estas imágenes se ubican siete círculos concéntricos espaciados entre sí por una distancia de 10 μm , cuyo centro fue ubicado en el primer nodo de ramificación. La localización del centro de los anillos concéntricos es sencilla ya que los axones de las sLNvs presentan una anatomía muy consistente; permanecen fasciculados hasta un punto del protocerebro dorsal (conocido como " *lateral horn*") donde se desfasciulan y el árbol axonal se abre. Para cada cerebro se determina cuál es el último círculo alcanzado por la proyección. El valor obtenido para cada genotipo es la media para todos los cerebros analizados en cada uno de los puntos. Se analizan 10 cerebros para cada genotipo y cada punto, repitiéndose este análisis en tres muestras independientes.

Cuantificación de partículas BRP positivas

Para estimar el número de zonas activas de transmisión neuroquímica se utilizó la localización de la proteína *bruchpilot* (*brp*) fusionada a GFP. Obtenida las galerías de secciones confocales se realizan proyecciones 2-D utilizando el programa ImageJ. Con el mismo programa se delimita el área que contiene el circuito PDF más allá del nodo de ramificación de las proyecciones dorsales, utilizando para esto la marca de membrana provista por la proteína CD8RFP. A partir de la selección se elimina el resto de la imagen

con el objetivo de minimizar la sobrestimación de partículas positivas producida por el *background*. Obtenido el recorte de la proyección y siempre con el programa ImageJ se aplica un filtro de alisado para definir más claramente las partículas positivas, se aplica una máscara que define las partículas positivas y se utiliza la herramienta “Analyse Particles” para contar el número de partículas y evaluar sus dimensiones. Se consideró como partículas BRP positivas a toda aquella señal con un diámetro mayor a $0,1\mu\text{m}$.

Ensayo de actividad de luciferasa

Para evaluar la actividad de luciferasa en extractos de cabezas de moscas se utilizaron 30 moscas adultas de cada uno de los genotipos analizados y se utilizó parte del sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega). El protocolo que se llevo a cabo se basó en el utilizado por Maitra et. al. (2002) y el protocolo provisto por la empresa proveedora del sistema de medición de luciferasa. Una vez obtenidas las moscas adultas de entre 5 a 8 días de eclosionadas se las anestesió por enfriamiento y se las decapitó en $500\mu\text{l}$ de buffer de homogenización (1X Passive Lysis Buffer –PLB-). Las cabezas fueron homogeneizadas en $200\mu\text{l}$ de PLB y el extracto centrifugado a 10000 rpm y 4°C de modo de separar la porción soluble de la insoluble. Se tomó el sobrenadante y se repitió la operación en una segunda oportunidad. 30ml del extracto fueron incubados con 100ml de LARII (reactivo que contienen el sustrato *luciferina*) en placa de 96 pocillos blanca y de fondo plano por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego de esto se prosiguió a medir la bioluminiscencia en el lector Veritas Microplate Luminometer (Turner BioSystems). Las mediciones de luciferasa fueron normalizadas por la absorbancia a 280 de cada una de las muestras, utilizando un NanoDrop (Thermo).

Medición de los niveles de GFP en las sLNVs

Para cuantificar la intensidad de GFP en el núcleo de las neuronas laterales ventrales pequeñas se adquieren imágenes confocales de $1\mu\text{m}$ de grosor, seleccionando el plano donde el tamaño nuclear es máximo. La cuantificación se realiza a partir de un solo plano utilizando el software Image J. Para cada una de las neuronas individualizables de cada cerebro se determina manualmente el perímetro alrededor del núcleo delimitado por la señal de GFPn. Definido el compartimento celular se obtiene la intensidad promedio de la señal de GFP (pixels/área) para el núcleo. Con el objetivo de reducir las diferencias de intensidades absolutas entre experimentos, cada valor de intensidad se normaliza respecto del valor máximo dentro de un mismo experimento. Luego de la normalización se promedian todas las células de un mismo cerebro. El valor obtenido para cada

genotipo es la media para todos los cerebros analizados. Sólo se consideraron cerebros en los que entre 2 y 4 neuronas fuesen cuantificables

Resultados

Identificación de un mutante circadiano

Un relevamiento genético diseñado para encontrar nuevos componentes del sistema circadiano

Muchos son los esfuerzos por desentrañar el funcionamiento del reloj circadiano, y diversas estrategias han conducido a forjar el conocimiento que hoy tenemos sobre este proceso biológico. El Laboratorio de Genética del Comportamiento ha llevado adelante un enfoque original con el objetivo de contribuir en esta dirección. La estrategia seleccionada se enmarcó en lo que se conoce como genética directa (en inglés *forward genetics*), que en términos generales consiste en la generación de mutaciones al azar en una población, obteniendo así individuos potencialmente diferentes los cuales son evaluados para un fenotipo relevante. Una vez identificados los individuos con un fenotipo distinto del que muestran los individuos silvestres originales, se determina cual es el gen afectado por la mutación, infiriéndose que ese gen está vinculado al fenotipo evaluado (St Johnston, 2002). La estrategia de genética directa puede ser pensada como la contracara de la conocida como genética reversa (en inglés *reverse genetics*), que trata de manipular genes previamente determinados con el fin de conocer sus funciones.

El relevamiento genético que se realizó en el laboratorio se basó en la desregulación de la expresión génica en el circuito PDF y para esto se utilizó el sistema GAL4/UAS. La evaluación de los mutantes se realizó en un paradigma de actividad locomotora ampliamente utilizado (Rosato and Kyriacou, 2006).

Generación de una colección de individuos mutantes

Para establecer la población de mutantes se partió de una cepa portadora de un transposón de tipo EP que contiene un tandem repetitivo de catorce secuencias UAS (Rorth, 1996) y, por trasposición controlada utilizando la transposasa $\Delta 2-3$ (Robertson et al., 1988), se obtuvo una colección de algo más de 1000 nuevas líneas de moscas (Figura 15). Cada una de estas moscas contiene una copia del transposón el cual está localizado, potencialmente, en un lugar diferente del genoma, y constituyen la colección de mutantes.

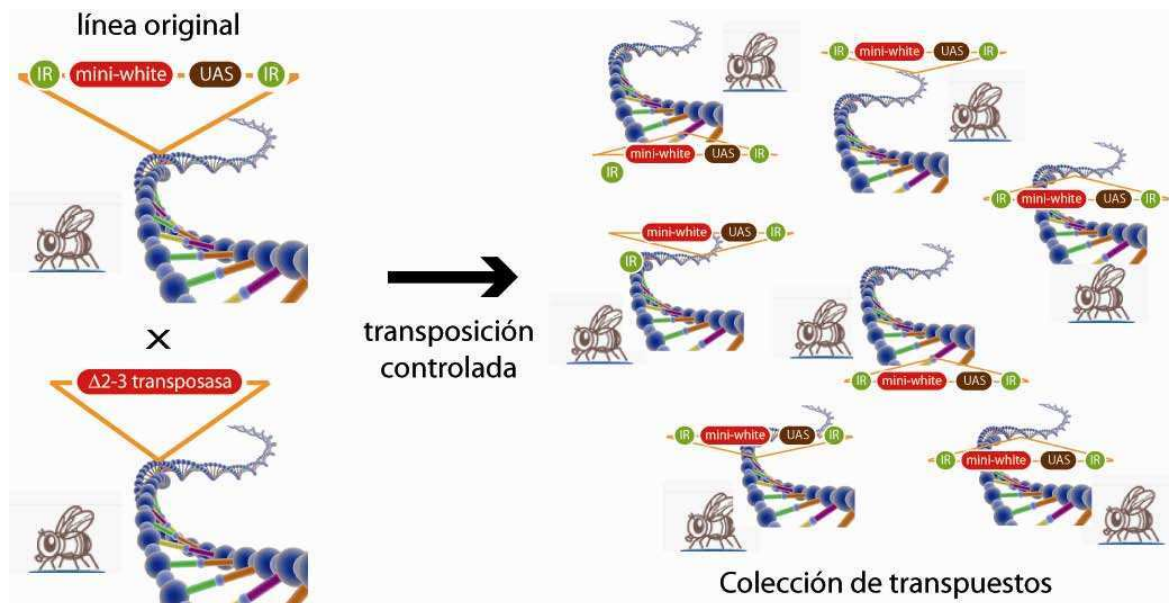


Figura 15. Generación de una colección de mutantes. El esquema representa el concepto básico de la estrategia seguida para generar la colección de moscas para el rastillaje genético, una línea original con el transposón EP fue cruzada por una fuente de transposasa y se aislaron alrededor de 1000 nuevas inserciones.

Si bien cada inserción puede tener un efecto *per se*, con el objetivo de encontrar genes involucrados en el funcionamiento del reloj, se procedió a combinar cada uno de los genotipos generados en la colección con una cepa de moscas que alberga un transposón capaz de expresar GAL4 en el patrón espacial y temporal del neuropéptido PDF, es decir, la cepa *pdfGAL4* (Renn et al., 1999). La progenie de este cruzamiento que acarrea ambos elementos genéticos contenía en sus neuronas PDF algún gen desregulado y estos animales fueron evaluados comportamentalmente. La generación de las cepas mutantes y su evaluación comportamental fue una tarea conjunta desarrollada por varios miembros del laboratorio de Genética del Comportamiento a lo largo de los años 2002 a 2006.

La principal ventaja de la estrategia seleccionada respecto a otros relevamientos por genética directa previamente realizados es que permitió identificar genes vinculados al comportamiento rítmico cuya función es vital para el organismo. El desarrollo de los individuos evaluados comportamentalmente ocurre sin inconvenientes debido a que la desregulación ocurre en un grupo muy limitado de neuronas, las cuales son dispensables para la sobrevivencia, y sólo un alelo se encuentra potencialmente afectado por la inserción.

Otra ventaja del sistema seleccionado es que el gen blanco puede sufrir dos tipos de alteraciones, siendo posible que los niveles de expresión aumenten o disminuyan. Dado que el transposón puede insertarse en el genoma en dos direcciones y el elemento UAS es direccional, el aumento transcripcional puede darse sobre la hebra codificante o bien

sobre la hebra antisentido de un gen dado. En el primer caso, el gen afectado se ve sobreexpresado respecto de una condición silvestre, pero si se transcribe la hebra antisentido este ARN origina un ARN de interferencia (ARNi) produciendo una merma en los niveles de expresión (Colombani et al., 2003; Rezaval et al., 2008).

Por otra parte, una potencial limitación de esta estrategia reside en el hecho de que si el fenotipo obtenido es resultado de la sobreexpresión de un gen, este podría no estar endógenamente activo en el circuito PDF. En este caso los fenotipos obtenidos serían producto de una expresión ectópica. Dada esta posibilidad, en la selección del gen a estudiar es importante confirmar su expresión endógena en el circuito PDF.

Evaluación comportamental de los mutantes obtenidos

Como se ha mencionado, la colección de mutantes fue cruzados por *pdfGAL4* y luego evaluada comportamentalmente en el paradigma de actividad locomotora de *Drosophila*. De cada cepa obtenida ocho individuos fueron evaluados durante 13 días, cuatro días en ciclos controlados de 12hs de luz y 12hs de oscuridad y luego nueve días de oscuridad constante; siempre a 25°C.

Para cada individuo se determinó si manifestaba o no un ritmo en su actividad y cuál era el período de esa actividad en condiciones de oscuridad constante, cuantificándose así la ritmicidad y el período endógeno promedio para cada potencial cepa mutante. La Figura 16 resume los resultados del relevamiento genético.

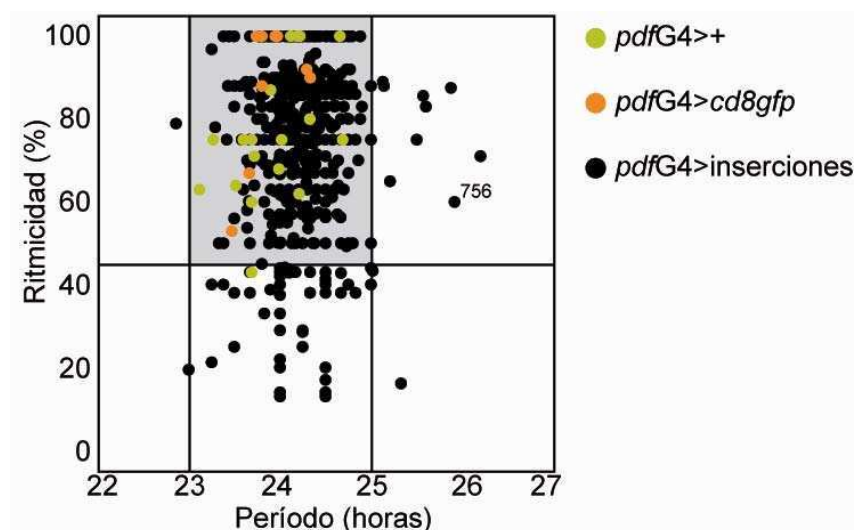


Figura 16. Ritmicidad y período endógeno promedio para cada inserción en el contexto de *pdfG4*. Se muestra la ritmicidad y el período para la totalidad de los genotipos evaluados en el rastillaje genético. Entre estos se destaca la inserción 756 por su largo período y buena ritmicidad.

Es importante destacar que pocas son las cepas que se desvían de un período endógeno de 24hs, mientras que es mayor el número de mutantes que ven reducida su ritmicidad respecto de la que presentan individuos silvestres. Muchos insultos celulares pueden terminar en el malfuncionamiento celular y, debido a la relevancia del circuito PDF en el comportamiento locomotor rítmico, conducir a fenotipos de falta de ritmicidad. Por esta razón se priorizó el estudio de cepas que alterasen el período endógeno, suponiendo que era más probable encontrar genes directamente vinculados con el funcionamiento del reloj circadiano.

La cepa 756 produce un cambio de período en la actividad locomotora

Durante el relevamiento genético llevado a cabo en el laboratorio se detectaron cuatro mutantes independientes que presentaban claras alteraciones de período al ser combinadas con *pdfG4*. Estas líneas fueron la 401, 724, 755 y 756, las cuales fueron re-evaluadas comportamentalmente para confirmar y extender la observación inicial, determinando con precisión la penetrancia del fenotipo, la ritmicidad y el período endógeno. Para esto se evaluaron las inserciones en heterocigosis y en combinación con *pdfG4*. Además, como parte de un rastillaje secundario llevado adelante en el laboratorio, se evaluó la actividad locomotora de individuos envejecidos (Rezaval et al., 2008). Las líneas 724 y 755 presentaron un fenotipo de período largo, mientras que la línea 401 mostró un período corto (Figura 17). En el caso de la línea 755 el fenotipo es dependiente de la presencia de *pdfG4*, mientras que la 401 presenta un fenotipo comportamental tanto en presencia como en ausencia de *pdfG4*, lo cual permitió suponer que el fenotipo no era mediado por la desregulación de su expresión en las sLNvs, sino por la inserción del transposón en el locus endógeno. En cuanto a la inserción 724, esta tuvo la particularidad de mostrar un fenotipo comportamental alterado sólo si se envejecían los animales previamente a su evaluación; este tipo de fenotipos progresivos con la edad puede estar indicando alguna disfunción metabólica o afectar genes relacionados con procesos de envejecimiento (Figura 17).

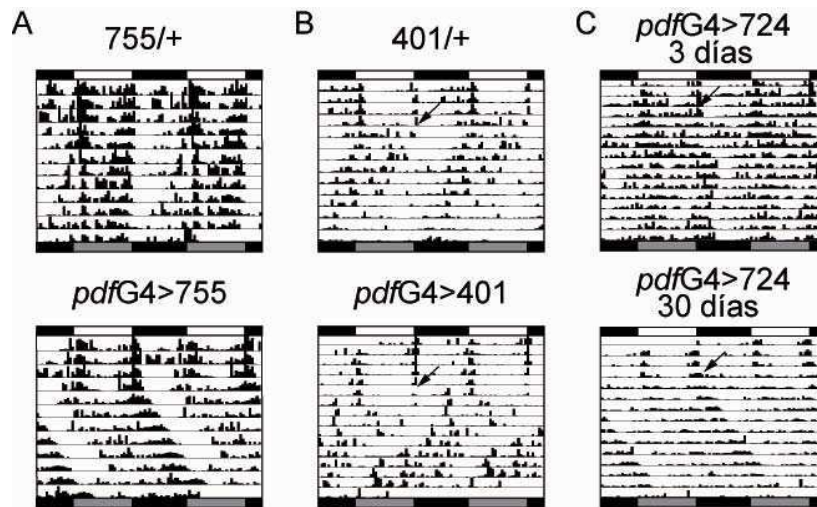


Figura 17. Mutantes circadianos obtenidos en el rastillaje genético. Las inserciones 755, 401 y 724 mostraron, además de la 756, un patrón de actividad locomotora diferente al de animales silvestres. (A) El fenotipo de la línea 755 es dependiente de la presencia del inductor, *pdfG4*. (B) La inserción 401 muestra un fenotipo vinculado a la inserción e independiente de la presencia de *pdfG4*. (C) En el caso de la línea 724 el fenotipo es observable sólo en animales envejecidos.

La cuarta inserción que produjo un fenotipo comportamental diferente al de animales silvestres fue la 756, la cual en presencia de *pdfGAL4* presentó una alta ritmicidad y un período endógeno promedio de 25,5 horas con una penetrancia del 100%. Por otro lado, la inserción es viable en homocigosis y presentó un período endógeno y ritmicidad similares a la de animales silvestres tanto en homocigosis como en heterocigosis (Figura 18). Por lo tanto, luego de estos experimentos iniciales y considerando las características del resto de las inserciones, se decidió proseguir la caracterización de la línea 756.

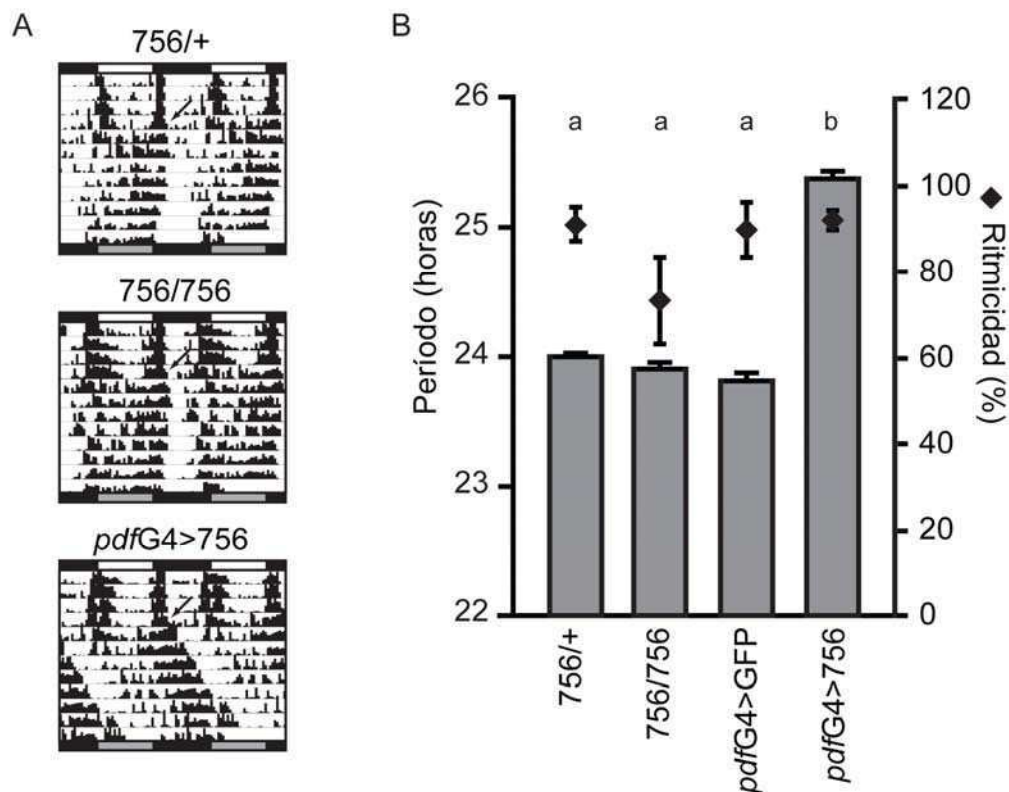


Figura 18. La inserción 756 media un período largo en actividad locomotora. (A) La figura muestra actogramas representativos de moscas que contienen la inserción en heterocigosis y homocigosis, así como la inserción en contexto de *pdfG4*. Las flechas indican el momento de transición a oscuridad constante. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de períodos $\alpha=0,05$ $F_{2,3}=172,92$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,331; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de al menos dos experimentos independientes.

La colección de animales generada en el relevamiento genético se encuentra en el background genético *yellow white*, puesto que la línea original de la que partieron las transposiciones se encontraba en ese background. Luego de generada la colección surgieron reportes que indican que la mutación en el gen *yellow* (*y*) provoca defectos en el funcionamiento del sistema nervioso (Drapeau, 2003; Drapeau et al., 2006). Para evitar evaluar la contribución de esta mutación al fenotipo dependiente de 756, se retrocruzó cinco veces la línea *y⁻w⁻;756* con el background *w¹¹¹⁸*, de modo de asegurar el cambio de fondo genético y se obtuvo así la línea *w¹¹¹⁸;756*. Los fenotipos observados al cruzar la línea 756 con *pdfG4* antes y después del cambio de fondo genético son indistinguibles. Los experimentos mostrados a lo largo de esta tesis fueron íntegramente realizados con la línea *w¹¹¹⁸;756*.

El ritmo circadiano de eclosión también se encuentra afectado

El circuito PDF tiene un rol central en la determinación del período y la fase de la actividad locomotora. Sin embargo existen otros comportamientos regulados por el reloj circadiano que son independientes de este circuito, como ser la oviposición (Howlader et al., 2006; Howlader and Sharma, 2006) o la respuesta olfativa (Tanoue et al., 2004; Zhou et al., 2005). En el caso de la eclosión, otro comportamiento controlado por el reloj circadiano, su ritmicidad está determinada por el circuito PDF, y esto ocurre a través del control que este circuito ejerce sobre la glándula protorácica (Chang, 2006; Myers et al., 2003). Al existir dos vías de salida controladas por el mismo grupo de neuronas (eclosión y actividad locomotora), es posible pensar que aquellos componentes que afecten ambas procesos estarán involucrados en la determinación de propiedades básicas del fenómeno en estudio; mientras que si afectan sólo una de las salidas es probable que estén involucrados en las vías de salida y/o en el establecimiento del control fino del proceso. Al evaluar el ritmo de eclosión en una población de moscas *pdfG4>756* en comparación con animales heterocigotas 756, se encontró que la desregulación mediada por la línea 756 también producía un período largo en condiciones de curso libre, con un período similar al obtenido en actividad locomotora (Figura 19). Este resultado abona la hipótesis de un rol central para el gen desregulado en el establecimiento del período endógeno, y debilita la posibilidad de que se encuentre controlado las propiedades de las vías de salida del reloj, aunque estos experimentos no permiten descartar totalmente esta posibilidad.

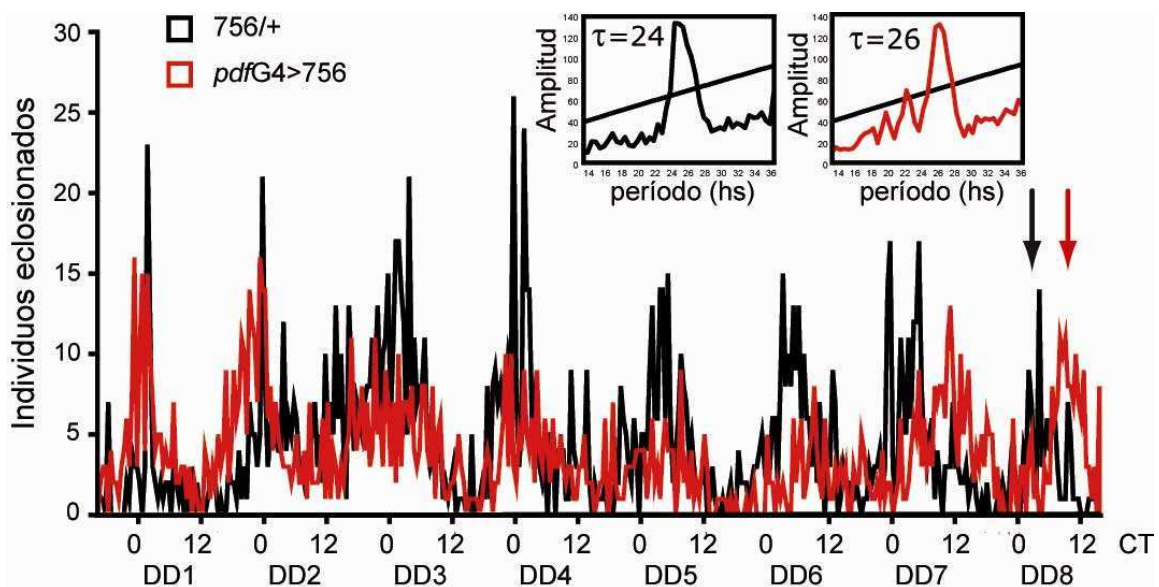


Figura 19. El comportamiento poblacional de eclosión presenta un período de 25,5 horas. Se registraron los individuos eclosionados cada media hora a lo largo de 8 días en DD (oscuridad

constante). Se muestran los registros temporales acompañados por los periodogramas de cada uno de los dos genotipos evaluados. Las flechas negra y roja marcan el pico de eclosión en el octavo día de oscuridad constante para el control y el tratado respectivamente, observándose un claro cambio de período acumulado a lo largo de los días. CT: tiempo circadiano. Estos registros se repitieron en 3 oportunidades con similares resultados.

La cepa 756 permite la sobreexpresión de la variante B del gen *schnurri*

Una de las principales ventajas del relevamiento genético realizado es que el transposón utilizado permite identificar su sitio de inserción en el genoma por técnicas sencillas de biología molecular. Mediante la técnica de rescate plasmídico (ver Materiales y Métodos, Sullivan et al., 2000) se identificó el sitio de inserción así como la orientación del transposón (Figura 20). En la línea 756 el transposón se insertó en la región 5' de locus de *schnurri*, el cual presenta cuatro inicios alternativos de la transcripción, por lo que no todos los transcritos se ven afectados del mismo modo. Para dos de ellos la inserción se encuentra “río arriba” del inicio de la transcripción (variantes B y C), mientras que para las otras dos la inserción se localizó dentro del primer intrón (variantes A y D). El transposón tiene la misma orientación que el locus de *schnurri*, lo que hizo suponer que el efecto de desregulación del locus observada en contexto de *pdfGAL4*>756 era la sobreexpresión.

