

Tesis Doctoral

# Análisis de la transmisión de la información circadiana en *Drosophila*

Depetris Chauvin, Ana

2013-07-11

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Depetris Chauvin, Ana. (2013-07-11). Análisis de la transmisión de la información circadiana en *Drosophila*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Depetris Chauvin, Ana. "Análisis de la transmisión de la información circadiana en *Drosophila*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-07-11.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Análisis de la transmisión de la información  
circadiana en *Drosophila*.**

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

Lic. Ana Depetris Chauvin

Director de tesis: Dra. María Fernanda Ceriani.  
Consejero de Estudios: Dr. Gabriel Manrique.

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

Buenos Aires, 2013.

## **Análisis de la transmisión de la información circadiana en *Drosophila*.**

### **Resumen**

El control rítmico del comportamiento depende de la actividad de la red circadiana en el cerebro. En *Drosophila* existen dos modelos que dan cuenta del origen de las oscilaciones circadianas, uno basado en las oscilaciones moleculares de proteínas específicas y otro basado en la actividad de membrana. Por otra parte, desde el marcapasos central (las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s*) la información circadiana es transmitida hacia el organismo a través de vías de salida entre las que se destaca el neuropéptido PDF. A su vez, las terminales dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* presentan remodelamiento estructural diario pudiendo esto implicar cambios circadianos en los contactos sinápticos.

En esta tesis probamos la validez del modelo basado en las oscilaciones moleculares como generador de las oscilaciones circadianas, mientras que determinamos a la actividad eléctrica de membrana como una importante vía de salida desde el marcapasos central. Demostramos que la actividad eléctrica de las neuronas PDF es crucial para determinar los niveles del neuropéptido en las terminales axonales, la plasticidad estructural y de las zonas sinápticas, con el consiguiente efecto sobre el comportamiento locomotor rítmico. Por otra parte, la realización de un *screen* de circuitos postsinápticos a las neuronas PDF utilizando la técnica de GRASP arrojó resultados que apoyan fuertemente nuestra hipótesis de cambios circadianos en la conectividad. En paralelo, determinamos a las metaloproteasas de matriz (MMPs) como reguladores claves de la plasticidad estructural de las neuronas PDF, así como a moléculas implicadas en fasciculación axonal y podado de neuritas. Como resultado de este análisis identificamos a MMP1 como un modulador del neuropéptido PDF, demostrando la importancia de MMP1 en el control de los ritmos circadianos.

Palabras claves: *Drosophila*, ritmos circadianos, actividad eléctrica, plasticidad estructural, PDF, MMP, GRASP.

## Output signals from the circadian master clock in *Drosophila*

### Abstract

Circadian control of behavior depends on the activity of clock neurons in the brain. Two models have been proposed for the generation of circadian oscillations in *Drosophila*, one based on the molecular oscillation of clock genes and the other one on cyclic membrane activity. Although most of the evidence supports a transcriptional/translational negative feedback loop as the most important one, its relevance has recently been questioned. From the master clock, localized in the *s*-LN<sub>v</sub> neurons in the fly brain, circadian information is transmitted through output signals such as the neuropeptide pigment dispersing factor (PDF). In addition, axonal terminals of the *s*-LN<sub>v</sub>s display daily structural plasticity and such remodeling could imply circadian changes on synaptic contacts of PDF neurons.

In this thesis we demonstrated that molecular oscillations of clock genes are the basis of the circadian oscillator, and that the electrical activity coordinates output signals from the master clock. We also showed that electrical activity of PDF neurons affects the levels of the neuropeptide, abrogates the remodeling of the terminals and even reduces the number of synaptic active zones, ultimately controlling circadian locomotor activity. On the other hand, through a screen of postsynaptic targets using the GRASP technique we obtained data that strongly supports our hypothesis of circadian changes in connectivity. In parallel we investigated the relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) in the control of the structural plasticity of the PDF neurons, as well as the importance of molecules involved in axonal fasciculation and pruning. As a result, we identified MMP1 as a new modulator of the neuropeptide PDF highlighting the relevance of MMP1 in the control of circadian locomotor behavior.

Key words: *Drosophila*, circadian rhythms, electrical activity, structural plasticity, PDF, MMP, GRASP.

## Agradecimientos

El doctorado es, ante todo, una etapa...intensa. 5 años le dan a uno suficiente tiempo para pasar por todos los estados de ánimos posibles y, casi, casi al borde de la esquizofrenia, el doctorando sufre, ama, padece, desconfía, se esclaviza, disfruta y finalmente, se resigna frente a su tesis doctoral. En mi caso, creo haber pasado por todos los estados de ánimos al menos un par de veces pero fue gracias a la ayuda de varias personas que hoy puedo decir que estos 5 años han sido, en promedio, una hermosa y productiva etapa de mi vida.

Gracias a Fer, por un montón de cosas. Por ser el mejor ejemplo de vocación científica sin por ello dejar de ser alguien con una grandiosa calidad humana. Gracias por todas las oportunidades que me ofreciste. ¡Espero haber sabido aprovecharlas! Gracias por haber juntado tanta gente maravillosa en un mismo laboratorio y hacer así del día a día una experiencia más que agradable.

Infinitas gracias a todos los miembros del 109, los de ahora y los de antes. No sólo por generar un muy buen ambiente de trabajo donde se destaca el compañerismo, la buena onda y cada tanto una charla científica interesante (jeje), sino porque en el 109 conocí gente que sé me va a acompañar toda la vida. Gracias a la vieja camada, Caro, María y Paulita, por el tiempo que compartimos en el laboratorio pero también porque ahora desde el exilio me han dado invaluable consejos y lecciones de vida que me ayudan en mi desarrollo profesional así como me enseñan a ser más tolerante y comprensiva. Gracias a Marian, por ser una hermosa fuente de alegría pero sobretodo muchas gracias por ser tan buen oreja. Gracias a Marta, por la ayuda