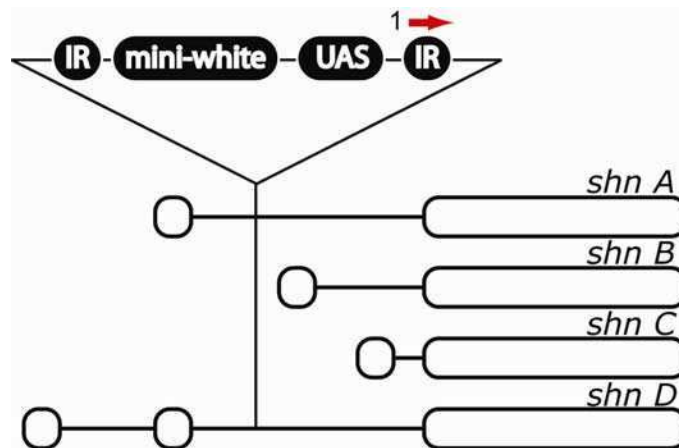


Figura 20. Esquema del locus de *schnurri*. Se representan las cuatro variantes transcripcionales del locus y el sitio de inserción del transposón en la línea 756. La flecha roja representa la localización del oligonucleótido utilizado para determinar la inserción del transposón en el genoma de la mosca, el número identifica al oligonucleótido en la tabla correspondiente en la sección de materiales y métodos. Si bien los distintos transcritos presentan inicio alternativo de la transcripción, las bases de datos del genoma de *Drosophila* predicen el mismo marco abierto de lectura para las variantes A, B y C, mientras la variante D tendría 45 aminoácidos adicionales en el N-terminal.

Para confirmar esta hipótesis se utilizó la línea *heatshockGAL4* (*hsG4*), que permite expresar altos niveles de GAL4 en todo el organismo en respuesta a un pulso de temperatura (en contraposición a *pdfG4*, que sólo dirige la expresión en 16 neuronas del sistema nervioso central). Se generaron animales *hsG4>756* y para activar la transcripción de *gal4* se aplicaron dos pulsos de media hora de duración a 37°C en un baño termostatizado separados por tres horas. Al finalizar el último pulso se decapitaron las moscas para extraer el ARNm de cabezas. Obtenido el ADNc con OligodT se cuantificaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real utilizando un juego de oligonucleótidos que amplifican sobre todas las variantes transcripciones y, en paralelo, se emplearon otros juegos de oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas alternativas (Figura 21A). Tal como se esperaba, se corroboró un aumento en los niveles de la transcripción del locus; y en cuanto al análisis de las variantes transcripcionales, la isoforma B de *schnurri* es la más afectada (Figura 21B). A partir de estos resultados se puede concluir que en los animales *pdfG4>756* el aumento de la variante B de *schnurri* es el responsable del alargamiento del período endógeno en la actividad locomotora.

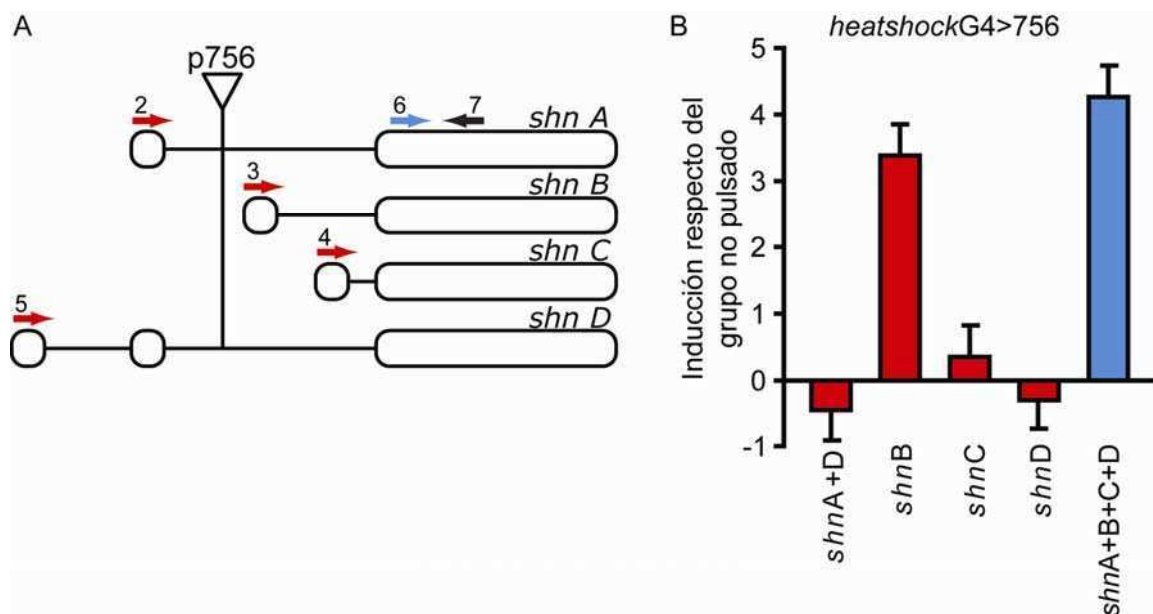


Figura 21. La inserción en 756 media la sobreexpresión de la variante B de *schnurri*. (A) Esquema del locus de *schnurri* y el sitio de inserción del transposón de la línea 756. Las flechas rojas representan los oligonucleótidos "forward" utilizados para cuantificar cada una de las variantes transcripcionales de *schnurri*, así como su posición relativa. La flecha celeste representa el oligonucleótido "forward" utilizado para evaluar todas las variantes transcripcionales de modo conjunto. La flecha negra representa el oligonucleótido "revers" utilizado en todos los casos. Los números identifican a los oligonucleótidos en la tabla correspondiente en la sección de materiales y

métodos. (B) Niveles de inducción de cada una de las variantes transcripcionales. Se cuantificó la diferencia de niveles de ARNm entre animales *heatshockG4>756* pulsados y no pulsados. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes utilizando tres genes normalizadores, *tubulina*, *n-syb* y *rpl49*, para los que se utilizó los oligonucleótidos 10 a 16 de la tabla correspondiente en la sección de materiales y métodos.

Al trabajar con elementos transponibles es común que la inserción del transposón provoque mutaciones que inutilizan el gen afectado, ya que un fragmento de ADN de alrededor de 10 kpb que se intercala en el locus puede afectar el reconocimiento de regiones regulatorias o el procesamiento del ARNm. En el caso de la inserción en 756, viable en homocigosis y localizada en un intrón o río arriba del inicio de la transcripción (dependiendo de cuál de las variantes se considere), era posible que el locus no se encontrara fuertemente afectado por el transposón, en especial teniendo en cuenta que las mutaciones nulas en *schnurri* son letales (Arora et al., 1995; Grieder et al., 1995; Staehling-Hampton et al., 1995).

Para evaluar el efecto de la inserción sobre el funcionamiento del locus, se evaluó por PCR en tiempo real la abundancia de los ARNm de las diferentes variantes de *schnurri* en animales heterocigotas y homocigotas para la inserción. Sorprendentemente, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión para ninguna de las 4 variantes transcripcionales, tanto en animales heterocigotas como homocigotas (Figura 22).

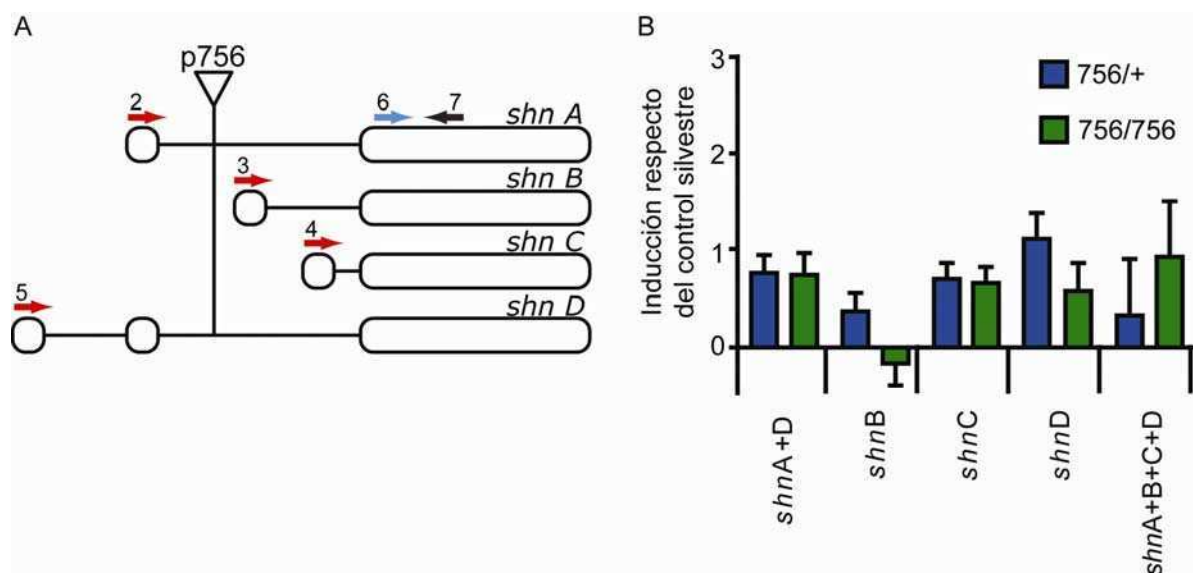


Figura 22. La inserción en 756 no afecta transcripcionalmente el locus de *schnurri*. (A) Esquema del locus de *schnurri* y el sitio de inserción del transposón en 756. Las flechas indican lo mismo que en la Figura 21. (B) Niveles de inducción de cada una de las variantes transcripcionales. Se cuantificó la diferencia de niveles de ARNm de animales 756 heterocigotas u homocigotas respecto de animales controles *w¹¹¹⁸*. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes,

se utilizó la misma normalización que en la Figura 21. No se encontraron diferencias significativas para ninguna variante transcripcional.

En todos los experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis la inserción 756 se utilizó en heterocigosis, descartándose así cualquier efecto de esta manipulación sobre los niveles endógenos del locus.

El fenotipo de la línea 756 es específico de *schnurri*

La escisión del transposón revierte el fenotipo comportamental

El proceso de generación de mutantes por transposición asume que cada nueva línea contiene sólo una alteración en el genoma, producto de la nueva localización del elemento transponible. Si bien esta premisa es generalmente válida cuando se trabaja con transposones no replicativos (como es el caso del transposón de tipo EP utilizado para generar la colección de mutantes; Rorth, 1996), podría ocurrir que, previo a su estabilización, el elemento se inserte y escinda en más de una oportunidad, dejando marcas en el genoma producto de escisiones imprecisas. Esto abre la posibilidad de que los fenotipos observados no dependan de la posición estable del transposón en el locus de *schnurri* sino de alguna otra alteración producto del proceso de transposición.

Para evaluar esta alternativa se realizó la escisión del transposón en la línea 756 obteniéndose una colección de cinco escisiones independientes. Todas ellas presentaron una ritmicidad comportamental y períodos endógenos no distinguibles de los de animales silvestres en presencia de *pdfGAL4* (Figura 23), descartándose así cualquier efecto inespecífico en el fenotipo de período de *pdfG4/756*.

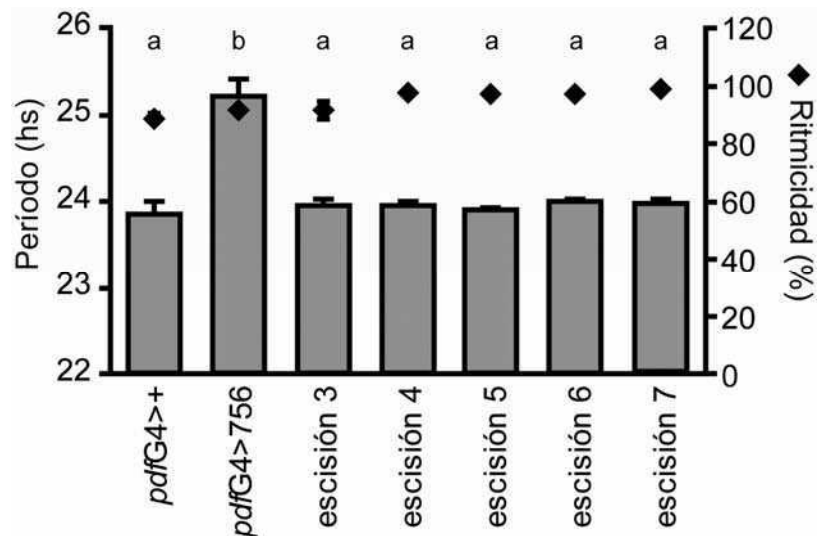


Figura 23. La escisión del transposón en la línea 756 revierte el fenotipo comportamental. Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de períodos $\alpha=0,05$ $F_{5-6}=30,91$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,536; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes.

Reversión del fenotipo de período por disminución de los niveles de *schnurri*

Mediante el empleo del sistema de expresión GAL4/UAS es posible dirigir de modo tejido-específico un ARN de interferencia (ARNi) para bajar los niveles de expresión de un gen de interés (Figura 24) (Kalidas and Smith, 2002).

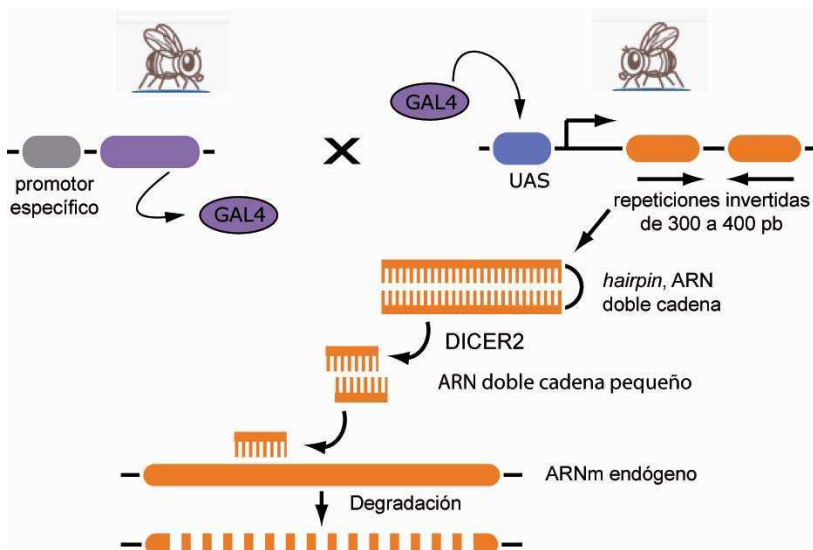


Figura 24. ARN de interferencia en *Drosophila*. Utilizando el sistema GAL4/UAS es posible expresar ARN específicos de secuencia repetida que, al generar ARN doble cadena, son reconocidos

por la maquinaria celular de ARN de interferencia y son capaces de mediar la degradación específica de ARNm celulares.

Varios consorcios públicos en el mundo han encarado la tarea de proveer a la comunidad de *Drosophila* de líneas transgénicas capaces de expresar al menos un ARNi contra cada uno de los genes anotados en el genoma. El *Transgenic RNAi Project* (TRiP) llevado adelante por *Harvard Medical School* (USA) generó una línea específica para interferir al gen *schnurri*, que al combinarla con *pdfG4>756* revirtió el fenotipo de período largo, dando como resultado moscas con períodos indistinguibles a los de las moscas silvestres (Figura 25).

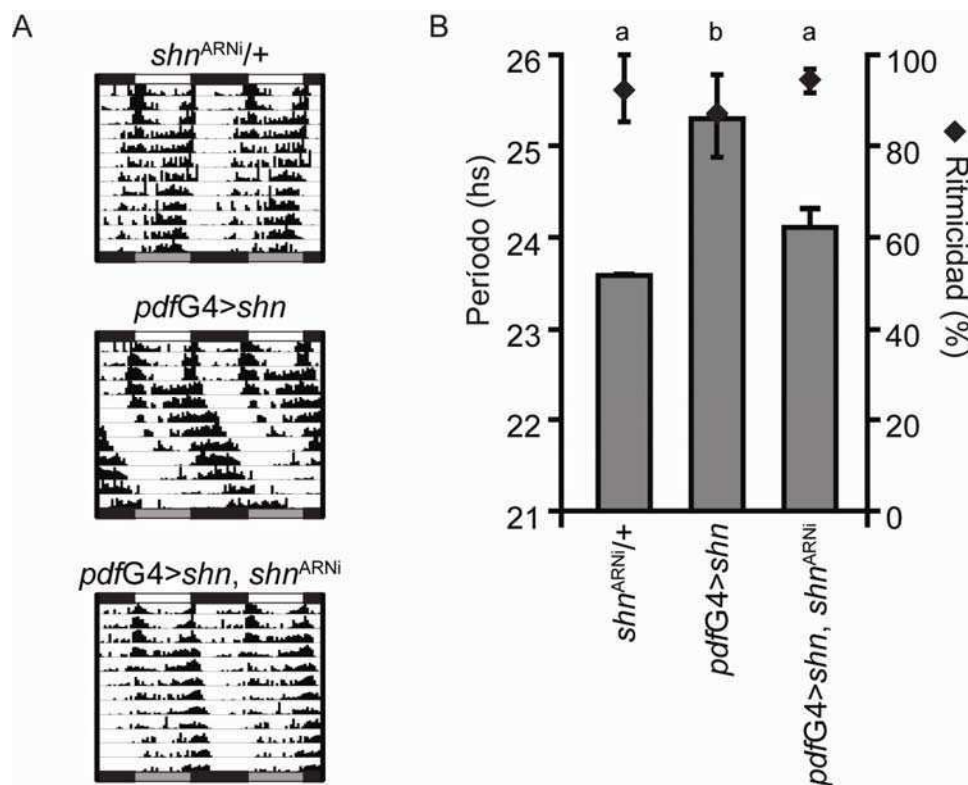


Figura 25. Interferir contra *schnurri* revierte el fenotipo de período. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados en los que se observa la reversión del fenotipo de período largo de *pdfG4>shn*. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de períodos $\alpha=0,05$ $F_{2-3}=52,36$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,71; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes.

Una limitación del sistema de ARNi en *Drosophila* es que, al utilizarse fragmentos de entre 300 y 400 pb, puede generarse un efecto inespecífico sobre ARN celulares, y los fenotipos observados no ser producto de la disminución del ARN blanco deseado. El resultado de la

Figura 25, si bien no descarta la presencia de blancos inespecíficos, indica que la línea *shn*^{ARNi} provista por TRiP es capaz de modular los niveles de *schnurri*.

La sobreexpresión de *schnurri* de modo independiente de la línea 756 también genera alargamiento de período

La localización del transposón y los experimentos de sobreexpresión e interferencia mencionados en secciones previas permitieron relacionar al gen *schnurri* con el fenotipo observado en actividad locomotora. Para confirmar de forma independiente que la sobreexpresión de *schnurri* genera períodos largos se utilizó una línea transgénica (Marty et al., 2000) que permite realizar esta desregulación a través del sistema GAL4/UAS sin afectar el locus endógeno. Esta línea expresa el marco abierto de lectura (ORF) de *schnurri* a través de un transposón insertado en el cromosoma 3 y ha sido utilizada para caracterizar la función de este gen durante la embriogénesis de *Drosophila*. La sobreexpresión de *schnurri* en el circuito PDF mediante esta línea independiente a la generada en el laboratorio resultó en fenotipos de período largo similares a los obtenidos con la línea *pdfG4>756* (Figura 26).

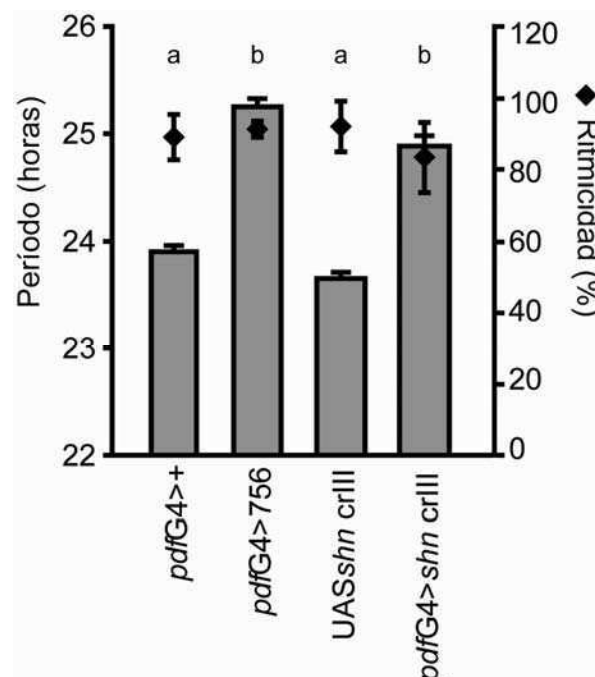


Figura 26. La sobreexpresión de *schnurri* mediada por una línea transgénica independiente produce períodos largos. Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de períodos $\alpha=0,05$ $F_{3,7}=33,66$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,627; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

La expresión de *schnurri* en las LNvs es determinante para el comportamiento locomotor

schnurri se expresa en las LNvs

El fenotipo hasta aquí caracterizado es producto de la sobreexpresión de *schnurri*. Si bien un fenotipo de sobreexpresión puede explicar aspectos importantes de la fisiología celular podría representar una situación ectópica y por tanto, menos relevante. En el año 2010 Rosbash y colaboradores publicaron la caracterización del perfil de expresión génica de diversos grupos neuronales relevantes para el comportamiento circadiano en moscas adultas (Kula-Eversole et al., 2010). Para esto marcaron las diferentes neuronas reloj expresando GFP, disgregaron los cerebros, seleccionaron manualmente las neuronas GFP positivas y estudiaron el perfil de expresión con microarreglos de ADN. *schnurri* es uno de los genes enriquecidos en las sLNvs descritos en este trabajo, confirmando no sólo su expresión en este grupo neuronal sino que sus niveles están aumentados respecto de lo que ocurre en otras regiones del cerebro de *Drosophila*.

Para comenzar a entender el rol de *schnurri* en el comportamiento locomotor circadiano se utilizó el mutante nulo para *schnurri*, la cepa *shn*⁴³⁷⁴ (Arora et al., 1995). Esta mutación, letal en homocigosis, fue evaluada comportamentalmente en heterocigosis sin observarse defecto ni de ritmicidad ni de período. Como alternativa a esta aproximación se utilizó la línea transgénica *shn*^{ARNi} proveniente de TRiP para disminuir los niveles de ARNm en las neuronas PDF positivas. Para potenciar el efecto de la interferencia se utilizó la sobreexpresión de la enzima DICER2, parte de la maquinaria endógena de procesamiento del ARNi. Al cruzar la línea *pdfG4> dicer2* con la línea *shn*^{ARNi} se observó una disminución de la ritmicidad poblacional, con una marcada desconsolidación de la actividad locomotora (Figura 27A y B).

Este fenotipo de desconsolidación se caracteriza por una disminución de los niveles de actividad durante el día subjetivo y un marcado aumento de la actividad durante la noche subjetiva.

Para caracterizar más profundamente este fenotipo se evaluó el índice de actividad durante las noches y días subjetivos (Figura 27C). La evaluación de la relación entre la actividad en el día y la noche muestra una disminución como resultado de disminuir los niveles de *shn* en las neuronas PDF. El análisis estadístico muestra una diferencia entre los animales tratados y uno de los controles (la inserción de *shn*^{ARNi} en heterocigosis) mientras que respecto del otro control (*pdfG4> dicer2, cd8rfp*) no alcanza un valor significativo pero muestra una clara tendencia. La desconsolidación de la actividad

obtenida en estos experimentos refuerza la idea de que esta vía de señalización impacta sobre el comportamiento locomotor circadiano.

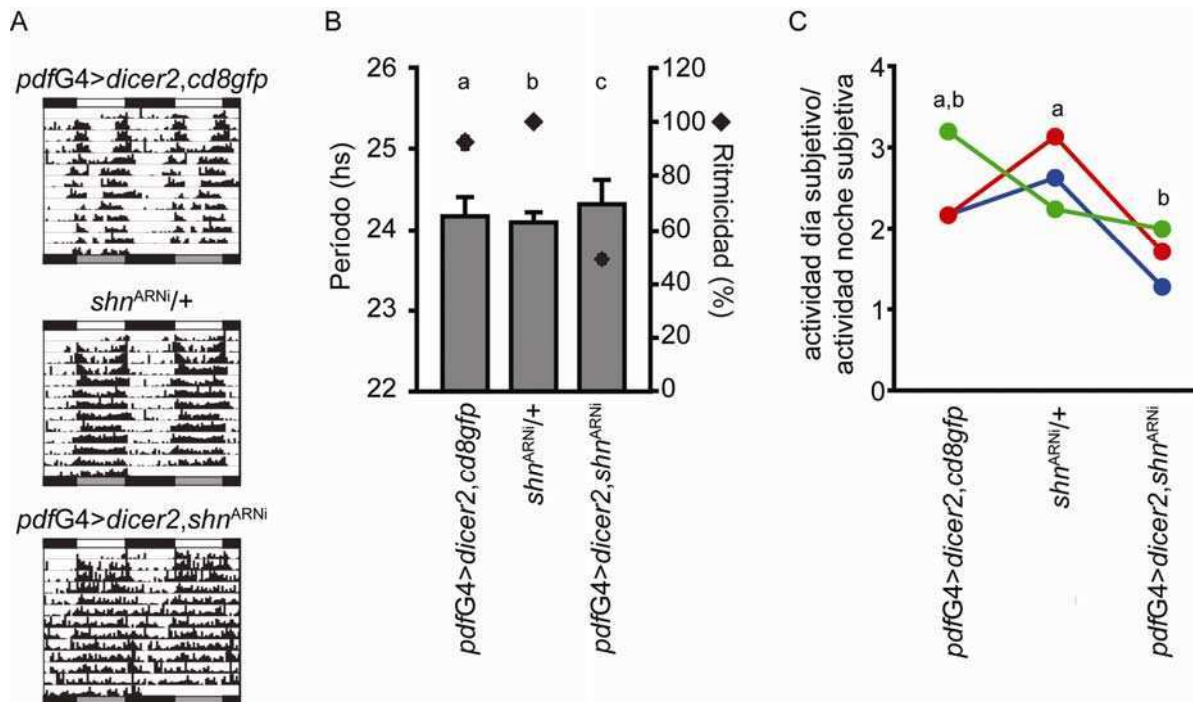


Figura 27. Disminuir los niveles de *schnurri* desconsolida el comportamiento locomotor. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestra el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de ritmicidad $\alpha=0,05$ $F_{2,3}=568,49$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=6,79; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. (C) Relación entre la cantidad de actividad en los días y las noches subjetivas para los genotipos indicados. Se muestran los resultados para 3 experimentos independientes analizados con ANOVA de un factor, $\alpha=0.05$ $F_{2,6}=3,85$ $p=0,0840$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,1$ DMS=0,981; las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Las neuronas PDF positivas son necesarias y suficientes para el cambio de período

El relevamiento genético se restringió al circuito PDF dada su jerarquía en el control del período y la ritmicidad de la actividad locomotora, pero esto no descarta que la desregulación de este gen en el resto del sistema circadiano tenga un efecto sobre el comportamiento. Para conocer el efecto de sobreexpresar *schnurri* en todo el circuito circadiano se utilizó el promotor del gen *timeless* para dirigir la expresión de GAL4. Las moscas *timG4>756* presentaron un período endógeno largo, similar al de *pdfG4>756*, sin mostrar defectos en la ritmicidad ni en la viabilidad (Figura 28). El hecho de que el comportamiento no se vea más afectado al producir la desregulación en todo el circuito

circadiano, sumado a que *timeless* se expresa en las LNvs, permitió suponer que el fenotipo observado provenía de la desregulación génica en estas neuronas. Para poner a prueba esta hipótesis se utilizó la línea *pdfGAL80*, la cual expresa el represor transcripcional de GAL4, GAL80, en el patrón de *pdf*. Combinando la línea *pdfGAL80* con la línea *timG4* fue posible producir la desregulación de *schnurri* en todo el circuito circadiano con excepción de las neuronas LNvs. Los animales *timG4, pdfGAL80*>756 mostraron un período endógeno de la actividad locomotora similar al de animales silvestres, y estadísticamente inferior al de animales *pdfG4*>756 o *timG4*>756 (Figura 28).

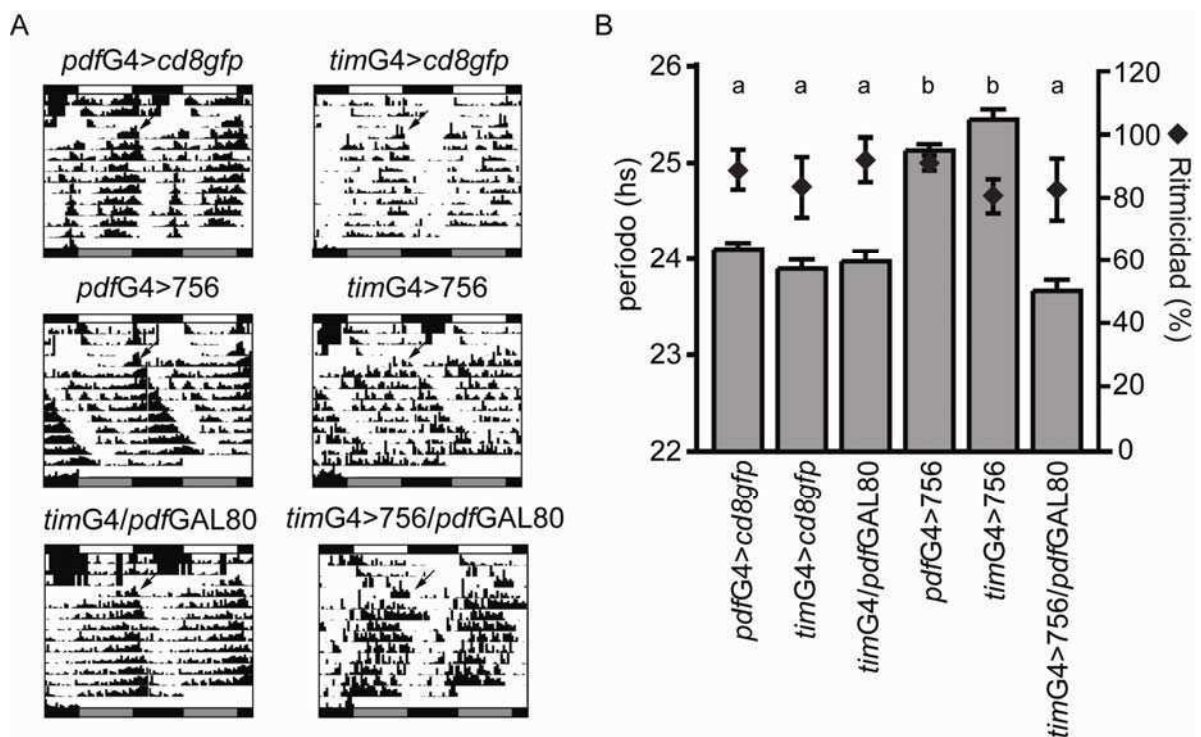


Figura 28. El período largo es mediado por las neuronas PDF positivas. Utilizando el promotor de *tim* para desregular la expresión de *schnurri* en todo el circuito circadiano se obtiene período largo; sin embargo, reprimiendo la desregulación en el circuito PDF a través de la expresión de GAL80 se revierte el fenotipo. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestra el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período $\alpha=0,05$ $F_{5,14}=11,71$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=1,15; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos independientes.

Estos resultados demuestran que las neuronas que expresan el neuropéptido PDF son necesarias y suficientes para mediar el efecto comportamental producido por el aumento de los niveles de *schnurri*.

Niveles constitutivamente elevados de *schnurri* generan un acortamiento de los axones de las sLNvs

La caracterización inicial de la función de *schnurri* se realizó en los estadios embrionarios y larvales de la mosca. Por el momento, este gen ha sido vinculado a los fenotipos más clásicos de la vía de DPP, es decir, el establecimiento del eje dorso-ventral y la organogénesis (Arora et al., 1995; Dai et al., 2000; Grieder et al., 1995; Marty et al., 2000; Staehling-Hampton et al., 1995; Udagawa et al., 2000; Yao et al., 2006). Más allá de la función en el desarrollo temprano, la vía de BMP tiene un rol sustancial en la formación y funcionamiento del sistema nervioso. Entre los procesos controlados por la vía se encuentra la expresión del neuropéptido FMFRamide en las neuronas Tv (Allan et al., 2003; Eade and Allan, 2009; Marques et al., 2003), y la identidad peptidérgica de las neuronas CCAP. (Veverlytsa and Allan, 2011), tal como se detalla en la introducción. Por otra parte, se ha reportado que variaciones en los niveles de PDF pueden alterar el período endógeno (Wulbeck et al., 2008; Yoshii et al., 2009b). A partir de estos datos de la literatura, fue importante determinar si la sobreexpresión de *schnurri* producía un efecto sobre los niveles de PDF, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Al evaluar los niveles de ARNm de *pdf* en ZT02 para animales silvestres y animales que sobreexpresan *schnurri* no se encontraron diferencias significativas (Figura 29), descartándose la posibilidad de que *schnurri* regule directa o indirectamente el promotor de *pdf*.

Descartado el efecto transcripcional, se prosiguió a cuantificar los niveles de PDF en las terminales dorsales de las neuronas sLNvs y la morfología de estos axones. Esta región del circuito circadiano es de particular interés por dos razones: (1) se ha postulado que la oscilación de la inmunoreactividad de PDF en las proyecciones dorsales de las sLNvs es importante para sostener la ritmicidad comportamental (Park et al., 2000); y (2) nuestro laboratorio ha descrito la regulación fina de las arborizaciones de las proyecciones dorsales de las sLNvs por parte del reloj circadiano (Fernandez et al., 2008).

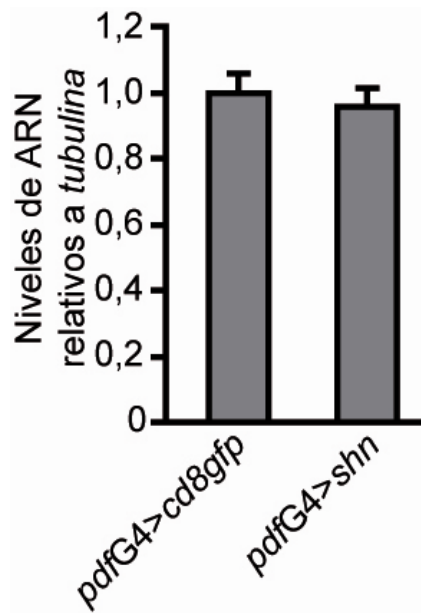


Figura 29. Los niveles de ARNm de *pdf* no son alterados por la sobreexpresión de *schnurri*. Se evaluaron los niveles de ARNm de *pdf* relativos a los de *tubulina* en animales control (*pdfG4>cd8gfp*) y tratados (*pdfG4>shn*). Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes.

Por ello, se intentó evaluar en paralelo tanto los niveles de PDF (utilizando la inmunoreactividad de este neuropéptido) como la estructura del circuito PDF en los animales *pdfGAL4/756*. La evaluación estructural se realizó empleando una versión de la proteína GFP que se encuentra fusionada a la proteína CD8, lográndose marcar toda la membrana plasmática de las células que la expresan (Lee and Luo, 1999). En un análisis general de la morfología del circuito PDF+, la desregulación de *schnurri* a lo largo de todo el desarrollo del circuito no genera un efecto evidente, descartándose un efecto general sobre el desarrollo del circuito. Este resultado era esperado dada la alta ritmicidad de la línea *pdfG4>756*. Sin embargo, un análisis más detallado de la estructura de las proyecciones dorsales de las neuronas sLNvs mostró que niveles constitutivamente elevados de *schnurri* producen un acortamiento significativo de los axones (Figura 30). Este resultado imposibilitó el análisis sobre los niveles de PDF debido a la morfología alterada de las proyecciones.

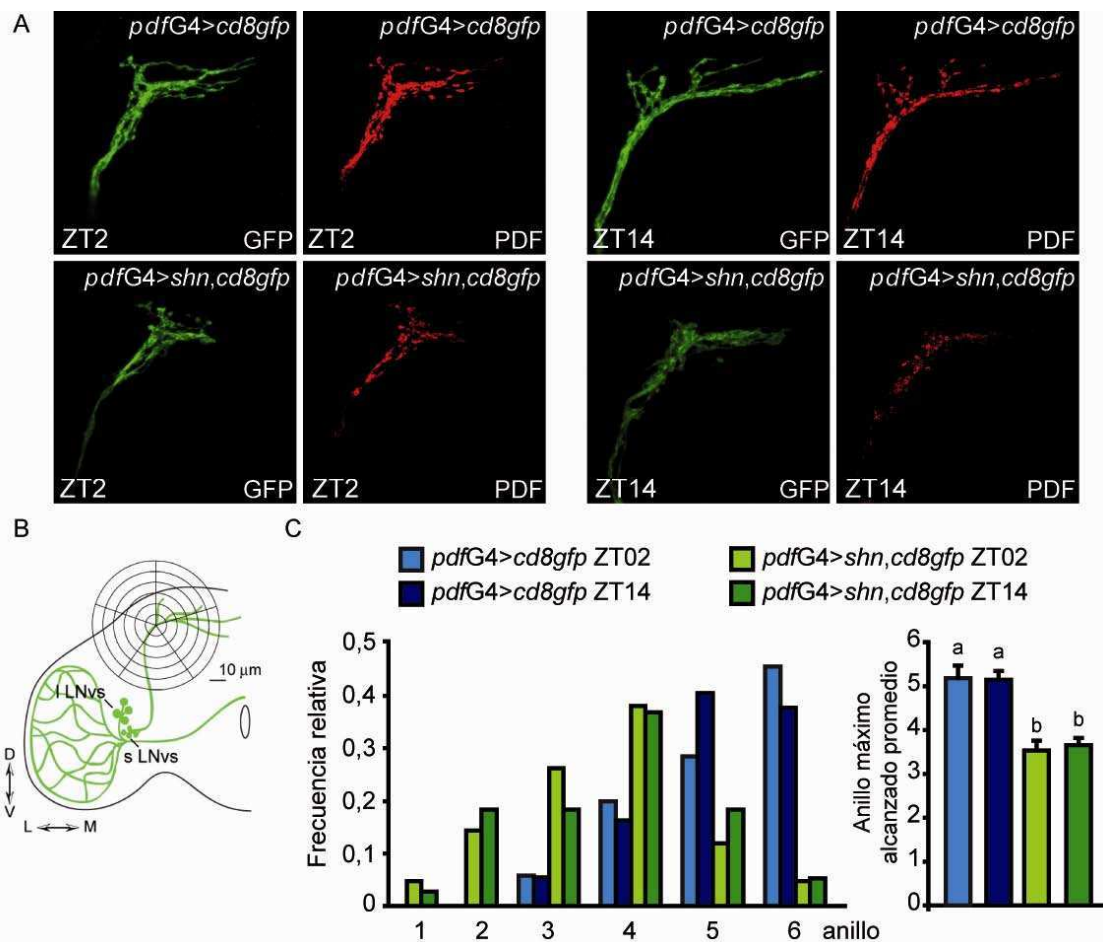


Figura 30. La sobreexpresión constitutiva de *schnurri* produce un acortamiento de las proyecciones dorsales de las sLNvs. (A) Se muestran proyecciones de imágenes confocales de la porción distal de las arborizaciones dorsales de las sLNvs. En verde se destaca la inmunomarcación de la membrana plasmática por medio de la proteína CD8GFP y en rojo la del neuropéptido PDF. ZT02 y ZT14 hacen referencia al momento del día en el que se tomaron las muestras, dos horas después de la transición oscuridad-luz y dos horas después de la transición luz-oscuridad, respectivamente. (B) Diagrama esquemático que resume la modificación al análisis de Sholl empleado para cuantificar el largo del circuito. (C) Frecuencia y valores promedios para el largo de los circuitos PDF en los genotipos y momentos del día indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis del valor promedio, $\alpha=0,05$ $F_{3,8}=15,05$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=1,055; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que el efecto sobre la actividad locomotora podría deberse a una falla en la conectividad del circuito PDF con sus post-sinapsis; alternatively, el acortamiento de los axones podría repercutir en los niveles alcanzados por PDF en la matriz extracelular (y sus potenciales blanco) generando un retardo en la difusión del neuropéptido. Si bien la posibilidad de un efecto a nivel de ultraestructura no pudo ser

descartado¹, el hecho de que la desregulación aguda de *schnurri* en el estadio adulto genere período largo afectando sutilmente la densidad de zonas activas en la proyección dorsal del circuito PDF, sin afectar la estructura de las proyecciones dorsales de las sLNvs, provee argumentos en contra de esta hipótesis (ver página 84).

El alargamiento del período en *pdfG4> shn* depende de la acción de PDF

La principal molécula sincronizadora caracterizada en el circuito circadiano de *Drosophila* es, como ya se ha discutido, el neuropéptido PDF liberado por las LNvs. En ausencia de este neuropéptido el ritmo locomotor se ve severamente afectado. La mayoría de los animales que carecen de PDF son arrítmicos y los animales que evidencian un reloj funcional presentan períodos cortos, entre 22 y 23 horas (Renn et al., 1999). Además, alteraciones estructurales del circuito PDF que llevan a mayor o menor innervación de las neuronas LNvs en el protocerebro dorsal también modulan el período de la actividad locomotora (Wulbeck et al., 2008). Con el objetivo de entender si el fenotipo alterado de los animales *pdfG4> shn* era mediado por este neuropéptido o si bien el efecto se debía a un diferencia estructural del circuito producto de la alteración en la vía de señalización de BMP, se evaluó el comportamiento de animales *pdfG4> shn* en un fondo genético nulo para PDF, utilizando la línea mutante *pdf⁰¹* previamente caracterizada (Renn et al., 1999). Como se observa en la Figura 31 los animales que sobreexpresan *schnurri* en contexto de la mutación *pdf⁰¹* son indistinguibles de aquellos animales que sólo llevan la mutación en *pdf*. A pesar de que era esperable que la ausencia de PDF impacte de modo sustancial sobre el comportamiento generando un alto porcentaje de arritmicidad en la población, el hecho que una proporción de las moscas *pdfG4> shn; pdf⁰¹* presente períodos cortos de alrededor de 23 horas argumenta en contra de que un defecto estructural en el circuito circadiano sea la causa de la alteración de período en los animales *pdfG4> shn*. Además, este resultado muestra que el neuropéptido es crucial para transmitir la desregulación mediada por *shn*.

1 Durante los meses de Julio y Agosto de 2010 realicé una visita al laboratorio del Dr. Ian Meinertzhagen en Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canadá, para aprender a realizar microscopía electrónica con inmuno-marcación para detectar las neuronas PDF positivas, experimentos que el laboratorio de Meinertzhagen había realizado en el pasado (Yasuyama, K., and Meinertzhagen, I.A. (2010). Synaptic connections of PDF-immunoreactive lateral neurons projecting to the dorsal protocerebrum of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 518, 292-304). El objetivo último fue poder identificar potenciales anomalías estructurales en los animales *pdfG4> 756*. Si bien el viaje fue profundamente enriquecedor en lo personal y profesional, pudiendo a mi regreso establecer algunas técnicas de histología en el laboratorio, el objetivo principal del viaje no se cumplió.

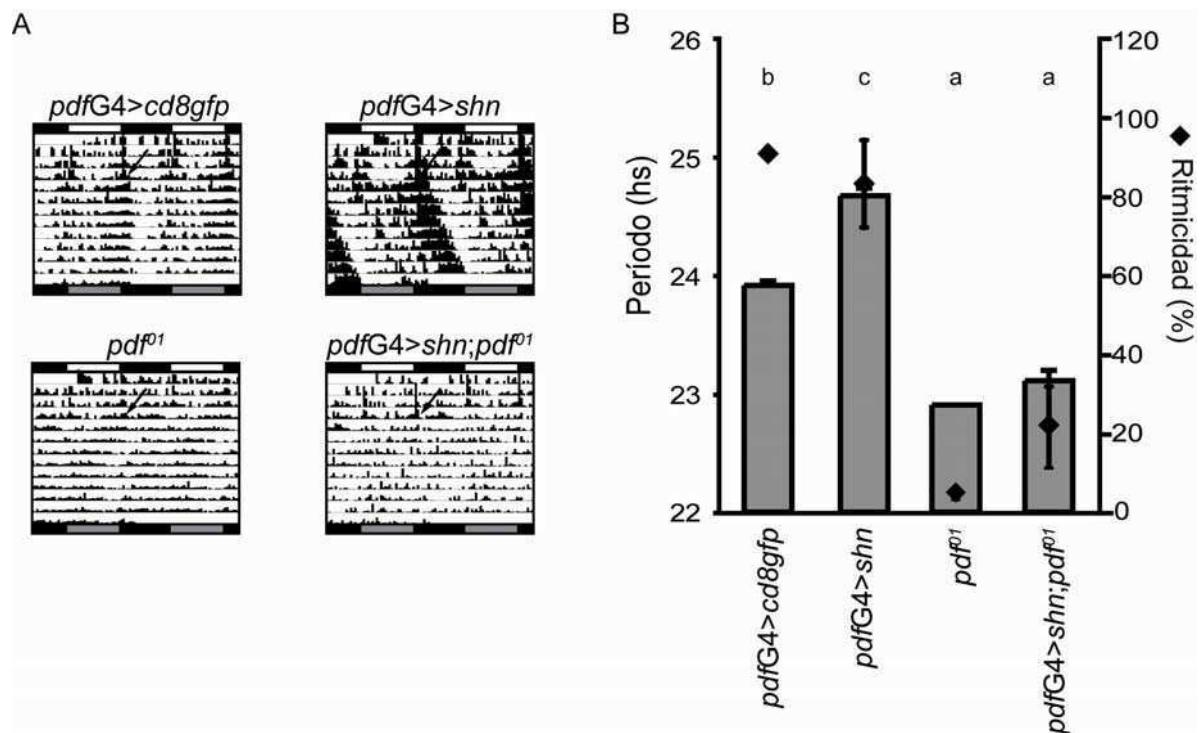


Figura 31. El neuropéptido PDF es necesario para evidenciar el período largo en *pdfG4>shn*. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestra el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período, $\alpha=0,05$ $F_{3,8}=47,24$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,693; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

La vía de BMP impacta sobre el comportamiento circadiano

Enfoques como los relevamientos genéticos brindan la posibilidad de encontrar genes vinculados a un proceso particular, los cuales no hubiesen sido fácilmente relacionados con dicho proceso (por ejemplo, el control circadiano de los ciclos de actividad y reposo). A esto se suma la posibilidad de que, una vez encontrado un gen, es relativamente sencillo extender el análisis a otros genes previamente vinculados con él. Como ya se ha mencionado, *schnurri* es uno de los efectores de la vía de BMP, la cual ha sido ampliamente caracterizada, proveyendo el marco conceptual para diseñar experimentos orientados a comprender si el resto de la vía es relevante en el control de la actividad locomotora rítmica. Una limitación existente es que muchos de los procesos gobernados por esta vía han sido estudiados durante la embriogénesis utilizando mutantes nulos en homocigosis. La letalidad de estas mutaciones imposibilita utilizar estas herramientas para estudiar el comportamiento de animales adultos.

La falta de receptores de la vía de BMP desconsolida el comportamiento

Ante la llegada del ligando apropiado a la superficie celular, el primer paso en la activación de la vía de BMP es la heterodimerización y fosforilación de los receptores de tipo I y II (Figura 6). Al tratarse de un paso limitante para la activación de la vía se evaluó su efecto en el comportamiento rítmico utilizando líneas de ARNi provenientes del Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) diseñadas para disminuir los niveles de ARNm para tres de los receptores conocidos, TKV y SAX (receptores de tipo I), y WIT (receptor de tipo II). Para restringir la desregulación al circuito PDF los ARNi fueron expresados bajo el control del *pdfG4*, y en combinación con la sobreexpresión de *dicer2* (lo cual mejora la eficiencia de la maquinaria de silenciamiento de ARNi). Estas construcciones generaron una reducción significativa en la ritmicidad de la actividad locomotora en condiciones ambientales constantes (Figura 32), lo cual sugiere que la vía participa en la regulación circadiana del comportamiento.

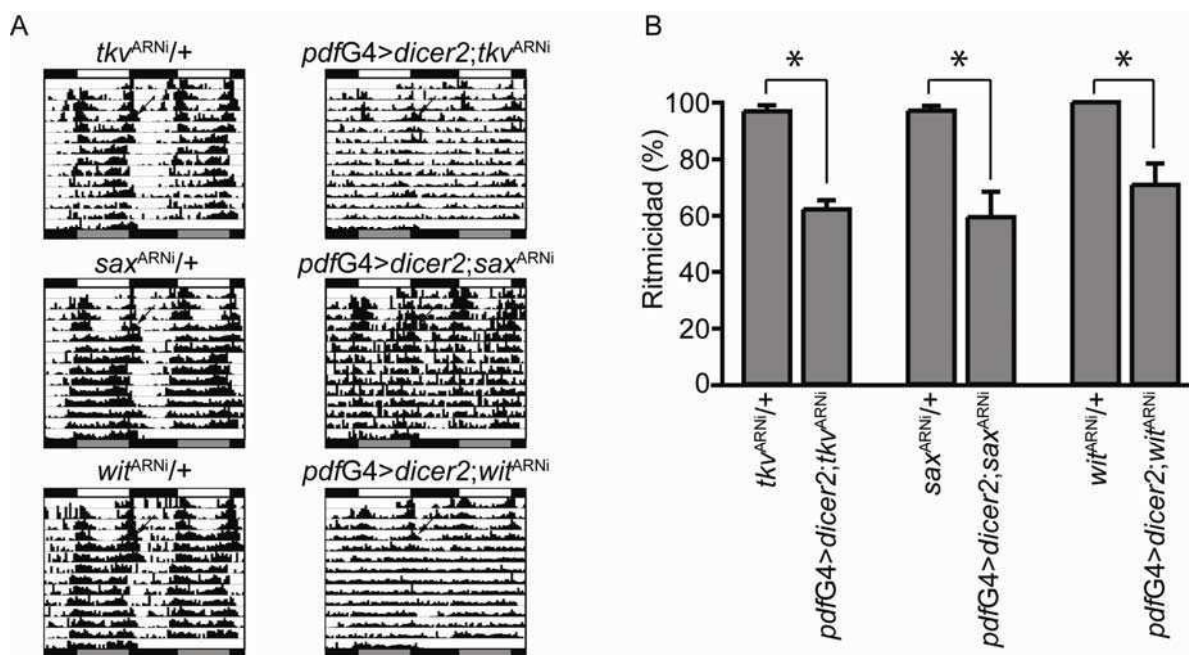


Figura 32. Los receptores de la vía de BMP son necesarios para la ritmicidad de la actividad locomotora. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestran los porcentajes de ritmicidad para cada uno de los genotipos indicados; los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ prueba de Student.

Estos fenotipos se caracterizan por una falta de consolidación de la actividad en el día subjetivo, mostrando altos niveles de actividad durante la noche. Para cuantificar esta falta de consolidación de la actividad en el día subjetivo, y aprovechando que el período

endógeno de estas moscas es cercano a 24hs, se cuantificó separadamente la cantidad de actividad en los días y noches subjetivas. Dado que los niveles de actividad y la relación entre los valores de actividad entre el día y la noche presentan una alta variabilidad entre experimentos estos parámetros se analizaron con un diseño de ANOVA en bloque (Figura 33). Con este análisis se observó con claridad que la actividad locomotora de los genotipos en los que se encuentran disminuidos los niveles de expresión de los receptores de BMP se distribuye más homogéneamente a lo largo de todo el día (sin distinción entre días y noches) en comparación a lo que ocurre en los respectivos controles (Figura 32 y 33).

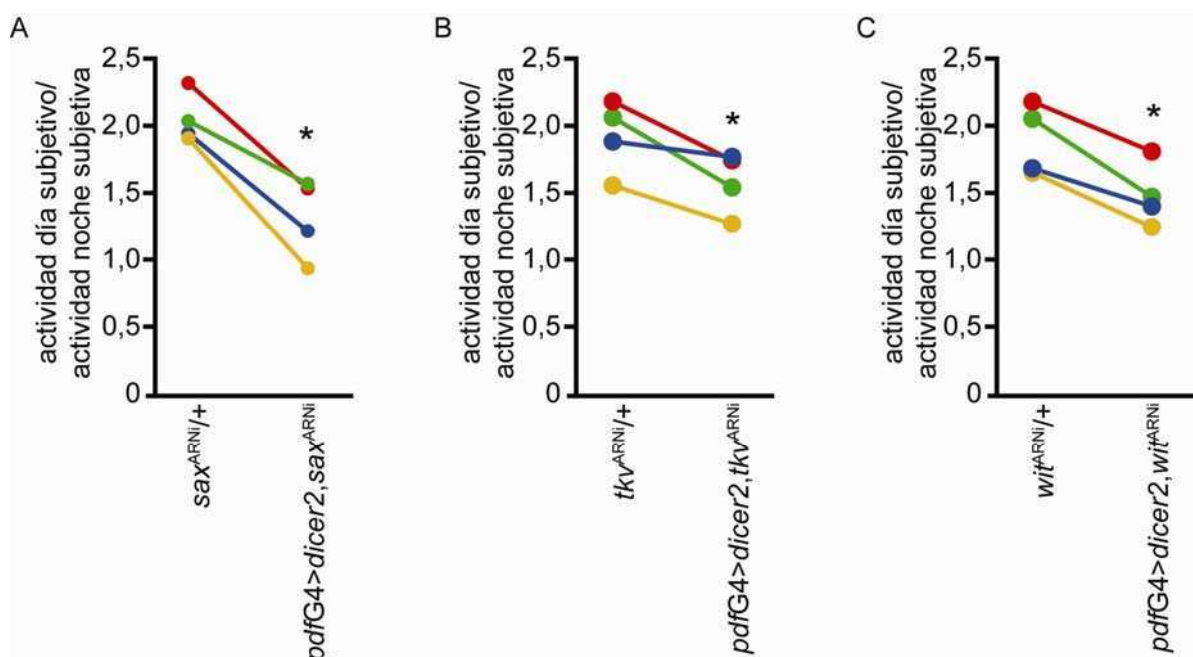


Figura 33. La falta de receptores de la vía de BMP desconsolida el patrón rítmico de la actividad locomotora. (A-C) Se muestran los gráficos de paralelismo de un ANOVA con diseño en bloque aleatorizado (DBA), donde cada color denota los resultados obtenidos en un mismo experimento independiente, siendo ese el criterio utilizado para conformar los bloques del ANOVA. (A) Impacto de la interferencia para *saxophone* en el circuito PDF sobre la desconsolidación de la actividad locomotora en la fase de curso libre, $F_{1,3}=50,10$, p del tratamiento $<0,01$. (B) Impacto de la interferencia para *thickveins* en el circuito PDF sobre la desconsolidación de la actividad locomotora en la fase de curso libre, $F_{1,3}=14,50$, p del tratamiento $<0,05$. (C) Impacto de la interferencia para *wishful thinking* en el circuito PDF sobre la desconsolidación de la actividad locomotora en la fase de curso libre, $F_{1,3}=43,37$, p del tratamiento $<0,01$.

Con el objetivo de complementar la caracterización de los componentes de la vía de BMP que son capaces de afectar el comportamiento locomotor rítmico se evaluó el efecto de expresar en el circuito PDF diferentes líneas de ARNi dirigidas contra los otros dos componentes nucleares de la vía: *medea* (*med*) y *mothers against dpp* (*mad*). Se

utilizaron 3 líneas independientes para cada uno de estos componentes provenientes de los centros repositorios VDRC y TRiP y en ninguno de los casos se vio afectado el comportamiento locomotor. Si bien estos datos sugieren que en las neuronas PDF la vía de BMP presenta un mecanismo no canónico independiente de MAD o MED, hasta tanto no se corrobore que estas líneas eficientemente reducen los niveles de *med* y *mad* no es recomendable aventurar esas conclusiones.

Teniendo en consideración las herramientas ampliamente utilizadas en el estudio de esta vía de señalización, se intentó describir la localización espacial de la proteína MAD fosforilada en el cerebro de moscas adultas silvestres. Utilizando dos anticuerpos fosfo-específicos diferentes y utilizando diversos protocolos de inmunohistoquímica no fue posible detectar señal positiva para estos anticuerpos en ninguna región del cerebro de *Drosophila*. Una vez más, este resultado negativo no es concluyente respecto de la presencia y rol de MAD en el circuito circadiano.

Considerando que la suma de los resultados negativos recién mencionados podría indicar la existencia de una vía de señalización alternativa en las neuronas PDF positivas se intentó explorar esa posibilidad evaluando la relevancia de la quinasa LIMK1 en el control del comportamiento. Como se discutió en la introducción, esta quinasa involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina está fuertemente ligada al funcionamiento del sistema nervioso e interactúa de modo directo con el receptor WIT, afectando la estabilidad sináptica en la sinapsis neuromuscular (Eaton and Davis, 2005). Para evaluar esta posibilidad se utilizaron líneas transgénicas para disminuir (mediante ARNi) o aumentar (mediante la expresión del ORF) los niveles de LIMK1, específicamente en el circuito PDF. Ninguno de los dos enfoques fue capaz de modular el comportamiento locomotor, ni en términos de ritmicidad ni de período endógeno. Puesto que las herramientas seleccionadas fueron previamente utilizadas para modular efectivamente la función de LIMK1 es posible concluir que esta quinasa no representa un regulador sustancial del funcionamiento de las neuronas PDF positivas.

La activación de la vía de BMP alarga el período endógeno

La utilización de variantes constitutivamente activas de los receptores tipo I ha sido, y sigue siendo, una herramienta ampliamente utilizada para estudiar la función de esta vía de señalización (Haerry et al., 1998; Nellen et al., 1996; Veverlytsa and Allan, 2011). Al expresar simultáneamente versiones constitutivamente activas de los receptores SAX y TKV en el circuito PDF+ se observó un efecto dramático sobre el comportamiento locomotor. Al pasar los animales *pdfG4>tkv^A,sax^A* a condiciones de curso libre, estos

manifestaron un período endógeno promedio de 27,4 horas, a la vez que evidenciaron una elevada ritmicidad comportamental (Figura 34). Cabe señalar que la expresión de las variantes activadas de los receptores, por separado, no mostró efectos sobre el comportamiento. Si bien ambos receptores señalizan a través de las mismas moléculas, existen reportes indicando que la activación de ambos receptores por medio de diferentes ligandos actúa en forma sinérgica para mediar su efecto biológico durante el desarrollo embrionario (Ashe, 2005; Haerry et al., 1998; Neul and Ferguson, 1998; Nguyen et al., 1998; Veverlytsa and Allan, 2011); además, estos trabajos muestran que en algunos casos los efectos biológicos sólo son observados al expresar ambos receptores activos en combinación. En este contexto, la necesidad de activar ambos receptores para obtener un efecto sobre el comportamiento podría indicar que la vía de BMP integra señales diversas, o provenientes de diversas fuentes, las cuales confluyen en la determinación del período endógeno de la actividad locomotora.

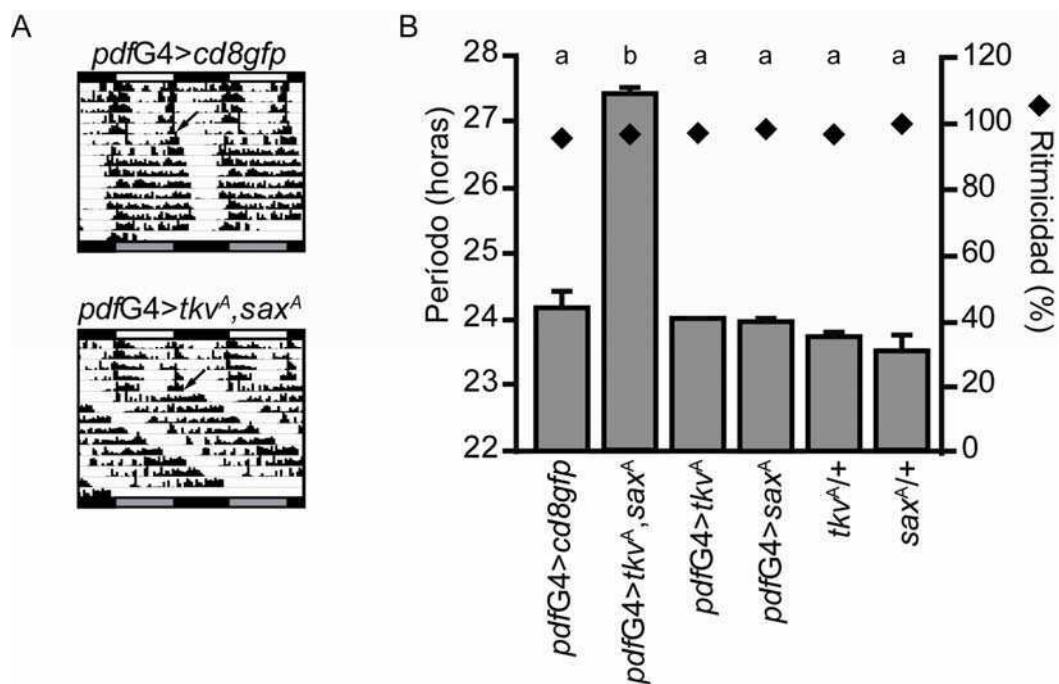


Figura 34. La activación constitutiva de la vía de BMP alarga el período endógeno. (A) Se muestra actogramas representativos de la línea control *pdfG4* mediante la sobreexpresión de una molécula no relacionada (GFP fusionada a CD8) y la línea que expresa ambas variantes activadas, *tkv^A* y *sax^A*, destacándose el período extremadamente largo a la par de una notable ritmicidad. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis del período, $\alpha=0,05$ $F_{5,7}=53,39$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=1,043, las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

En conjunto, los resultados obtenidos por disminución o aumento de la actividad de la vía de BMP en el circuito PDF reflejan la relevancia que este conjunto de moléculas tiene en el control de la ritmicidad del comportamiento locomotor. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos con los receptores activados son congruentes con los resultados producto de la sobreexpresión de *schnurri*, es posible proponer que la activación de la vía de BMP funciona como una señal retrógrada que retarda el paso del reloj.

***schnurri* altera el período endógeno en el estadio adulto**

Como ya se ha discutido en la introducción, numerosos trabajos han vinculado a la vía de BMP, y a *schnurri* en particular, en diversos procesos durante el desarrollo embrionario y larval de *Drosophila*. Además, existen abundantes reportes sobre el vínculo de esta vía de señalización con el establecimiento y mantenimiento del sistema nervioso. Considerando todas estas evidencias, fue fundamental discernir si el cambio comportamental observado era producto de un desarrollo alterado, o si, por el contrario, se requiere de la función de *schnurri* y la vía de BMP para modular ciertas propiedades del comportamiento locomotor específicamente en el estadio adulto. Cabe destacar que el efecto sobre el período endógeno hasta aquí descrito depende de la utilización del promotor de *pdf*. Este promotor es activo desde muy temprano en el desarrollo ya que es posible identificar a las neuronas sLN_Vs por la expresión de PDF en el primer estadio larva entre 4 y 5 horas luego de la eclosión de la larva (Blanchardon et al., 2001; Helfrich-Forster, 1997). Para distinguir entre un efecto de desarrollo como responsable de la alteración de las propiedades básicas del sistema neuronal que controla el comportamiento y un efecto agudo que la vía de señalización pudiese ejercer sobre la maquinaria del reloj molecular se utilizó el sistema TARGET (McGuire et al., 2003; McGuire et al., 2004), el cual hace posible controlar temporalmente la inducción transcripcional mediada por GAL4.

Puesta a punto del sistema TARGET para el análisis de la actividad locomotora circadiana de *Drosophila*

El sistema TARGET se basa en el empleo de una variante del represor GAL80 que es sensible a la temperatura: es funcional a temperaturas bajas, o permisivas, (18-25°C) y no funcional a temperaturas elevadas, o restrictivas (28-30°C) (Figura 35).

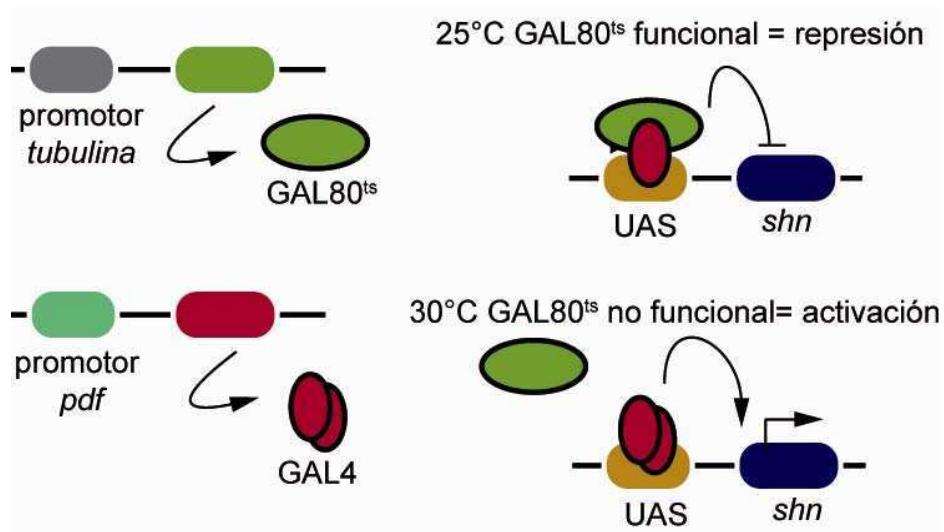


Figura 35. Sistema TARGET. La proteína GAL80^{ts} expresada a través de un promotor ubicuo como el de *tubulina* es capaz de bloquear la actividad de GAL4 en todo el organismo si las moscas se encuentran a la temperatura restrictiva. Al pasar las moscas a la temperatura permisiva GAL80^{ts} ya no es funcional y se activa la transcripción mediada por GAL4. Modificado de McGuire et al. (2003).

Teniendo en cuenta que este sistema induce la expresión génica a temperaturas elevadas, una restricción para este enfoque experimental es el efecto de la temperatura sobre el comportamiento en sí, ya que para una evaluación de período endógeno es necesario inducir el sistema durante varios días. Si bien una de las propiedades básicas de los relojes circadianos es su compensación por temperatura (Pittendrigh, 1954), esto ocurre dentro de rangos fisiológicos, que para *Drosophila* suelen definirse entre 18°C y 29°C. Más aun, se han descrito cambios en el patrón de actividad locomotora a diferentes temperaturas, los cuales se caracterizan por un decremento de la cantidad de actividad y un aumento en la consolidación de esa actividad en torno a las transiciones al aumentar la temperatura (Majercak et al., 1999). Esto, sumado a que la mayoría de los experimentos utilizando esta técnica inducen el sistema mediante temperaturas por encima de 29°C (Blanchard et al., 2010; Dubnau et al., 2001; Ng et al., 2011) hizo necesaria una puesta a punto del sistema.

En primer lugar se comprobó su inducibilidad utilizando como reportero la proteína verde fluorescente (GFP). Animales *pdfG4,tubGAL80^{ts}>cd8gfp* fueron desarrollados a 25°C y luego separados en dos poblaciones, una mantenida a 25°C y la otra transferida a 30°C por dos días. Luego se procedió a diseccionar los cerebros, fijarlos y evaluar la presencia de GFP por medio de inmunohistoquímica, lo cual permitió confirmar que el sistema se

induce a 30°C, y que 25°C no representa una temperatura permisiva (no fue posible detectar la señal de GFP en los animales mantenidos a 25°C). Confirmada la potencialidad del sistema se buscó reproducir los resultados de la sobreexpresión de *schnurri*. Para esto se generaron moscas *pdfG4>756* conteniendo *tubGAL80^{ts}* (*pdfG4,tubGAL80^{ts}>756*) y se las mantuvo a 30°C durante todo su desarrollo y la evaluación comportamental, utilizándose como controles los genotipos *pdfG4,tubGAL80^{ts}* o *pdfG4>756*. A pesar de que las tres líneas genéticas mostraron un comportamiento rítmico, las moscas *pdfG4,tubGAL80^{ts}>756*, al igual que las moscas *pdfG4,tubGAL80^{ts}* mostraron un período endógeno cercano a 24hs, mientras que como era de esperar los animales *pdfG4>756* mostraron un período largo de alrededor de 25,5hs. La imposibilidad de reproducir el período largo mediando el sistema TARGET podía explicarse por una falta de represión de la actividad de GAL80^{ts}, lo cual implicaba una clara limitación puesto que no es posible aumentar aún más la temperatura debido a los potenciales efectos sobre el comportamiento. Para superar este inconveniente se introdujo una segunda fuente de *schnurri*, a través de la línea transgénica UAS-*shn* (Marty et al., 2000). Esta nueva condición genética que denominamos *pdfG4,tubGAL80^{ts}>shn(2X)* permitió un nivel de expresión tal que el efecto de período se observó con claridad cuando las moscas fueron desarrolladas y evaluadas a 30°C. La puesta a punto permitió seleccionar la condición genética y las temperaturas a utilizar (25°C como permisiva y 30°C como restrictiva) de modo de poder evaluar la relevancia de *schnurri* en el control comportamental durante el estadio adulto.

La sobreexpresión de *schnurri* afecta el reloj circadiano específicamente en individuos adultos

Para poner a prueba la hipótesis de que *schnurri* afecta el período de un modo agudo en el estadio adulto, se examinó comportamentalmente animales con un desarrollo normal (criados a 25°C) los cuales fueron evaluados de modo secuencial, primero a 25°C y luego a 30°C (Blanchard et al., 2010). Específicamente, animales de 0 a 3 días de edad fueron cargados en los monitores de actividad y sometidos a una primera fase de entrenamiento, 12hs de luz y 12hs de oscuridad y 25°C, por 4 días. A continuación los animales se transfirieron a oscuridad constante manteniéndose la temperatura a 25°C por 9 días y durante el décimo se elevó la temperatura a 30°C, manteniendo a los animales en condiciones de oscuridad constante por los siguientes 9 días. Debido a la inusual longitud de este experimento el día en el que se modificó la temperatura también se procedió a un recambio de la fuente de alimento. De este modo fue posible evaluar, en el mismo

animal, la diferencia de período endógeno antes y después de la sobreexpresión de *schnurri*. La Figura 36 muestra como rápidamente luego del cambio de temperatura las moscas *pdfG4,tubGAL80^{ts}>shn(2X)* manifestaron un aumento en el período endógeno, mientras que los controles utilizados no evidenciaron un cambio de período al pasar de una temperatura a la otra.

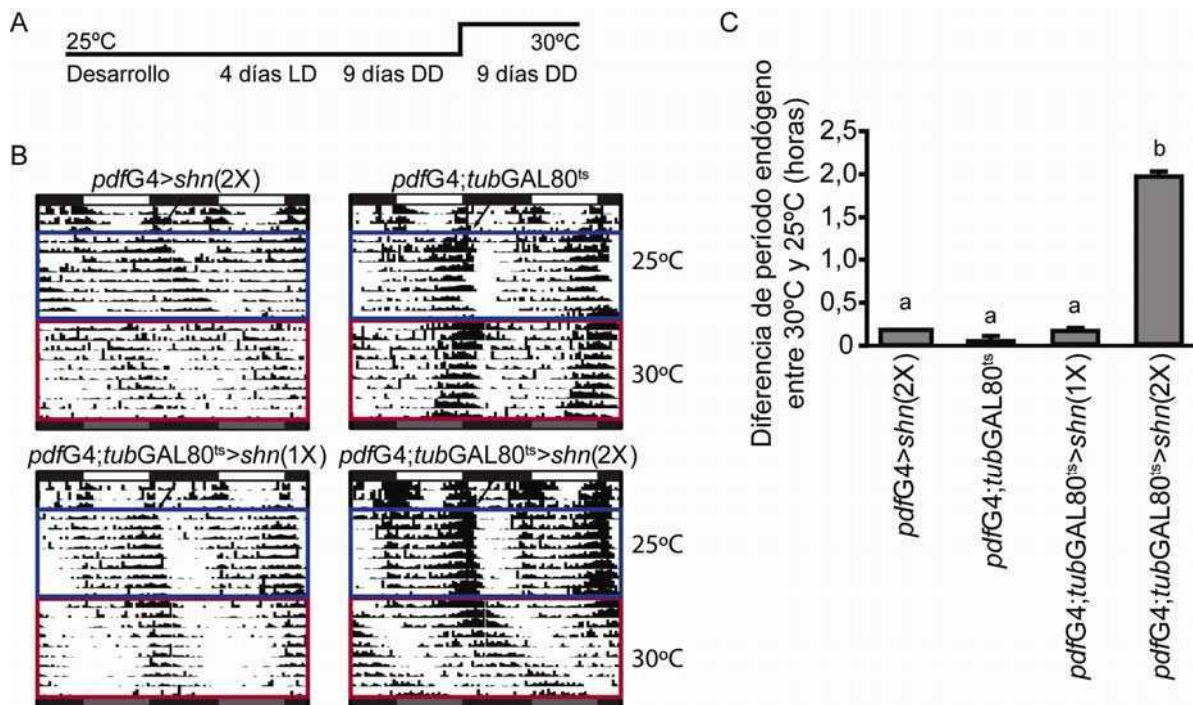


Figura 36. *schnurri* regula el comportamiento locomotor circadiano de modo agudo en el estadio adulto. (A) Esquema del tratamiento de temperatura e iluminación utilizado. (B) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. Los recuadros de color sobre los actogramas indican la fase de oscuridad, los recuadros azules indican 25°C y los rojos, 30°C. (C) Cuantificación del cambio de período que experimentan los animales al pasar de 25 a 30°C. ANOVA de 1 factor, $\alpha=0,05$ $F_{3,6}=474,64$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,219; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes, salvo en el caso de la línea *pdfG4>shn(2X)* en la que un valor fue descartado como dato aberrante.

Estos resultados muestran con claridad que elevados niveles de *schnurri* son capaces de generar un alargamiento del período endógeno de modo agudo en el estadio adulto, más allá de que su desregulación a lo largo del desarrollo pueda causar alguna otra alteración.

El alargamiento del período endógeno es independiente del defecto estructural

Teniendo en cuenta que el fenotipo comportamental es específico del estadio adulto (Figura 36), se procedió a evaluar si los efectos sobre la morfología del circuito (Figura 30) también se observaban al sobreexpresar *schnurri* sólo en animales adultos. Además, gracias a la existencia de un marcador de zonas activas de neurotransmisión química (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006) se pudo estudiar al mismo tiempo el efecto de la sobreexpresión aguda de *schnurri* sobre el número de zonas activas en las proyecciones dorsales de las sLNvs.

Para evaluar ambos aspectos en forma paralela se incorporaron dos transgenes: por un lado el UAS-*bruchpilot*^{GFP} (*brpgfp*, marcador de zonas activas) y por el otro el UAS-*cd8rfp* (la proteína Red Fluorecent Protein fusionada a la etiqueta CD8) de modo de poder visualizar las zonas activas y la membrana plasmática, respectivamente. Para este experimento las moscas se desarrollaron a 25°C, temperatura a la cual no hay expresión mediada por GAL4 debido a que GAL80^{ts} es funcional. Una vez eclosionados los adultos se separó a los machos y se los transfirió a la condición permisiva (30°C) durante dos o nueve días, prosiguiendo luego con la evaluación de la estructura del circuito PDF y de las proyecciones dorsales de las sLNvs (Figura 37). Se eligió estudiar las arborizaciones axonales luego de dos o nueve días de inducción con el objetivo de conocer el estado del circuito al principio y al final de un experimento comportamental, considerando que los animales evaluados en comportamiento fueron mantenidos a 30°C durante ese período de tiempo. Este experimento, a diferencia del comportamental, fue realizado en condiciones de sincronización, es decir, bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Esto se debe a que, para poder evaluar a todos los animales en el mismo momento circadiano, es necesario que las pautas ambientales estén presentes y así evitar diferencias que pudieran surgir debido a los períodos endógenos de los animales evaluados.

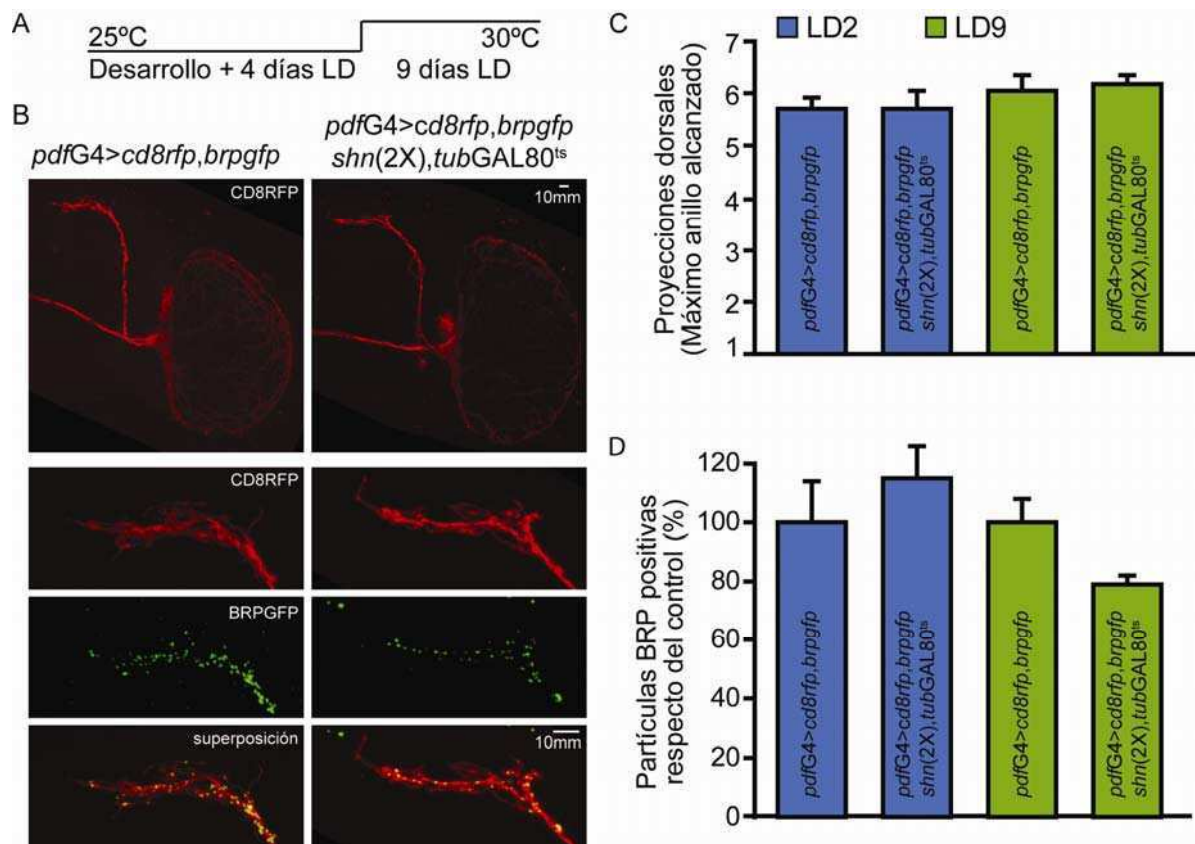


Figura 37. La sobreexpresión de *schnurri* en el adulto reduce el número de zonas activas en las proyecciones de las sLNvs mientras que no afecta la estructura del circuito. (A) Esquema del experimento; las moscas fueron desarrolladas a 25°C y mantenidas durante 4 días a esa temperatura para luego ser transferidas a 30°C por 2 o 9 días. (B) Se muestran proyecciones de galerías de imágenes obtenidas por microscopía confocal para moscas control y tratadas a LD9; en la parte superior se muestra un hemiserebro inmunomarcado para CD8RFP reportando la estructura general del circuito PDF; en la parte inferior se muestra con detalle la proyección dorsal del circuito PDF marcando en rojo CD8RFP y en verde BRP^{GFP}. (C) Cuantificación del largo del circuito por el método de Sholl modificado para LD 2 y LD9, se muestra el promedio de tres experimentos independientes. (D) Cuantificación relativa al control del número de partículas BRP como correlato del número de zonas activas de neurotransmisión química en LD2 y LD9, se muestra el promedio de tres experimentos independientes; dado que la varianza de las observaciones es mucho mayor en los individuos control que en los tratados no fue posible realizar ANOVA con estos datos.

La Figura 37 muestra que no existen diferencias morfológicas significativas en la estructura general del circuito, ni en el largo de las proyecciones dorsales del circuito PDF, entre animales que sufrieron la inducción específica de *schnurri* en el estadio adulto y animales controles, inclusive después de varios días (LD9) de inducción. Si bien la desregulación de la vía es capaz de provocar alteraciones estructurales al desregularse sostenidamente a lo largo de todo el desarrollo (Figura 30), estos resultados permiten desacoplar el fenotipo comportamental del efecto estructural generado por la activación

crónica de la vía de BMP. Es decir, al menos en la ventana de tiempo examinada en estos experimentos, la vía de BMP no provoca un efecto agudo en el estadio adulto sobre la estructura del circuito PDF. Por otro lado, estos resultados no permiten descartar que la activación aguda de la vía de DPP en el circuito PDF ya establecido pueda tener efectos sobre la ultraestructura del mismo, ya que no fue posible hacer un análisis mediante microscopía electrónica.

En cuanto al análisis de las zonas de liberación química, estos experimentos mostraron una reducción en el valor promedio del número de partículas BRP positivas a los 9 días de inducción respecto de animales control, mientras que no se observaron diferencias a los 2 días de tratamiento (Figura 37D). Considerando que el efecto comportamental de la sobreexpresión de *schnurri* es apreciable al segundo día de inducción y que el efecto de la vía de BMP sobre las zonas de liberación química parece ser progresiva en el tiempo, no es probable que este fenotipo sea la única causa del fenotipo comportamental.

***schnurri* modula el engranaje del reloj molecular**

Luego de la caracterización inicial del fenotipo obtenido en el rastillaje genético y de analizar la contribución de la vía de BMP en el comportamiento circadiano de animales adultos fue importante avanzar sobre los mecanismos celulares y moleculares que conforman la interacción entre el sistema circadiano y la vía de BMP.

La acumulación y entrada de PER al núcleo es demorada por la sobreexpresión de *schnurri*

Un gran número de trabajos han establecido la conexión entre las oscilaciones moleculares que tienen lugar en las neuronas sLN_vs y el período de la actividad locomotora de *Drosophila* (Akten et al., 2003; Berni et al., 2008; Stoleru et al., 2005). En particular, estudiar la acumulación y translocación al núcleo de PERIOD en estas neuronas ha sido una estrategia común para evaluar el funcionamiento del reloj endógeno. El curso temporal de PER se caracteriza por bajos o indetectables niveles de proteína hacia el final del día y el comienzo de la noche, que van aumentando y son marcadamente citoplasmáticos hacia la mitad de la noche. Al llegar al final de la noche, PER comienza a translocar al núcleo y es plenamente nuclear al final de la noche y principio del día siguiente. Luego, los niveles de PER van disminuyendo a lo largo del día hasta llegar a los bajos niveles característicos del final del día (Shafer et al., 2002). Par estudiar el efecto

de la sobreexpresión de *schnurri* en las sLNvs se evaluó la inmunoreactividad de PER en animales *pdfG4>shn,gfpn* respecto de genotipo control *pdfG4>gfpn*. Debido a que la diferencia de período en el comportamiento entre estas dos líneas es de 1 a 1,5 horas se decidió evaluar a los animales en la transición entre el tercer y el cuarto día de oscuridad constante, y con una resolución de tres horas. Al evaluar este momento del día fue posible estudiar específicamente la ventana temporal en la que ocurre la translocación de PER al núcleo, y al realizar el experimento luego de tres días de curso libre y con una resolución de tres horas fue posible visualizar diferencias en la acumulación y translocación entre animales controles y tratados.

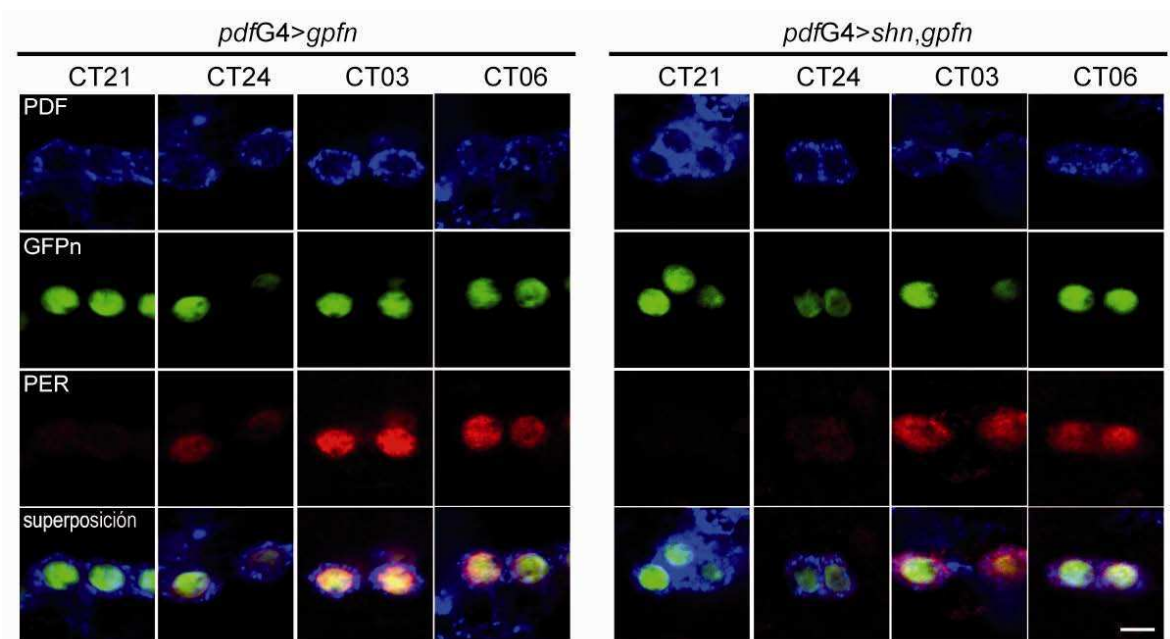


Figura 38. SHN retrasa la acumulación de PER en las sLNvs. Se muestran imágenes representativas de secciones confocales de neuronas sLNvs de los genotipos indicados. En la primera fila de imágenes se muestra la señal para PDF, que se utilizó para reconocer las neuronas LNvs; en la segunda fila se muestra la señal para GFP, utilizada para delimitar el núcleo de las LNvs; en la tercera fila se encuentra la inmunoreactividad para PER; y la cuarta fila muestra la superposición de los tres canales anteriormente mostrados. CT: Tiempo Circadiano.

Como se observa en la Figura 38 la acumulación de PER se encuentra retrasada en animales que sobreexpresan *schnurri* respecto de los animales controles. Esta diferencia es evidente a CT24 donde PER ya muestra una localización nuclear en el control mientras que en las neuronas de los animales *pdfG4>shn,gfpn* PER se encuentra citoplasmática y con baja intensidad. También a CT03 la diferencia es clara, observándose una localización marcadamente nuclear en el control y ubicada en los animales tratados.

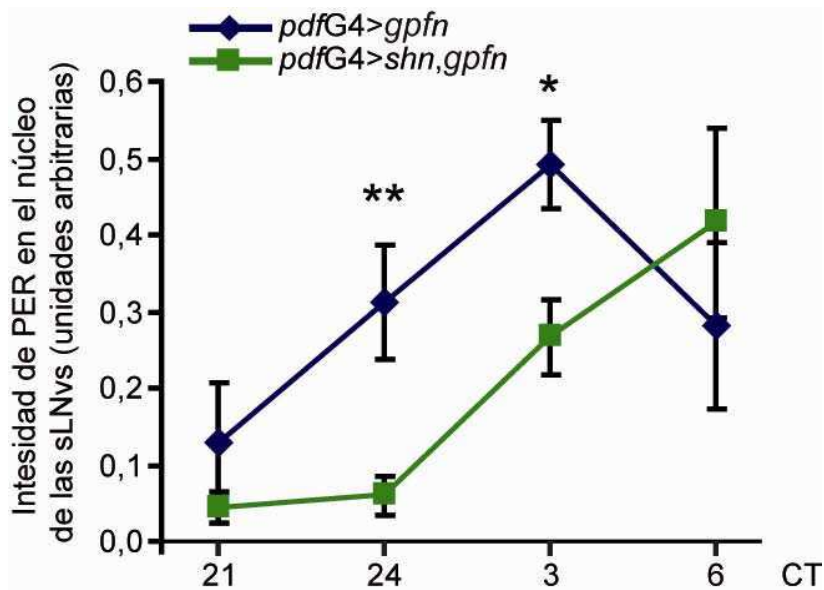


Figura 39. La acumulación de PER está retrasada, pero alcanza niveles normales. Se muestran la cuantificación de las imágenes mostradas en la Figura 24. CT: Tiempo Circadiano. ANOVA de 2 factores para genotipo y CT. La interacción obtuvo $F_{3,16}=2,71$ $p=0,0795$ y al analizar los efectos simples para los diferentes CTs en cada uno de los genotipos se obtuvo CT21 $F_{1,16}=0,521$ $p=0,481$; CT24 $F_{1,16}=4,717$ $p=0,0452$ (**); CT03 $F_{1,16}=3,8$ $p=0,067$ (*), CT06 $F_{1,16}=1,335$ $p=0,265$. El análisis corresponde a tres experimentos independientes.

Al cuantificar la intensidad de PER en el núcleo (Figura 39) se ve claramente el retardo en la acumulación nuclear de PER; cabe destacar que, aunque con un retraso, los niveles totales de PER en el núcleo de los animales tratados no difiere de lo observado para los controles tres horas antes.

El fenotipo de período largo es rescatado por *period* y *timeless*

Considerando que *schnurri* constituye un regulador negativo de la transcripción dentro de la vía de BMP, los resultados de las Figuras 38 y 39 permitieron sustentar la hipótesis de que el retraso en la acumulación de PER en las neuronas sLNvs podía deberse a un efecto transcripcional sobre *per* por parte de *schnurri*. Para poner a prueba esta hipótesis se diseñó un ensayo de interacciones génicas entre *schnurri* y *period*, analizando el resultado a través de la evaluación de la actividad locomotora.

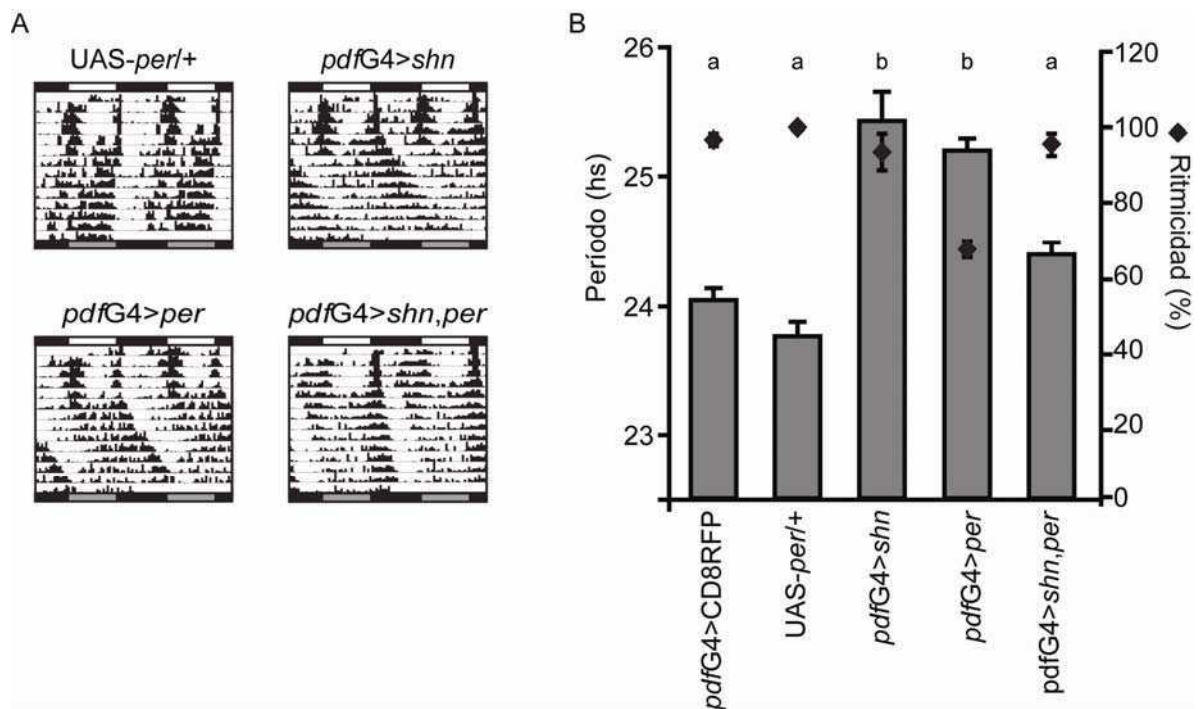


Figura 40. El ORF de *per* rescata el fenotipo de período largo de *pdfG4*>*shn*. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestra el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período $\alpha=0,05$ $F_{9,13}=23,09$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,716; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

La Figura 40 muestra que el efecto de sobreexpresar independientemente el ORF tanto de *per* como de *shn* en el circuito PDF produce un alargamiento del período endógeno. En cambio, cuando se expresan ambos genes simultáneamente los animales muestran un período en su actividad locomotora cercano a 24 horas y significativamente menor que los períodos de *pdfG4*>*per* y *pdfG4*>*shn*. Este resultado marca una clara interacción entre estas dos vías de señalización pero además representa un rescate del fenotipo comportamental de ambas desregulaciones. Con el objetivo de profundizar el análisis de la interacción génica, se utilizó la línea transgénica que es capaz de aumentar los niveles transcripcionales de *per* al aportar una copia extra del locus completo de éste (*perG*), proveyendo así las secuencias regulatorias de la transcripción y generando transcritos silvestres capaces de interactuar con la maquinaria postranscripcional. En contraposición a lo que ocurre con la sobreexpresión del ORF de *per* en el circuito PDF, las moscas que portan este segundo locus de *per* en su genoma muestran períodos de actividad locomotora menores a 24 horas, es decir, más cortos que el de moscas

silvestres (Smith and Konopka, 1982). Al combinar esta transgénica con las moscas que sobreexpresan *schurri* en las LNVs se observó un rescate de ambos fenotipos, obteniéndose moscas con períodos cercanos a 24 horas (Figura 41).

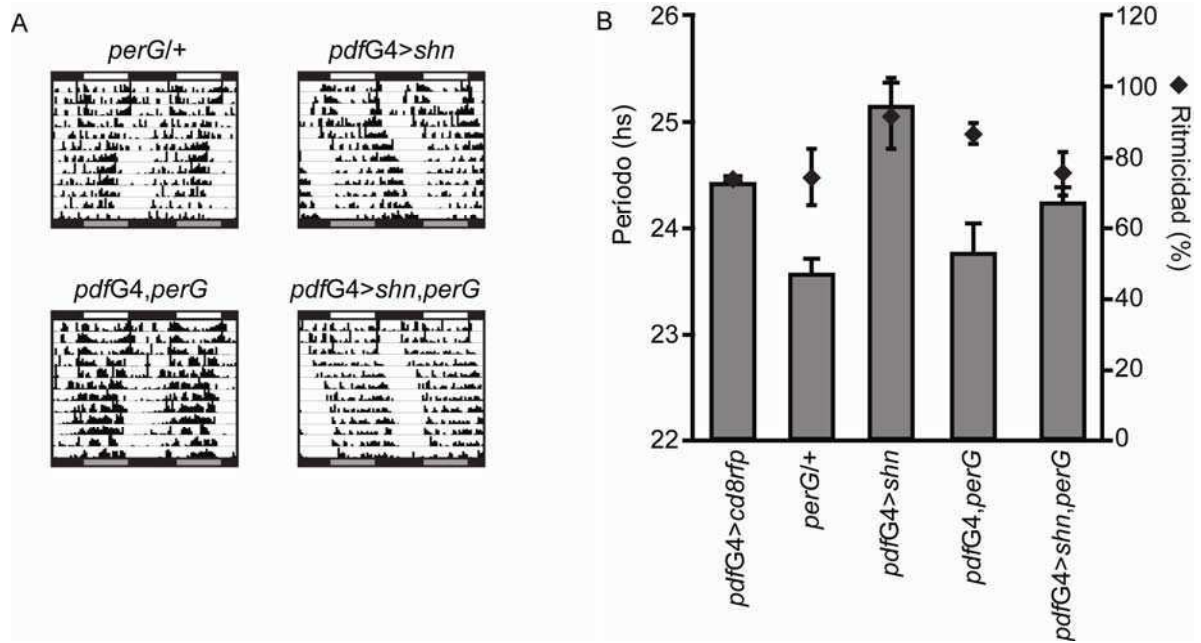


Figura 41. Una copia extra del locus de *period* rescata el fenotipo de período largo de *pdfG4>shn*. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. Dado que la varianza de algunos de los genotipos es mucho mayor que la de otros no fue posible realizar ANOVA con estos datos.

Considerando que el aumento de los niveles de PER permite rescatar el fenotipo de sobreexpresión de *schurri* y que sólo se había estudiado la dinámica temporal de PER en las sLNVs, no era posible descartar la posibilidad de que el efecto sobre *per* fuese indirecto, y que otras moléculas del reloj sean también capaces de modular el fenotipo comportamental. Para evaluar esa posibilidad se utilizó una línea transgénica que permite sobreexpresar el ORF de *timeless* y se realizó el análisis de interacción génica idéntico al descrito previamente para *period*. La sobreexpresión de TIM en las sLNVs no causa un efecto de período por sí mismo, pero al aumentar los niveles de TIM y SHN en conjunto se observó un rescate del fenotipo de período de la sobreexpresión de *schurri* similar al obtenido con PER (Figura 42).

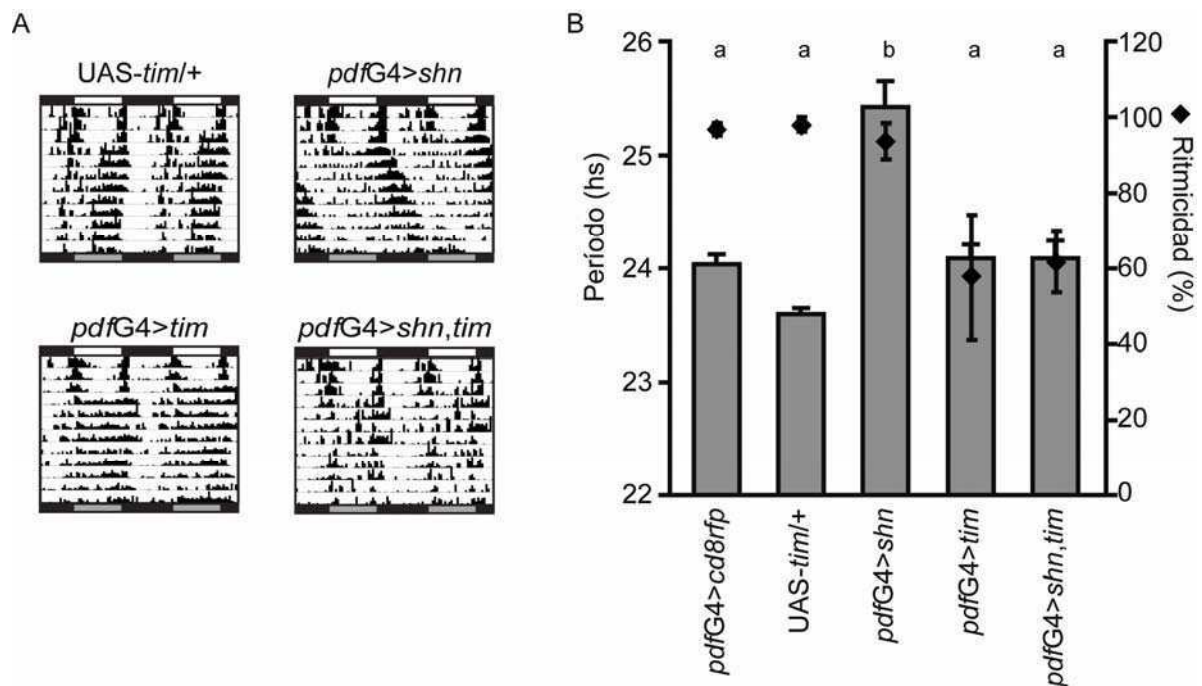


Figura 42. El ORF de *tim* rescata el fenotipo de período largo de *pdfG4*>*shn*. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestra el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período $\alpha=0,05$ $F_{10-14}=23,1$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,668; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos independientes.

La quinasa *shaggy* modula los fenotipos de sobreexpresión de SHN

El hecho de que tanto *per* como *tim* sean capaces de modular el fenotipo comportamental refuerza la idea de un efecto indirecto sobre ambos genes. Dos componentes centrales del reloj son capaces de regular estos dos genes de modo simultáneamente. En cuanto a la localización subcelular de PER y TIM, y en particular la translocación al núcleo del dímero, este proceso se encuentra controlado por la quinasa SHAGGY (Martinek et al., 2001). Por otra parte, desde un punto de vista transcripcional, el regulador común de *per* y *tim* es *clock*, que al unirse junto con CYCLE a las secuencias E-BOX presentes en los promotores de *per* y *tim* activa su transcripción (Darlington et al., 1998) (Figura 3).

Teniendo en cuenta estos datos de la bibliografía se analizó la existencia de interacciones génicas entre estos componentes claves del reloj molecular y la vía, utilizando el comportamiento locomotor como método para evaluar la interacción.

Dado su rol central en la determinación de la localización subcelular de PER y TIM, y la jerarquía del circuito PDF en la determinación del período endógeno de la actividad locomotora, aumentar o disminuir los niveles de *sgg* en el circuito PDF tiene claros efectos

sobre el período. En resumen, aumentar los niveles de *sgg* acelera el reloj generando períodos cortos (Martinek et al., 2001) y disminuir los niveles de *sgg* retarda el reloj conduciendo a períodos largos. Además, dadas las propiedades circuitales del sistema circadiano, aumentar los niveles de *sgg* sólo en las neuronas PDF conlleva no sólo a períodos cortos sino también a una pérdida de la ritmicidad. Al aumentar de modo conjunto los niveles de *sgg* y *shn* en el circuito PDF se observó un rescate de ambos fenotipos; el período endógeno fue más cercano al de animales silvestres y la ritmicidad se vio fuertemente incrementada (Figura 43).

El fenotipo de arritmicidad producto de sobreexpresar *sgg* sólo en las neuronas PDF+ no se observa si se amplía el patrón de sobreexpresión a todo el circuito circadiano mediante la utilización del promotor de *timeless*, generándose períodos cortos pero con alta ritmicidad, ya que todo el circuito neuronal se encuentra en iguales condiciones. Al sobreexpresar de modo conjunto SHN y SGG en el patrón de *tim* también ocurre un rescate de período, mientras que la ritmicidad no se ve afectada (datos no mostrados).

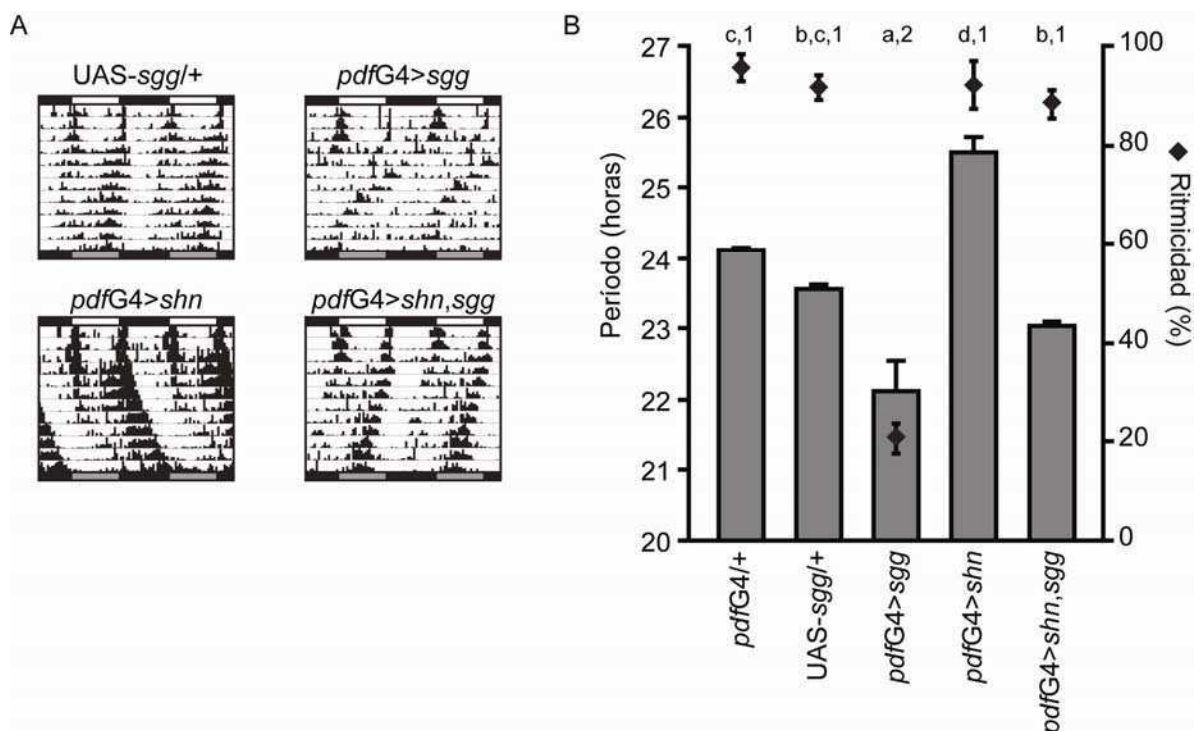


Figura 43. La sobreexpresión de *shaggy* revierte el fenotipo de sobreexpresar *schnurri*. (A) La figura muestra actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestra el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período $\alpha=0,05$ $F_{9-13}=72,27$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,737; las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes salvo para *pdfG4*>*SGG* en la que un valor fue descartado como dato aberrante. ANOVA de 1 factor para el

análisis de ritmicidad $\alpha=0,05$ $F_{4-14}=194,73$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=10,519; las medias con un número común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes.

Por su parte, disminuir *sgg* mediante la expresión de un ARNi en el circuito PDF pero en el contexto de sobreexpresión de *shn* produjo dos fenotipos comportamentales. Un 60% de los animales mostraron una clara ritmicidad pero con períodos extremadamente largos, de alrededor de 28 horas. El restante 40% de los animales evidenciaron ritmos complejos, caracterizados por más de un componente de período, se observaron períodos silvestres y períodos largos dentro del patrón comportamental de varios individuos. (Figura 44).

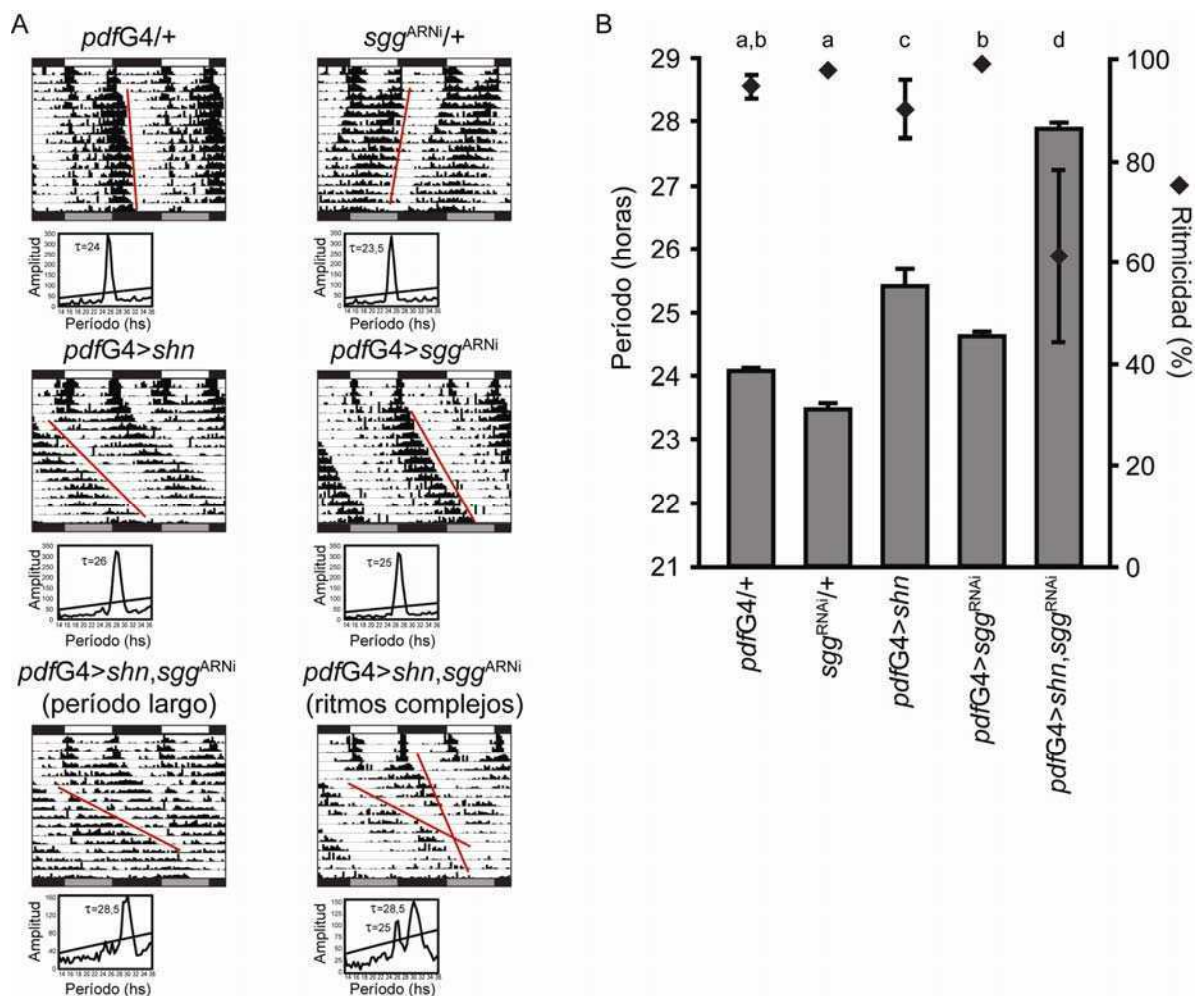


Figura 44. Disminuir los niveles de *shaggy* y sobreexpresar *schnurri* muestra la interacción entre el reloj molecular y la vía de BMP. (A) La figura muestra actogramas representativos de los genotipos indicados y sus respectivos periodogramas; con la intención de

visualizar y calcular más eficientemente las componentes de período en este experimento se consideraron 14 días de oscuridad constante. Las líneas rojas indican las componentes de período detectadas en los peridogramas. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período $\alpha=0,05$ $F_{14-18}=141,73$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,633, medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.

Para profundizar el análisis de la interacción entre elevados niveles de *shn* y bajos niveles de *sgg* se realizaron los mismos experimentos antes mencionados pero añadiendo la sobreexpresión de *dicer2*, componente clave de la vía de ARN de interferencia. El agregado de *dicer2* potencia el funcionamiento del sistema de interferencia, lo cual quedó evidenciado en el aumento de período observado en el genotipo *pdfG4>sgg^{ARNi},dicer2* respecto de *pdfG4>sgg^{ARNi}*. Bajar los niveles de *sgg* utilizando *dicer2* en el contexto de la sobreexpresión de *shn* genera un aumento sustancial de la proporción de animales que muestran ritmos complejos (Figura 45), observándose componentes de período largo, silvestre y corto en varios individuos (Figura 46).

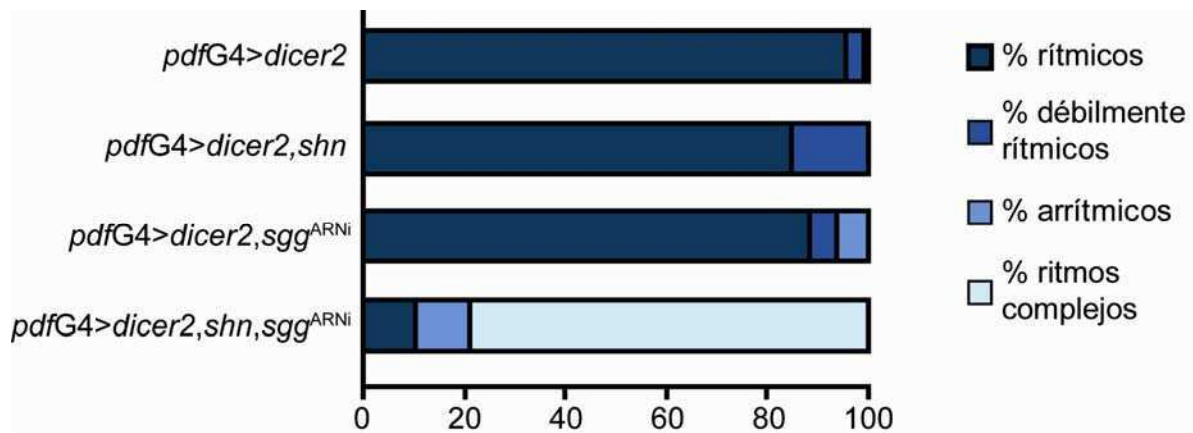


Figura 45. Exacerbar la interferencia para *sgg* en el contexto de sobreexpresión de *shn* genera ritmos complejos. Se muestran los porcentajes de animales rítmicos, débilmente rítmicos, arrítmicos y con ritmos complejos para los genotipos indicados. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.

En conjunto, los experimentos de interacción con *sgg* muestran que esta molécula central en la determinación del paso de las oscilaciones moleculares es capaz de modular los efectos que *schnurri* impone sobre el reloj molecular.

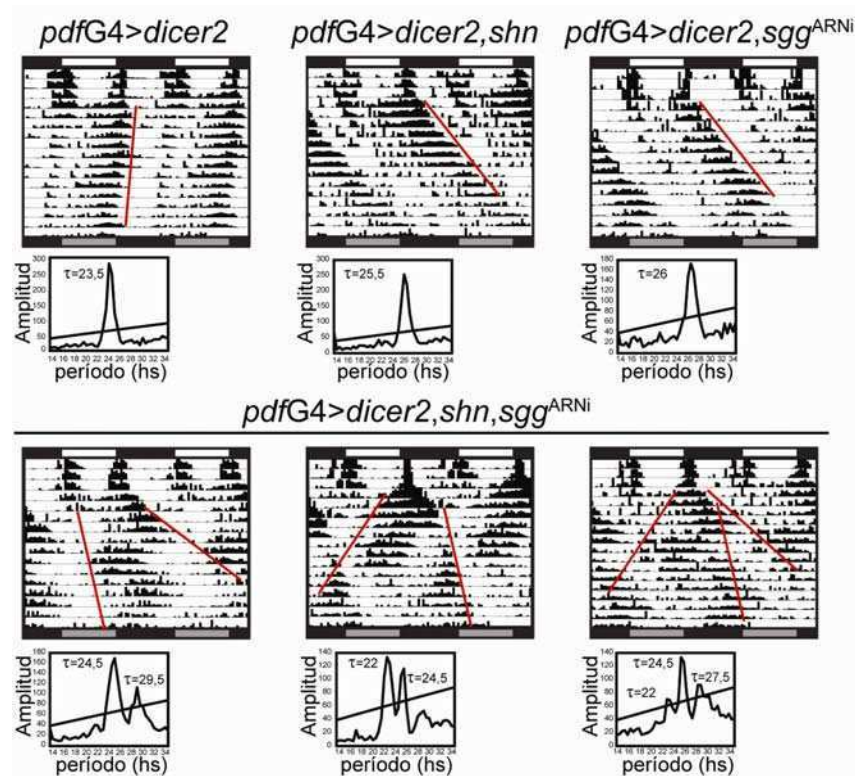


Figura 46. Los ritmos complejos observados presentan diversos fenotipos comportamentales. La figura muestra actogramas representativos de los genotipos indicados y sus respectivos periodogramas. Con la intención de visualizar y calcular más eficientemente las componentes de período en este experimento se consideraron 14 días de oscuridad constante. Las líneas rojas indican las componentes de período detectadas en los periodogramas. Se muestran tres ejemplos de actogramas correspondientes al genotipo *pdfG4>dicer2,shn,sgg^{ARNi}* que ejemplifican los ritmos complejos encontrados.

El factor de transcripción *clock* modula el fenotipo de sobreexpresión de SHN

Como se ha descrito anteriormente, el componente del reloj molecular capaz de modular transcripcionalmente y de modo conjunto a *per* y *tim* es *clock*. Al realizar los experimentos de interacción con líneas transgénicas capaces de aumentar los niveles de *clk* tanto a través de la sobreexpresión del ORF como a través de proveer una copia adicional del locus entero de *clock* se observó una interacción en los fenotipos comportamentales.

Elevar los niveles de *clk* a través del ORF genera una leve disminución del período, pero al combinarlo con la sobreexpresión de *shn* fue capaz de revertir el fenotipo comportamental generando períodos de alrededor de 24 horas (Figura 47).

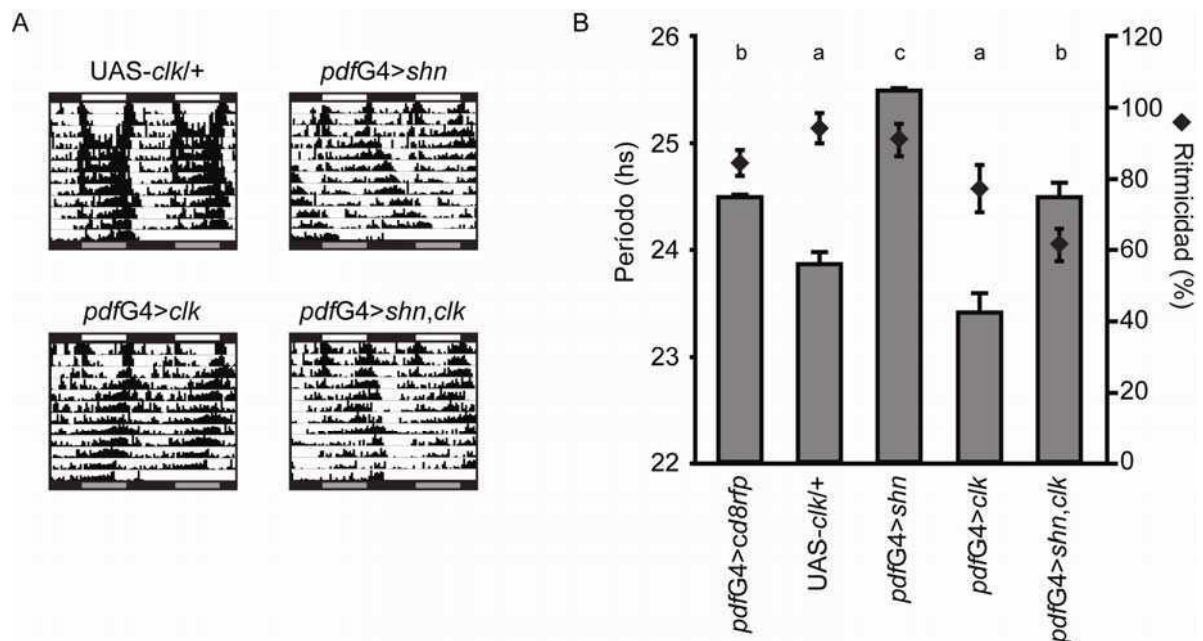


Figura 47. El ORF de *clk* rescata el fenotipo de período largo de *pdfG4>shn*. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. ANOVA de 1 factor para el análisis de período $\alpha=0,05$ $F_{10-14}=44,21$; comparaciones de Tukey $\alpha=0,05$ DMS=0,546, medias con una letra común no son significativamente diferentes. Los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos independientes.

Por su parte, la presencia de una copia extra del locus de *clock* (a través de la línea transgénica *clkG*) presenta también períodos endógenos levemente cortos respecto de animales silvestres (Kadener et al., 2008). En cambio, al combinar esa línea transgénicas con la sobreexpresión de *shn* los períodos que se obtuvieron son de 24 horas, es decir, el fenotipo de sobreexpresión de *shn* se ve claramente rescatado también con esta herramienta genética (Figura 48).

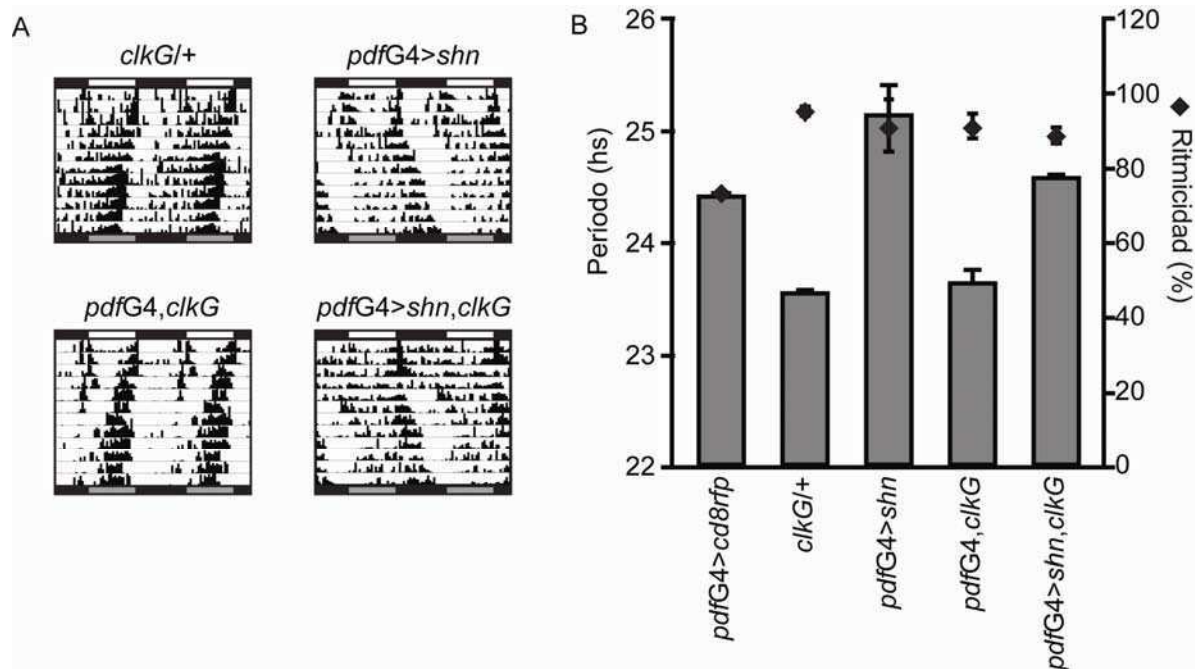


Figura 48. Una copia extra del locus de *clock* rescata el fenotipo de período largo de *pdfG4>shn*. (A) Se muestran actogramas representativos de los genotipos indicados. (B) Se muestran el período promedio (barras grises) y el porcentaje de ritmicidad (rombos negros) de los genotipos indicados. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. Dado que la varianza de algunos de los genotipos es mucho mayor que la de otros no fue posible realizar ANOVA con estos datos.

Los promotores de *period* y *timeless* son modulados por *schnurri*

La capacidad de *clk* de modular el efecto comportamental de *schnurri* en conjunto con la capacidad de *per* y *tim* de realizar el mismo efecto y la caracterización previa de *shn* como un regulador negativo de la transcripción apuntan a un efecto transcripcional por parte de la vía de BMP sobre el reloj molecular. Para estudiar de manera específica la situación de los promotores de los genes reloj se utilizaron líneas transgénicas de moscas que tienen la proteína *luciferasa* bajo la regulación de los promotores de *period* y *timeless* (Stanewsky et al., 1997). Para evaluar la actividad de los promotores se realizaron extractos de proteínas totales de cabeza de moscas controles o moscas que sobreexpresaban *shn* en todo el circuito circadiano a través del promotor de *timeless*. Obtenidos los extractos, estos fueron incubados con el sustrato *luciferina* y se evaluó la luminiscencia en un luminómetro de placa (Maitra et al., 2002).

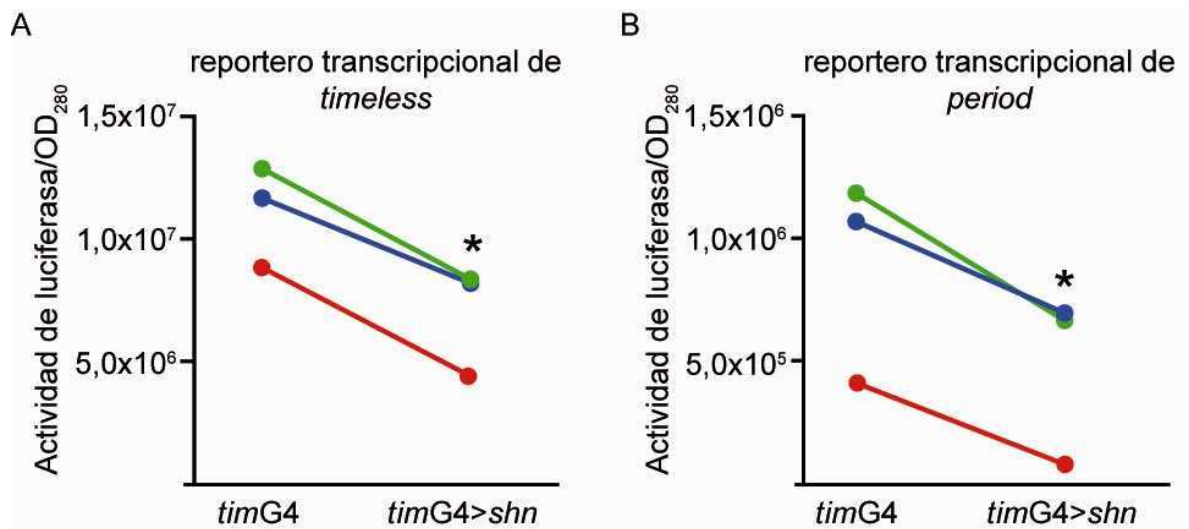


Figura 49. Los promotores de *per* y *tim* responden a los niveles de *shn*. (A-B) Se muestran los gráficos de paralelismo de un ANOVA con diseño en bloque aleatorizado (DBA), cada color denota los resultados obtenidos en un mismo experimento independiente, siendo ese el criterio utilizado para conformar los bloques del ANOVA. (A) Análisis del promotor de *timeless* en cabezas de moscas control (*timG4/+*) o que sobreexpresan *shn* en todo el circuito circadiano (*timG4>shn*); $F_{1,2} = 154,87$ p del tratamiento $< 0,01$. (B) Análisis del promotor de *period* en cabezas de moscas control (*timG4/+*) o que sobreexpresan *shn* en todo el circuito circadiano (*timG4>shn*); $F_{1,2} = 52,09$ p del tratamiento $< 0,05$.

La Figura 49 muestra que las mediciones de actividad de luciferasa reportaron una disminución de un 40% en la actividad de los promotores de *period* y *timeless*, indicando un claro efecto transcripcional por parte de la vía de BMP sobre los promotores circadianos.

Como una estrategia alternativa para evaluar la actividad del promotor de *per*, y además evaluar su funcionalidad específicamente en las neuronas sLNvs, se utilizó una línea transgénica *perG4* para dirigir la expresión de GFPn a partir de la línea UAS *gfpn*. Se evaluó la inmunoreactividad de GFPn en animales *perG4>gfpn* en comparación con animales *perG4>shn,gfpn* específicamente en las neuronas sLNvs.

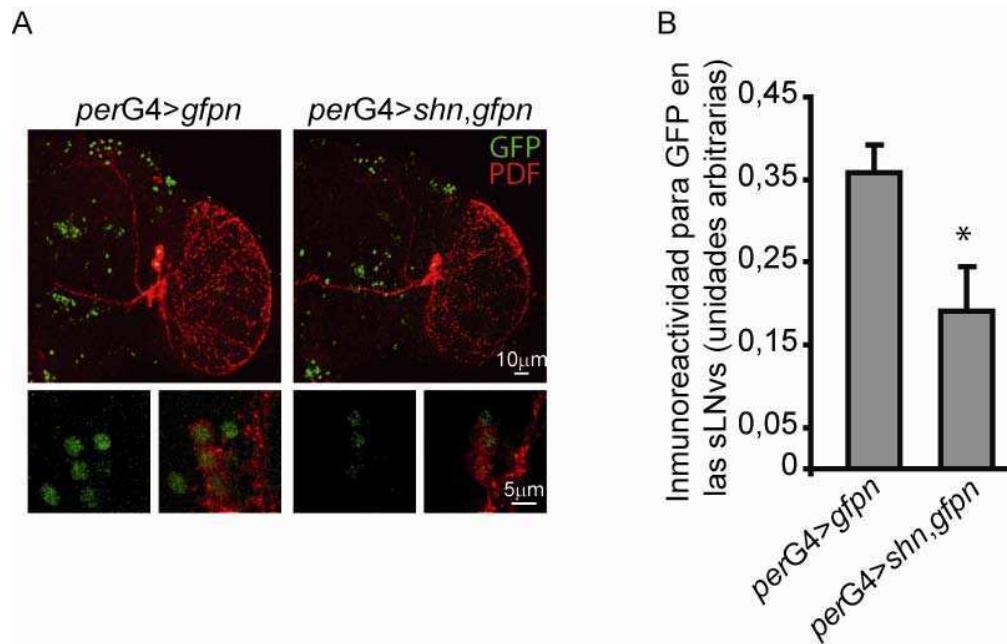


Figura 50. La vía de BMP regula el promotor de *per* en las sLNvs. (A) Se muestran imágenes representativas de hemisferios o neuronas sLNvs de los genotipos indicados. Las imágenes fueron obtenidas a partir de proyecciones de secciones confocales. En verde se marcan los núcleos de las neuronas *period* positivas y en rojo se muestra la inmunoreactividad para PDF. (B) Cuantificación de la inmunoreactividad para PER en las sLNvs. Se muestra el resultado de 6 experimentos independientes. ANOVA 1 Factor $\alpha=0.05$ $F_{1,10}=6,85$, $p<0,05$.

La Figura 50 muestra que, además de una disminución global de la intensidad de la señal de GFP en el protocerebro, la medición de la inmunoreactividad de GFP en las sLNvs se encuentra disminuida, confirmando un efecto (directo o indirecto) de la vía de señalización de BMP sobre la transcripción de *period*.

Discusión y conclusiones

Las estrategias de genética directa, como los rastrillajes genéticos con mutantes de *Drosophila*, son una herramienta válida y probadamente exitosa para estudiar las bases genéticas de procesos fisiológicos muy diversos. Muchos comportamientos específicos de los individuos adultos son prueba de ello, y el comportamiento circadiano en particular es un ejemplo en el que esta estrategia ha sido particularmente exitosa (Allada et al., 1998; Blanchard et al., 2010; Konopka and Benzer, 1971; Price et al., 1998; Rutila et al., 1998; Sehgal et al., 1994; Stanewsky et al., 1998; Yu et al., 2011).

El caso del rastrillaje genético que dio origen a esta tesis doctoral tuvo la particularidad de ser específicamente diseñado para encontrar genes vinculados al sistema circadiano cuya función fuese indispensable en el desarrollo embrionario y/o en la vida adulta; los resultados aquí mostrados son prueba del éxito de esta aproximación experimental. A través de este enfoque se identificó un gen, y así una vía de señalización, capaz de modular el paso de las oscilaciones moleculares y el comportamiento locomotor rítmico. La vía de señalización de BMP, y en particular *schnurri*, regula transcripcionalmente genes centrales del reloj molecular, modulando el sistema circadiano de individuos adultos.

Gracias a las múltiples herramientas que brinda un sistema modelo tan masivamente utilizado como *Drosophila* ha sido posible evaluar a lo largo de la vida adulta el rol de la vía en el comportamiento. Por consiguiente, estos resultados constituyen, hasta el momento, el primer cuerpo de evidencia que vincula el funcionamiento de la vía de señalización de la superfamilia de TGF β con un comportamiento específico y repetitivo de individuos adultos como es el patrón circadiano de la actividad locomotora.

El mutante identificado en el rastrillaje genético media la sobreexpresión de *schnurri*, y el fenotipo asociado a generar esta desregulación en el circuito PDF es un alargamiento del período endógeno de la actividad locomotora. Al momento de iniciar este trabajo de tesis los desafíos centrales que se planteaban ante el hallazgo de ese fenotipo mutante eran: (1) ¿El mutante encontrado afecta específicamente a este gen? (2) ¿Se expresa *schnurri* en el circuito PDF? (3) ¿Su función en este circuito está o no vinculada al funcionamiento del mismo en términos de su rol en el comportamiento? (4) Más allá de *schnurri*, ¿es la vía de BMP relevante en el comportamiento locomotor circadiano? (5) Esta vía de señalización ¿afecta el comportamiento de un modo adulto específico? (6) ¿A qué nivel y a través de qué mecanismos interactúan estas moléculas con el sistema circadiano?. A lo largo de esta tesis se han utilizado diversas estrategias para encarar estos interrogantes, los cuales serán discutidos en las secciones siguientes.

Sobreexpresar *schnurri* modula el comportamiento locomotor circadiano

Para demostrar que la inserción aislada durante el rastrillaje genético afectaba específicamente el gen *schnurri* y que mediaba su sobreexpresión en respuesta a una fuente de GAL4 se utilizaron diversas estrategias. La escisión del transposón con la consiguiente reversión del fenotipo comportamental demostró que la inserción en el locus de *schnurri* era responsable del fenotipo, y la medición por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de *schnurri* en animales *hsG4>756* demostró que la inserción mediaba la sobreexpresión de la variante B del locus. Dos experimentos adicionales fueron centrales para demostrar la especificidad del fenotipo: por un lado la posibilidad de contar con una línea independiente que mediara la sobreexpresión del ORF de *schnurri* obteniendo el mismo resultado sobre el comportamiento, y por otro la reversión del fenotipo comportamental mediada por una línea transgénica diseñada para disminuir los niveles transcripcionales de todo el locus.

schnurri se expresa en el circuito PDF y su función es central para el período circadiano

Un segundo punto central para el desarrollo de la tesis fue determinar el rol circadiano de *schnurri* y la especificidad del fenotipo, dado que el hallazgo inicial se trataba de una sobreexpresión. El perfil de expresión de las neuronas sLNvs aportaron un dato central sobre la presencia de *schnurri* en este circuito neuronal (Kula-Eversole et al., 2010); sin embargo, un análisis más global del perfil de transcripción de genes que oscilan en la cabeza en animales silvestres muestra que ninguno de los componentes de la vía de TGF β oscila de modo consistente (Ceriani et al., 2002). Además, la posibilidad de contar con una herramienta que específicamente disminuye los niveles transcripcionales de *schnurri* permitió demostrar que la función de este gen es importante para mantener un comportamiento locomotor rítmico, y reforzar el concepto de que el circuito PDF es determinante para el normal funcionamiento de la red neuronal que controla el comportamiento locomotor.

En cuanto a la jerarquía que tiene el efecto de *schnurri* sobre el reloj circadiano, el análisis del ritmo de eclosión sugería que, sin importar cual fuese la desregulación que estuviese ocurriendo, el efecto de la sobreexpresión era suficientemente central como para afectar dos comportamientos diferentes, controlados por el mismo circuito. Estos resultados apoyaron la hipótesis de un efecto general de este gen sobre el período endógeno y no un efecto específico sobre una vía de salida del oscilador central.

La vía de BMP es determinante para actividad locomotora rítmica

Debido a la trascendencia de la vía de señalización de la que forma parte *schnurri*, y considerando que su rol no ha sido explorado en ninguno de los reportes que vinculan a esta vía con el funcionamiento del sistema nervioso, fue importante indagar si existía un efecto sobre el comportamiento locomotor por parte de otros componentes de la vía. Tanto los experimentos de falta de función como los de ganancia de función demostraron que los receptores tipo I y tipo II SAX, TKV y WIT son determinantes del comportamiento locomotor adulto.

Una particularidad de los experimentos realizados con las variantes constitutivamente activas de los receptores SAX y TKV es que la penetrancia de sus fenotipos no fue siempre del 100%. Al iniciar esa serie de experimentos se observó que las poblaciones de animales, presuntamente homogéneas, que expresaban ambas variantes presentaban animales con períodos extremadamente largos (con promedio de 27,4 horas) y otros indistinguibles de animales silvestres. Para descartar errores y profundizar la caracterización del funcionamiento de estos transgenes se corroboró la genética detrás de la obtención de los genotipos deseados y se probaron diversos esquemas de cruzamientos. Como resultado se identificó una combinación genética en la que reproduciblemente todos los animales presentaron el fenotipo de período largo, y son los que se incluyeron en la sección de resultados. No fue explorada la causa por la cual diferentes esquemas de cruzamiento dieran lugar a poblaciones con comportamiento "bimodal", sin obtenerse nunca fenotipos intermedios (lo cual se refleja en que no hay una gran dispersión de períodos, como se desprende de los valores del desvío estándar en la Figura 34). Una hipótesis interesante, aunque no testeada, es que la vía requiera un nivel umbral de activación para desencadenar su efecto sobre el comportamiento, y que las diferentes combinaciones de fondos genéticos afecten sutilmente los niveles de expresión (y por lo tanto, permitan alcanzar o no ese umbral) así como afectan levemente los períodos endógenos de actividad locomotora.

Una observación interesante que surge de la evaluación conjunta de los distintos experimentos en los que se modula la vía por sobreactivación o por disminución de los niveles de sus componentes, es que siempre se encontró el mismo patrón en los resultados: mientras que la falta de función, obtenida por la expresión de ARN de interferencia en el circuito PDF, generaba falta de consolidación de la actividad locomotora y en los casos extremos conducía a la arritmicidad, la sobreactivación de la vía, también en el circuito PDF, conducía a períodos largos y afectaba muy poco la ritmicidad, lo cual se puso de manifiesto tanto en experimentos que implican la sobreexpresión de *shn* como los receptores de la vía.

Si bien podría haber ocurrido que sobreactivar conduzca a períodos largos e interferir genere períodos cortos, estos no fueron los resultados observados. Una posible interpretación se basa en que, para operar un circuito de retroalimentación negativa como el que sustenta las oscilaciones moleculares circadianas, se necesita de la presencia estable a lo largo de los días de un alto número de componentes. Alterar esa maquinaria agregando en exceso algún componente podría alterar el paso de la oscilación (y el signo negativo o positivo de esa alteración depender del componente y del modo en que la red de interacciones responde a esa perturbación), pero quitar un componente podría generar la interrupción de la oscilación al desensamblar la red que la sustenta.

El circuito PDF es particularmente afectado por esta vía de señalización

Las 150 células que conforman el circuito neuronal circadiano son, sin duda, fundamentales para generar y sostener la ritmicidad con un período de 24 horas. Dentro de esa red, las neuronas sLNvs, que expresan el neuropéptido PDF, son determinantes para establecer el período y sostener la ritmicidad en condiciones de oscuridad constante (Lin et al., 2004; Park and Hall, 1998; Renn et al., 1999; Shafer and Taghert, 2009; Stoleru et al., 2004; Yoshii et al., 2009b).

Las neuronas inmunoreactivas para PDF son necesarias y suficientes para transmitir al comportamiento locomotor los efectos de la sobreexpresión de *schnurri*. Se define que la sobreexpresión en el circuito PDF es *necesaria* para mediar el efecto de esta desregulación puesto que, aunque se sobreexpresa *shn* en todo el resto del circuito circadiano, no se observan dichos cambios a menos que se afecten sus niveles en esas neuronas. Asimismo, se la define como *suficiente* puesto que al provocar la activación de la vía en estas neuronas, ya sea a través de *schnurri* como con las variantes constitutivamente activas de los receptores, es posible generar aumentos en el período endógeno; y el mismo razonamiento se sustenta en los efectos causados al interferir la expresión de *shn* y los receptores.

Considerando la jerarquía de las sLNvs en el control de los ciclos de actividad y reposo este resultado no es del todo sorprendente; de hecho, esto no quiere decir que no exista un efecto por parte de la vía en otros grupos neuronales que conforman la red, sino que no se ve reflejado en un aumento del período. En los animales *timG4, pdfGal80 > shn* el período endógeno de 24 horas reflejaría el de las sLNvs, e independientemente que el resto de los grupos neuronales tengan un período endógeno de 25,5hs, estos serían aun susceptibles de ser sincronizados por las sLNvs. Alternativamente, las neuronas TIM positivas/PDF negativas podrían ser insensibles a la regulación por parte de *schnurri*. Más allá de que ésta es una posibilidad formal, los resultados obtenidos utilizando *luciferasa* como reportero

transcripcional (Figura 49) sugieren que no es el caso. Sería difícil haber detectado diferencias en los niveles de expresión de los promotores de *period* y *timeless* si solamente las neuronas PDF contribuyeran a esa regulación en los genotipos evaluados, en los que el reportero se expresó en toda la red circadiana.

La vía de BMP cumple un papel fundamental en el estadio adulto.

Los reportes previos que estudian la función de *schnurri* han sido todos realizados durante el desarrollo embrionario o larval y la caracterización de la función de esta vía de señalización en el sistema nervioso está centrada en su rol en el desarrollo y en el mantenimiento de la función sináptica durante estadios larvales (Affolter and Basler, 2007; Moustakas and Heldin, 2009). Esto hizo muy relevante discernir cuáles de los efectos observados al modular esta vía en el circuito PDF eran producto de un desarrollo alterado y cuáles obedecían a un efecto agudo de la función de la vía en el estadio adulto. Una de las observaciones más trascendentes realizadas a lo largo de esta tesis fue el hecho de lograr modular el período de la actividad locomotora al aumentar los niveles de expresión de *schnurri* sólo en el estadio adulto, y en particular en animales con 15 días de eclosionados. La fuerza de esta observación radica en la posibilidad de analizar conductualmente al mismo grupo de animales antes y después de la desregulación y por períodos prolongados de tiempo, en lo que constituye una prueba inequívoca del efecto del gen sobre el establecimiento del período endógeno.

Más allá del efecto comportamental, la sobreactivación de la vía en el circuito PDF mostró otros efectos a nivel de la morfología del circuito PDF; específicamente, la sobreexpresión constitutiva de *schnurri* en el circuito PDF genera proyecciones axonales anormalmente cortas. Estos efectos no se recapitulan al generar la desregulación sólo en el estadio adulto pero son en sí mismo interesantes ya que marcan un nuevo paradigma para estudiar la función de esta vía en el sistema nervioso central. Además de este efecto en el desarrollo del circuito PDF, otro estudiante de doctorado en el laboratorio, Ezequiel Axel Gorostiza, ha demostrado un rol central de la vía de BMP en el desarrollo del circuito PDF. En estadios larvales, la activación de la vía a partir de ligandos liberados por la postsinapsis del circuito PDF (definida como el circuito que expresa el receptor de PDF; (Hyun et al., 2005; Lear et al., 2005; Mertens et al., 2005; Shafer et al., 2008)) determina la morfología de la proyección dorsal del circuito PDF en un proceso que además depende del neuropéptido PDF como señal anterógrada (E. A. Gorostiza y M. F. Ceriani, datos no publicados). Considerando estos experimentos y los resultados descriptos en esta tesis, un estudiante de grado en el laboratorio, Agustín Pérez Santangelo, ha comenzado a caracterizar la morfología estructural producto de la interferencia para

mad y *med*. Si bien la disminución de los niveles de ambos factores de transcripción en el circuito PDF no produjo cambios a nivel comportamental, sus experimentos preliminares sugieren que esas mismas desregulaciones provocan un efecto estructural durante el desarrollo del circuito semejante al que caracteriza la falta de función de PDF. Estas observaciones, aún preliminares, abren la provocativa posibilidad de que la vía de BMP que opera en el circuito PDF reclute distintos elementos en distintos estadios. En conjunto, estos resultados reafirman una función de la vía de señalización en este circuito, y son un ejemplo más de cómo a lo largo de la vida de los individuos los distintos genes cumplen funciones similares pero inmersas en procesos diferentes.

La neurotransmisión química en el circuito PDF

Hasta la fecha el único mecanismo de señalización caracterizado para las sLN_vs es el neuropéptido PDF. Sin embargo, existen evidencias que apuntan a que la neurotransmisión química podría jugar algún rol en la transmisión de información del *momento del día* (Kilman et al., 2009; Umezaki et al., 2011; Wulbeck et al., 2009). Además, el laboratorio del Dr. Meinertzhagen describió a nivel de ultraestructura la existencia de zonas de liberación de un neurotransmisor hasta ahora no identificado (Yasuyama and Meinertzhagen, 2010). Aunque muchos son los esfuerzos puestos en identificar la naturaleza de los neurotransmisores en el circuito PDF, no se ha logrado una caracterización de los mismos (Chung et al., 2009; Dahdal et al., 2010; Frenkel and Ceriani, 2011; Hamasaka et al., 2005; Johard et al., 2009; Parisky et al., 2008). La estrategia empleada para examinar una posible contribución de la vía de BMP sobre la transmisión química en el circuito PDF fue analizar los efectos de la activación de la vía sobre un marcador de zonas activas de neurotransmisión química conocido como BRUCHPILOT (Kittel et al., 2006). Los resultados obtenidos sugieren que la activación sostenida de la vía (aun la circunscripta a estadios adultos) resulta en una disminución del número de marcas BRP positivas en el circuito PDF, la cual sólo es evidente luego de varios días de inducción, mientras que no a corto plazo. Una dificultad al interpretar estos resultados y tratar de correlacionarlos con los defectos comportamentales es la naturaleza misma de las observaciones. Mientras el comportamiento es intrínsecamente dinámico y evaluado minuto a minuto, el análisis inmunohistoquímico es estático. Dada la baja resolución del análisis histológico realizado en contexto de esta tesis es muy difícil correlacionar temporalmente el aumento de período con el defecto del número de zonas activas; sin embargo, el análisis detallado del comportamiento locomotor sugeriría que el alargamiento del período se evidencia casi inmediatamente (en 1-2 días) post inducción, lo cual no permite establecer una relación causal entre ambos fenómenos.

Como conclusión, parece claro que la vía de BMP puede modular la neurotransmisión química del circuito PDF como lo hace en la sinapsis neuromuscular (Aberle et al., 2002; Goold and Davis, 2007; Marques et al., 2002; McCabe et al., 2003) y será de interés analizar el efecto por períodos más prolongados al igual que durante todo el desarrollo. Si bien este efecto no parece ser el componente principal de la acción que la vía ejerce sobre el período endógeno de la actividad locomotora, por el momento se desconoce el rol de la neurotransmisión química en este fenómeno y por consiguiente será necesario desarrollar nuevas preparaciones para estudiar su relevancia.

Interacción entre la vía de BMP y el reloj molecular

La aproximación experimental elegida para comenzar a indagar en los posibles mecanismos moleculares que conectan al reloj y la vía de señalización mediada por BMP fue la evaluación comportamental en experimentos de interacción génica. Este enfoque, que se basa en analizar el fenotipo resultante de dos modificaciones genéticas con fenotipos específicos, permite poner en evidencia relaciones funcionales entre genes o vías presumiblemente distantes. Estos experimentos mostraron que el fenotipo de sobreexpresión de *schurri* en las neuronas PDF era modulable por al menos 4 componentes conocidos del reloj molecular: *sgg*, *per*, *tim* y *clk*, mientras que el factor de transcripción VRI no fue capaz de modular ni el período ni la ritmicidad.

Uno de los resultados sorprendentes que surgieron de este tipo de análisis es que la interacción génica entre *shn* y *sgg* generara la aparición de ritmos complejos. La aparición de ritmos con más de una componente de período no es una propiedad exclusiva de *Drosophila* (de la Iglesia et al., 2004; Lavie, 2001), pero en ninguno de los modelos en el que este fenómeno se ha descrito resulta trivial interpretar su significado. Más allá de esa limitación, la aparición de este fenómeno ha contribuido a entender cómo los circuitos neuronales establecen ritmos circadianos coherentes. La alteración de las propiedades eléctricas de la membrana ha sido un mecanismo por el cual se ha generado este tipo de fenotipos en *Drosophila* (Dahdal et al., 2010; Nitabach et al., 2006; Sheeba et al., 2008a). Una de las principales conclusiones a las que se ha llegado a través de analizar el estado del reloj molecular a lo largo del día en animales con ritmos complejos es que el período no es el producto de un fenómeno autónomo de célula sino que emerge como una propiedad de la red neuronal en la que los distintos componentes deben actuar de modo concertado (Sheeba et al., 2008b). Por lo tanto, más allá de la naturaleza molecular de la interacción (ver más abajo), la interpretación más parsimoniosa para explicar el

hecho que dos desregulaciones que conducen a período largo sin afectar la ritmicidad generan ritmos complejos se basa en considerar al circuito neuronal que sustenta el comportamiento como una red que se retroalimenta, y no simplemente como una cascada jerárquica en la que las sLNVs determinan el período en forma autónoma y lo informan al resto de la red. En esta concepción las sLNVs serían determinantes del período, pero los osciladores en el resto de la red seguirían funcionando y serían sincronizables dentro de un rango particular. Al interpretar de este modo el sistema circadiano las distintas componentes de período que subyacen a los ritmos complejos obedecen a diferentes componentes de una red que ha perdido coherencia. La componente de período extremadamente largo obedecería a las neuronas PDF cuyo reloj corre muy lento, el componente cercano a 24 horas obedecería al resto de la red, mientras que la componente de período corto podría surgir de alguno de los grupos neuronales que, se sabe, presentan oscilaciones moleculares aceleradas pero que en condiciones normales son sincronizadas por las sLNVs (Lin et al., 2004; Stoleru et al., 2005).

Respecto a la identidad molecular de la interacción entre *sgg* y *shn*, es posible proponer dos alternativas teniendo en cuenta las funciones conocidas de SGG en el reloj molecular, y en la vía de señalización de BMP y Wnt. La función descrita para *sgg* en el reloj molecular se centra en la promoción de la translocación del dímero PER/TIM al núcleo, mientras que su rol como nodo entre las vías de BMP y Wnt es la de fosforilar a MAD en el dominio *bisagra* y restringir su función en el núcleo (en definitiva reduciendo su actividad). Los experimentos de interacción entre la sobreactivación de la vía de BMP y la bajada de los niveles transcripcionales de *sgg* (utilizando el genotipo *pdfG4> shn,sgg^{ARNi}*) pueden interpretarse como un sinergismo de estas dos acciones a cualquiera de los dos niveles de acción descritos para SGG. Si se parte del hecho de que SGG es un regulador positivo de la entrada de PER y TIM al núcleo, y la vía de BMP actúa negativamente sobre los niveles de PER y TIM, los períodos extremadamente largos y la aparición de ritmos complejos puede interpretarse como un reloj molecular retardado en dos puntos de regulación que definen su período. Por otro lado, al basar el análisis en la regulación que SGG ejerce sobre MAD, los resultados pueden interpretarse como un doble efecto que converge sobre MAD en las neuronas PDF positivas: la coocurrencia de mayores niveles de SHN con una mayor proporción de MAD menos fosforilada en el dominio *bisagra* lograrían una inhibición más eficiente de los componentes del reloj controlados transcripcionalmente por la vía de señalización, lo cual conllevaría a generar retrasos aún mayores (Figura 51).

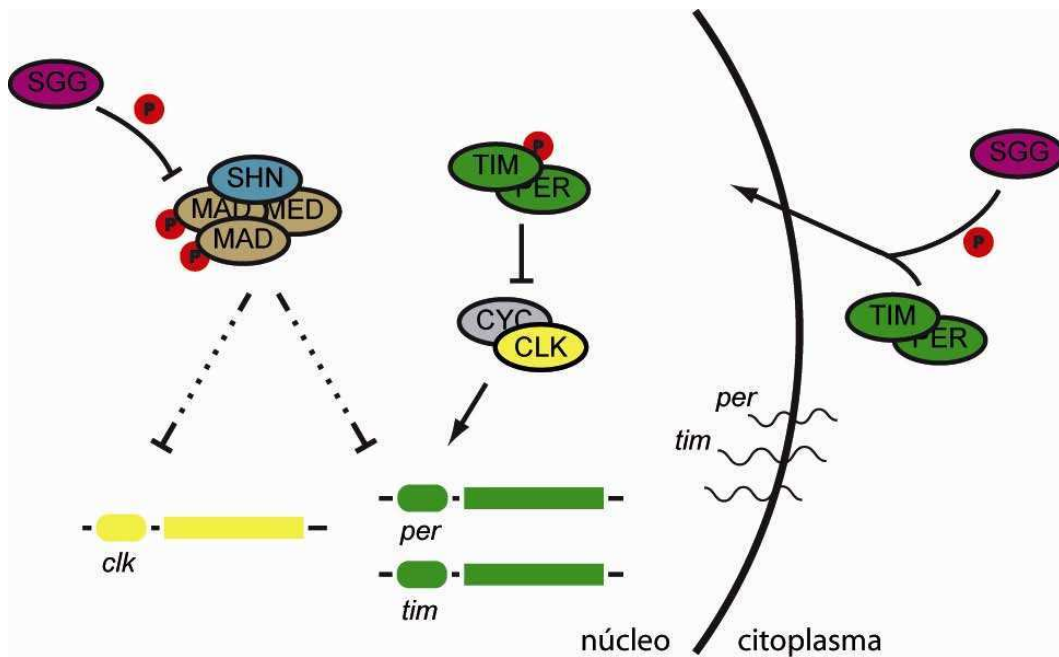


Figura 51. Esquema propuesto para la interacción de la vía de BMP con el reloj molecular. La vía de BMP ejerce un tono inhibitorio sobre la transcripción de *clk*, *per* y/o *tim* de modo directo o indirecto que se ve reflejado en los niveles de PER y TIM. Por su parte la acción de SGG, además de la función ya descrita sobre la translocación de PER y TIM al núcleo, podría regular negativamente la activación de MAD a través de la fosforilación de su dominio bisagra.

Estas conclusiones se sostienen al analizar los experimentos de interacciones génicas que implicaron tanto la sobreexpresión como la disminución de los niveles de *sgg* en contexto de la activación de la vía en las neuronas PDF positivas.

La determinación del período endógeno por parte de las sLNvs depende de un equilibrio entre transcripción, traducción, regulación postraduccional, degradación y localización subcelular entre otros procesos que determinan el funcionamiento celular. Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo demuestran que, en ese grupo neuronal, SHN regula la tasa de acumulación de PER pero no sus niveles totales y que el efecto comportamental que eso acarrea es susceptible de ser revertido tanto por la proteína PER como por la adición de una copia extra del locus genómico.

En la introducción se mencionó cómo es que diferentes alteraciones del balance en la abundancia de las moléculas centrales para el reloj conducen a cambios en el período endógeno. La dicotomía existente entre aumentar la dosis génica de *per* y aumentar los niveles de PER de modo independiente de su promotor (y por lo tanto no regulable por los procesos endógenos, ver introducción, página 21) permitió

profundizar el rol de SHN en el control del comportamiento. Por un lado, que dos fenotipos de período largo como son los generados por la sobreexpresión tanto de SHN como de PER en las sLNVs genere períodos cercanos a las 24hs muestra una clara interacción entre las vías de señalización. PER tiene una función inhibitoria dentro del ciclo de retroalimentación negativa que establece el período endógeno (reprime su propia transcripción) por lo que niveles constitutivamente elevados de PER enlentecen el paso de las oscilaciones moleculares sin detener el reloj; y la misma función inhibitoria, pero a otro nivel, se propone para SHN y la vía de BMP. Si la vía actuase sobre los niveles de proteína PER el sinergismo debería llevar a períodos aún más largos; por el contrario, el hecho de revertir el fenotipo indica que SHN afecta la acumulación de PER en un punto previo; y dado que se trata de un factor regulatorio de la transcripción la interpretación más parsimoniosa se centra en ese paso regulatorio. Los experimentos realizados con la transgénica *perG*, si bien pueden explicarse como un simple efecto aditivo (un período largo sumado a uno corto da como resultado períodos intermedios) también puede interpretarse como una reversión del fenotipo de sobreexpresión de *shn* generado por el agregado de los sitios que la vía controla (aunque sea indirectamente) sobrepasando su capacidad regulatoria. Queda aún por demostrar que la modulación generada por el agregado de una copia extra del locus de *per* es dependiente de la dosis y modulable por mayores niveles de SHN, lo cual reforzará la hipótesis recién mencionada.

Por otra parte, los experimentos realizados modulando los niveles de *clk* apoyan esta posibilidad. El rescate del fenotipo de sobreexpresión de *shn* por parte de *clk*, el principal regulador positivo de la transcripción de *per*, sugiere fuertemente que los fenotipos observados provienen de una deficiencia en los niveles de ARNm de *per* en lugar de una reducción del producto proteico en sí mismo.

Como ya se mencionó en la sección de resultados, el hecho de observar una interacción tanto con *per* como con *tim* permite proponer que la vía no necesariamente tiene un efecto directo sobre estos componentes. Sin embargo, y gracias a la existencia de herramientas apropiadas para evaluarlo, fue posible demostrar que *schnurri* ejerce, probablemente de modo indirecto, una regulación transcripcional negativa sobre ambos *loci*. Esto se ve reflejado en un retraso en la acumulación de PER en las sLNVs, que a su vez conduciría a la alteración comportamental de período. De hecho, la interacción génica entre *shn* y *clk* revelada en los experimentos comportamentales abre la provocativa posibilidad que el efecto indirecto sobre *per* y *tim* sea producto de una regulación negativa de la vía sobre su modulador directo, *clk*. De todos modos, los resultados presentados hasta el momento no permiten definir si dicha regulación es directa o no (Figura 51).

En este sentido cabe destacar que se ha intentado, sin éxito, identificar en los genes que componen el oscilador molecular los dominios regulatorios de la transcripción definidos para la vía de BMP (Figura 7), los cuales provienen de genes blanco involucrados en el desarrollo embrionario y larval.

Por lo tanto, este trabajo propone un nuevo nivel de regulación al funcionamiento del reloj molecular circadiano, y por consiguiente a la regulación de un gran número de procesos fisiológicos. La conservación evolutiva tanto de la vía de TGF β como del reloj circadiano en el reino animal abre la puerta a extender el análisis de estas interacciones a otros modelos animales.

Referencias

- Aberle, H., Haghighi, A.P., Fetter, R.D., McCabe, B.D., Magalhaes, T.R., and Goodman, C.S. (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 33, 545-558.
- Affolter, M., and Basler, K. (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 8, 663-674.
- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M.A., and Jazwinska, A. (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *EMBO J* 20, 3298-3305.
- Akten, B., Jauch, E., Genova, G.K., Kim, E.Y., Edery, I., Raabe, T., and Jackson, F.R. (2003). A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat Neurosci* 6, 251-257.
- 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.
- Allan, D.W., St Pierre, S.E., Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2003). Specification of neuropeptide cell identity by the integration of retrograde BMP signaling and a combinatorial transcription factor code. *Cell* 113, 73-86.
- Anzano, M.A., Roberts, A.B., Meyers, C.A., Komoriya, A., Lamb, L.C., Smith, J.M., and Sporn, M.B. (1982). Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Res* 42, 4776-4778.
- AppliedBiosystems (2008). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arora, K., Dai, H., Kazuko, S.G., Jamal, J., O'Connor, M.B., Letsou, A., and Warrior, R. (1995). The *Drosophila* schnurri gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. *Cell* 81, 781-790.
- Ashe, H.L. (2005). BMP signalling: synergy and feedback create a step gradient. *Curr Biol* 15, R375-377.
- Baines, R.A. (2004). Synaptic strengthening mediated by bone morphogenetic protein-dependent retrograde signaling in the *Drosophila* CNS. *J Neurosci* 24, 6904-6911.
- Baranano, D.E., Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (2001). Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24, 99-106.
- 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.
- Barker, P.A., Hussain, N.K., and McPherson, P.S. (2002). Retrograde signaling by the neurotrophins follows a well-worn trk. *Trends Neurosci* 25, 379-381.
- Bayat, V., Jaiswal, M., and Bellen, H.J. (2011). The BMP signaling pathway at the *Drosophila* neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 21, 182-188.

- Baylies, M.K., Bargiello, T.A., Jackson, F.R., and Young, M.W. (1987). Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature* 326, 390-392.
- Benzer, S. (1971). From the gene to behavior. *JAMA* 218, 1015-1022.
- Berni, J., Beckwith, E.J., Fernandez, M.P., and Ceriani, M.F. (2008). The axon-guidance roundabout gene alters the pace of the *Drosophila* circadian clock. *Eur J Neurosci* 27, 396-407.
- Blanchard, F.J., Collins, B., Cyran, S.A., Hancock, D.H., Taylor, M.V., and Blau, J. (2010). The transcription factor Mef2 is required for normal circadian behavior in *Drosophila*. *J Neurosci* 30, 5855-5865.
- Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chelot, E., Hardin, P.E., Preat, T., and Rouyer, F. (2001). 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, 871-888.
- Blau, J., and Young, M.W. (1999). Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99, 661-671.
- 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.
- Busza, A., Emery-Le, M., Rosbash, M., and Emery, P. (2004). Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science* 304, 1503-1506.
- Campbell, G., and Tomlinson, A. (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by brinker. *Cell* 96, 553-562.
- 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.
- 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.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Leopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114, 739-749.
- Chang, D.C. (2006). Neural circuits underlying circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Processes* 71, 211-225.
- Chin, J., Angers, A., Cleary, L.J., Eskin, A., and Byrne, J.H. (1999). TGF-beta1 in Aplysia: role in long-term changes in the excitability of sensory neurons and distribution of Tbetar-II-like immunoreactivity. *Learn Mem* 6, 317-330.
- Chung, B.Y., Kilman, V.L., Keath, J.R., Pitman, J.L., and Allada, R. (2009). The GABA(A) receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in *Drosophila*. *Curr Biol* 19, 386-390.
- Dahdal, D., Reeves, D.C., Ruben, M., Akabas, M.H., and Blau, J. (2010). *Drosophila* pacemaker neurons require g protein signaling and GABAergic inputs to generate twenty-four hour behavioral rhythms. *Neuron* 68, 964-977.

- Dai, H., Hogan, C., Gopalakrishnan, B., Torres-Vazquez, J., Nguyen, M., Park, S., Raftery, L.A., Warrior, R., and Arora, K. (2000). The zinc finger protein schnurri acts as a Smad partner in mediating the transcriptional response to decapentaplegic. *Dev Biol* 227, 373-387.
- 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.
- de la Iglesia, H.O., Cambras, T., Schwartz, W.J., and Diez-Noguera, A. (2004). Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 14, 796-800.
- De Mairan, J.J.O. (1729). *Observation Botanique*. Histoire de l'Academie Royale des Sciences, 35.
- Drapeau, M.D. (2003). A novel hypothesis on the biochemical role of the *Drosophila* Yellow protein. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1-3.
- Drapeau, M.D., Cyran, S.A., Viering, M.M., Geyer, P.K., and Long, A.D. (2006). A cis-regulatory sequence within the yellow locus of *Drosophila melanogaster* required for normal male mating success. *Genetics* 172, 1009-1030.
- Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., and Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, 476-480.
- Dudu, V., Bittig, T., Entchev, E., Kicheva, A., Julicher, F., and Gonzalez-Gaitan, M. (2006). Postsynaptic mad signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Curr Biol* 16, 625-635.
- Eade, K.T., and Allan, D.W. (2009). Neuronal phenotype in the mature nervous system is maintained by persistent retrograde bone morphogenetic protein signaling. *J Neurosci* 29, 3852-3864.
- Eaton, B.A., and Davis, G.W. (2005). LIM Kinase1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* 47, 695-708.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669-679.
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci* 23, 2527-2537.
- Ewer, J. (2005). Behavioral actions of neuropeptides in invertebrates: insights from *Drosophila*. *Horm Behav* 48, 418-429.
- Fernandez, M.P., Berni, J., and Ceriani, M.F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biol* 6, e69.
- Ferraro, J.S., Fuller, C.A., and Sulzman, F.M. (1989). The biological clock of *Neurospora* in a microgravity environment. *Adv Space Res* 9, 251-260.
- Frenkel, L., and Ceriani, M.F. (2011). Circadian plasticity: from structure to behavior. *Int Rev Neurobiol* 99, 107-138.

- Fuentealba, L.C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E.M., and De Robertis, E.M. (2007). Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131, 980-993.
- Fujii, S., and Amrein, H. (2010). Ventral lateral and DN1 clock neurons mediate distinct properties of male sex drive rhythm in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10590-10595.
- Fujii, S., Krishnan, P., Hardin, P., and Amrein, H. (2007). Nocturnal male sex drive in *Drosophila*. *Curr Biol* 17, 244-251.
- Fuller, C.A., Murakami, D.M., and Sulzman, F.M. (1989). Gravitational biology and the mammalian circadian timing system. *Adv Space Res* 9, 283-292.
- Gao, S., Steffen, J., and Laughon, A. (2005). Dpp-responsive silencers are bound by a trimeric Mad-Medea complex. *J Biol Chem* 280, 36158-36164.
- Glaser, F.T., and Stanewsky, R. (2007). Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 233-242.
- Goold, C.P., and Davis, G.W. (2007). The BMP ligand Gbb gates the expression of synaptic homeostasis independent of synaptic growth control. *Neuron* 56, 109-123.
- Grieder, N.C., Nellen, D., Burke, R., Basler, K., and Affolter, M. (1995). Schnurri is required for *Drosophila* Dpp signaling and encodes a zinc finger protein similar to the mammalian transcription factor PRDII-BF1. *Cell* 81, 791-800.
- 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.
- Haerry, T.E., Khalsa, O., O'Connor, M.B., and Wharton, K.A. (1998). Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in *Drosophila*. *Development* 125, 3977-3987.
- Hamasaka, Y., Wegener, C., and Nassel, D.R. (2005). GABA modulates *Drosophila* circadian clock neurons via GABAB receptors and decreases in calcium. *J Neurobiol* 65, 225-240.
- 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.
- Helfrich-Forster, C. (1997). Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 380, 335-354.
- Helfrich-Forster, C. (2002). The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology (Jena)* 105, 297-312.
- Holley, R.W. (1975). Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 258, 487-490.
- Howlader, G., Paranjpe, D.A., and Sharma, V.K. (2006). Non-ventral lateral neuron-based, non-PDF-mediated clocks control circadian egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 21, 13-20.
- Howlader, G., and Sharma, V.K. (2006). Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 52, 779-785.

- Hyun, S., Lee, Y., Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Shin, J., Lee, J., Jeon, K., Hwang, S., *et al.* (2005). *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* 48, 267-278.
- Jackson, F.R. (2010). Glial cell modulation of circadian rhythms. *Glia*.
- Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J., and Frykberg, L. (2003). Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biol Proced Online* 5, 123-135.
- Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S., and Rushlow, C. (1999). The *Drosophila* gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* 96, 563-573.
- Johard, H.A., Yoishii, T., Dircksen, H., Cusumano, P., Rouyer, F., Helfrich-Forster, C., and Nassel, D.R. (2009). Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *J Comp Neurol* 516, 59-73.
- Kadener, S., Menet, J.S., Schoer, R., and Rosbash, M. (2008). Circadian transcription contributes to core period determination in *Drosophila*. *PLoS Biol* 6, e119.
- Kalidas, S., and Smith, D.P. (2002). Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* 33, 177-184.
- Kamiya, Y., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2008). Specificity of the inhibitory effects of Dad on TGF-beta family type I receptors, Thickveins, Saxophone, and Baboon in *Drosophila*. *FEBS Lett* 582, 2496-2500.
- 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.
- Keshishian, H., and Kim, Y.S. (2004). Orchestrating development and function: retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends Neurosci* 27, 143-147.
- Khalsa, O., Yoon, J.W., Torres-Schumann, S., and Wharton, K.A. (1998). TGF-beta/BMP superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the *Drosophila* wing. *Development* 125, 2723-2734.
- Kilman, V.L., Zhang, L., Meissner, R.A., Burg, E., and Allada, R. (2009). Perturbing dynamin reveals potent effects on the *Drosophila* circadian clock. *PLoS One* 4, e5235.
- Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D.A., Pawlu, C., Kellner, R.R., Willig, K.I., *et al.* (2006). Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312, 1051-1054.
- Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S., and Young, M.W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase epsilon. *Cell* 94, 97-107.
- Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M.W., and Saez, L. (2001). Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron* 30, 699-706.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2112-2116.

- Krishnan, B., Dryer, S.E., and Hardin, P.E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400, 375-378.
- Kula-Eversole, E., Nagoshi, E., Shang, Y., Rodriguez, J., Allada, R., and Rosbash, M. (2010). Surprising gene expression patterns within and between PDF-containing circadian neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13497-13502.
- Lavie, P. (2001). Sleep-Wake as a Biological Rhythms. *Annu Rev Psychol* 52, 277-303.
- Lear, B.C., Merrill, C.E., Lin, J.M., Schroeder, A., Zhang, L., and Allada, R. (2005). A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron* 48, 221-227.
- Lee-Hoeflich, S.T., Zhao, X., Mehra, A., and Attisano, L. (2005). The *Drosophila* type II receptor, Wishful thinking, binds BMP and myoglianin to activate multiple TGFbeta family signaling pathways. *FEBS Lett* 579, 4615-4621.
- Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., and Derynck, R. (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 26, 3957-3967.
- 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.
- Lein, P., Johnson, M., Guo, X., Rueger, D., and Higgins, D. (1995). Osteogenic protein-1 induces dendritic growth in rat sympathetic neurons. *Neuron* 15, 597-605.
- Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., and Hall, J.C. (2002). Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* 298, 2010-2012.
- 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.
- Lopez-Coviella, I., Berse, B., Krauss, R., Thies, R.S., and Blusztajn, J.K. (2000). Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* 289, 313-316.
- Lyons, L.C., and Roman, G. (2009). Circadian modulation of short-term memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 16, 19-27.
- Ma, J., and Ptashne, M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* 50, 137-142.
- Maitra, S., Price, C., and Ganguly, R. (2002). Cyp6a8 of *Drosophila melanogaster*: gene structure, and sequence and functional analysis of the upstream DNA. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 859-870.
- Majercak, J., Sidote, D., Hardin, P.E., and Edery, I. (1999). How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* 24, 219-230.
- Marques, G. (2005). Morphogens and synaptogenesis in *Drosophila*. *J Neurobiol* 64, 417-434.
- Marques, G., Bao, H., Haerry, T.E., Shimell, M.J., Duchek, P., Zhang, B., and O'Connor, M.B. (2002). The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron* 33, 529-543.

- Marques, G., Haerry, T.E., Crotty, M.L., Xue, M., Zhang, B., and O'Connor, M.B. (2003). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development* 130, 5457-5470.
- Marques, G., and Zhang, B. (2006). Retrograde signaling that regulates synaptic development and function at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* 75, 267-285.
- Martin, J.R. (2003). Locomotor activity: a complex behavioural trait to unravel. *Behav Processes* 64, 145-160.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A.S., and Young, M.W. (2001). A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105, 769-779.
- Marty, T., Muller, B., Basler, K., and Affolter, M. (2000). Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription. *Nat Cell Biol* 2, 745-749.
- McCabe, B.D., Hom, S., Aberle, H., Fetter, R.D., Marques, G., Haerry, T.E., Wan, H., O'Connor, M.B., Goodman, C.S., and Haghghi, A.P. (2004). Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron* 41, 891-905.
- McCabe, B.D., Marques, G., Haghghi, A.P., Fetter, R.D., Crotty, M.L., Haerry, T.E., Goodman, C.S., and O'Connor, M.B. (2003). The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* 39, 241-254.
- McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.
- McGuire, S.E., Mao, Z., and Davis, R.L. (2004). Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Sci STKE* 2004, pl6.
- 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.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573-3584.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 136, 3699-3714.
- 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.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G., and Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85, 357-368.
- Neul, J.L., and Ferguson, E.L. (1998). Spatially restricted activation of the SAX receptor by SCW modulates DPP/TKV signaling in *Drosophila* dorsal-ventral patterning. *Cell* 95, 483-494.
- Ng, F.S., Tangredi, M.M., and Jackson, F.R. (2011). Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. *Curr Biol* 21, 625-634.

- Ng, J., and Luo, L. (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 44, 779-793.
- Nguyen, M., Park, S., Marques, G., and Arora, K. (1998). Interpretation of a BMP activity gradient in *Drosophila* embryos depends on synergistic signaling by two type I receptors, SAX and TKV. *Cell* 95, 495-506.
- Nguyen, M., Parker, L., and Arora, K. (2000). Identification of maverick, a novel member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila*. *Mech Dev* 95, 201-206.
- Niisslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 267-282.
- 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.
- Parisky, K.M., Agosto, J., Pulver, S.R., Shang, Y., Kuklin, E., Hodge, J.J., Kang, K., Liu, X., Garrity, P.A., Rosbash, M., *et al.* (2008). PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* 60, 672-682.
- 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.
- 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.
- 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.
- Peschel, N., and Helfrich-Forster, C. (2011). Setting the clock - by nature: Circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 585, 1435-1442.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pittendrigh, C.S. (1954). On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1018-1029.
- 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.
- Pyrowolakis, G., Hartmann, B., Muller, B., Basler, K., and Affolter, M. (2004). A simple molecular complex mediates widespread BMP-induced repression during *Drosophila* development. *Dev Cell* 7, 229-240.
- Rawson, J.M., Lee, M., Kennedy, E.L., and Selleck, S.B. (2003). *Drosophila* neuromuscular synapse assembly and function require the TGF-beta type I receptor saxophone and the transcription factor Mad. *J Neurobiol* 55, 134-150.
- 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.

- Rezaval, C., Berni, J., Gorostiza, E.A., Werbach, S., Fagilde, M.M., Fernandez, M.P., Beckwith, E.J., Aranovich, E.J., Sabio y Garcia, C.A., and Ceriani, M.F. (2008). A functional misexpression screen uncovers a role for *enabled* in progressive neurodegeneration. *PLoS One* 3, e3332.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F., and Sporn, M.B. (1985). Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 119-123.
- Robertson, H.M., Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Benz, W.K., and Engels, W.R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-470.
- Rorth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12418-12422.
- Rosato, E., and Kyriacou, C.P. (2006). Analysis of locomotor activity rhythms in *Drosophila*. *Nat Protoc* 1, 559-568.
- Rosbash, M. (2009). The implications of multiple circadian clock origins. *PLoS Biol* 7, e62.
- Rutila, J.E., Edery, I., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1992). The analysis of new short-period circadian rhythm mutants suggests features of *D. melanogaster* period gene function. *J Neurogenet* 8, 101-113.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.
- Salinas, P.C. (2003). Synaptogenesis: Wnt and TGF-beta take centre stage. *Curr Biol* 13, R60-62.
- Santibanez, J.F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121, 233-251.
- Sanyal, S., Kim, S.M., and Ramaswami, M. (2004). Retrograde regulation in the CNS; neuron-specific interpretations of TGF-beta signaling. *Neuron* 41, 845-848.
- Sapkota, G., Alarcon, C., Spagnoli, F.M., Brivanlou, A.H., and Massague, J. (2007). Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* 25, 441-454.
- Schmierer, B., and Hill, C.S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 970-982.
- 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.
- Seiger, M.B., and Kink, J.F. (1993). The effect of anesthesia on the photoresponses of four sympatric species of *Drosophila*. *Behav Genet* 23, 99-104.
- Shafer, O.T., Kim, D.J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., and Taghert, P.H. (2008). Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging. *Neuron* 58, 223-237.

- 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.
- Shafer, O.T., and Taghert, P.H. (2009). RNA-interference knockdown of *Drosophila* pigment dispersing factor in neuronal subsets: the anatomical basis of a neuropeptide's circadian functions. *PLoS One* 4, e8298.
- Sheeba, V. (2008). The *Drosophila melanogaster* circadian pacemaker circuit. *J Genet* 87, 485-493.
- Sheeba, V., Kaneko, M., Sharma, V.K., and Holmes, T.C. (2008a). The *Drosophila* circadian pacemaker circuit: Pas De Deux or Tarantella? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 37-61.
- Sheeba, V., Sharma, V.K., Gu, H., Chou, Y.T., O'Dowd, D.K., and Holmes, T.C. (2008b). Pigment dispersing factor-dependent and -independent circadian locomotor behavioral rhythms. *J Neurosci* 28, 217-227.
- Shigeyoshi, Y., Meyer-Bernstein, E., Yagita, K., Fu, W., Chen, Y., Takumi, T., Schotland, P., Sehgal, A., and Okamura, H. (2002). Restoration of circadian behavioural rhythms in a period null *Drosophila* mutant (per01) by mammalian period homologues mPer1 and mPer2. *Genes Cells* 7, 163-171.
- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87, 387-406.
- Sivasankaran, R., Vigano, M.A., Muller, B., Affolter, M., and Basler, K. (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J* 19, 6162-6172.
- Smith, J.M., Sporn, M.B., Roberts, A.B., Derynck, R., Winkler, M.E., and Gregory, H. (1985). Human transforming growth factor-alpha causes precocious eyelid opening in newborn mice. *Nature* 315, 515-516.
- Smith, R., and Konopka, R. (1982). Effects of dosage alterations at the per locus on the period of the circadian clock of *Drosophila*. *Molecular and General Genetics* 185, 30-36.
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.H., and Landstrom, M. (2008). The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* 10, 1199-1207.
- Sporn, M.B. (2006). The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 3-7.
- Sporn, M.B., and Todaro, G.J. (1980). Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303, 878-880.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 176-188.
- Staehling-Hampton, K., Laughon, A.S., and Hoffmann, F.M. (1995). A *Drosophila* protein related to the human zinc finger transcription factor PRDII/MBPI/HIV-EP1 is required for dpp signaling. *Development* 121, 3393-3403.
- Stanewsky, R., Jamison, C.F., Plautz, J.D., Kay, S.A., and Hall, J.C. (1997). Multiple circadian-regulated elements contribute to cycling period gene expression in *Drosophila*. *EMBO J* 16, 5006-5018.

- 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.
- Stoleru, D., Nawathean, P., Fernandez, M.P., Menet, J.S., Ceriani, M.F., and Rosbash, M. (2007). The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell* 129, 207-219.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., and Rosbash, M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* 431, 862-868.
- 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.
- Sulzman, F.M., Ellman, D., Fuller, C.A., Moore-Ede, M.C., and Wassmer, G. (1984). Neurospora circadian rhythms in space: a reexamination of the endogenous-exogenous question. *Science* 225, 232-234.
- Sullivan, W., Ashburner, M., and Hawley, R.S., eds. (2000). *Drosophila* Protocols (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Suri, V., Hall, J.C., and Rosbash, M. (2000). Two novel doubletime mutants alter circadian properties and eliminate the delay between RNA and protein in *Drosophila*. *J Neurosci* 20, 7547-7555.
- Tanoue, S., Krishnan, P., Krishnan, B., Dryer, S.E., and Hardin, P.E. (2004). Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol* 14, 638-649.
- Torres-Vazquez, J., Park, S., Warrior, R., and Arora, K. (2001). The transcription factor Schnurri plays a dual role in mediating Dpp signaling during embryogenesis. *Development* 128, 1657-1670.
- Tsuneizumi, K., Nakayama, T., Kamoshida, Y., Kornberg, T.B., Christian, J.L., and Tabata, T. (1997). Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* 389, 627-631.
- Tucker, R.F., Shipley, G.D., Moses, H.L., and Holley, R.W. (1984). Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. *Science* 226, 705-707.
- Udagawa, Y., Hanai, J., Tada, K., Grieder, N.C., Momoeda, M., Taketani, Y., Affolter, M., Kawabata, M., and Miyazono, K. (2000). Schnurri interacts with Mad in a Dpp-dependent manner. *Genes Cells* 5, 359-369.
- Umezaki, Y., Yasuyama, K., Nakagoshi, H., and Tomioka, K. (2011). Blocking synaptic transmission with tetanus toxin light chain reveals modes of neurotransmission in the PDF-positive circadian clock neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 57, 1290-1299.
- Veverytsa, L., and Allan, D.W. (2011). Retrograde BMP signaling controls *Drosophila* behavior through regulation of a peptide hormone battery. *Development* 138, 3147-3157.
- Vosshall, L.B. (2007). Into the mind of a fly. *Nature* 450, 193-197.
- Wagh, D.A., Rasse, T.M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Durrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M.C., Schmidt, M., Qin, G., *et al.* (2006). Bruchpilot, a protein with homology

- to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49, 833-844.
- Weiss, A., Charbonnier, E., Ellertsdottir, E., Tsirigos, A., Wolf, C., Schuh, R., Pyrowolakis, G., and Affolter, M. (2010). A conserved activation element in BMP signaling during *Drosophila* development. *Nat Struct Mol Biol* 17, 69-76.
 - Wharton, K., and Derynck, R. (2009). TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* 136, 3691-3697.
 - Withers, G.S., Higgins, D., Charette, M., and Banker, G. (2000). Bone morphogenetic protein-7 enhances dendritic growth and receptivity to innervation in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 12, 106-116.
 - Wu, M.Y., and Hill, C.S. (2009). Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16, 329-343.
 - Wulbeck, C., Grieshaber, E., and Helfrich-Forster, C. (2008). Pigment-dispersing factor (PDF) has different effects on *Drosophila's* circadian clocks in the accessory medulla and in the dorsal brain. *J Biol Rhythms* 23, 409-424.
 - Wulbeck, C., Grieshaber, E., and Helfrich-Forster, C. (2009). Blocking endocytosis in *Drosophila's* circadian pacemaker neurons interferes with the endogenous clock in a PDF-dependent way. *Chronobiol Int* 26, 1307-1322.
 - Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 31, 918-924.
 - Yang, Z., and Sehgal, A. (2001). Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 29, 453-467.
 - Yao, L.C., Blitz, I.L., Peiffer, D.A., Phin, S., Wang, Y., Ogata, S., Cho, K.W., Arora, K., and Warrior, R. (2006). Schnurri transcription factors from *Drosophila* and vertebrates can mediate Bmp signaling through a phylogenetically conserved mechanism. *Development* 133, 4025-4034.
 - Yasuyama, K., and Meinertzhagen, I.A. (2010). Synaptic connections of PDF-immunoreactive lateral neurons projecting to the dorsal protocerebrum of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 518, 292-304.
 - Yoshii, T., Ahmad, M., and Helfrich-Forster, C. (2009a). Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila's* circadian clock. *PLoS Biol* 7, e1000086.
 - Yoshii, T., Wulbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., and Helfrich-Forster, C. (2009b). The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila's* clock. *J Neurosci* 29, 2597-2610.
 - Yu, W., Houl, J.H., and Hardin, P.E. (2011). NEMO Kinase Contributes to Core Period Determination by Slowing the Pace of the *Drosophila* Circadian Oscillator. *Curr Biol* 21, 756-761.
 - 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.
 - Zhang, F., Endo, S., Cleary, L.J., Eskin, A., and Byrne, J.H. (1997). Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 275, 1318-1320.

- Zhou, X., Yuan, C., and Guo, A. (2005). *Drosophila* olfactory response rhythms require clock genes but not pigment dispersing factor or lateral neurons. *J Biol Rhythms* 20, 237-244.
- Zhu, C.C., Boone, J.Q., Jensen, P.A., Hanna, S., Podemski, L., Locke, J., Doe, C.Q., and O'Connor, M.B. (2008). *Drosophila* Activin- and the Activin-like product Dawdle function redundantly to regulate proliferation in the larval brain. *Development* 135, 513-521.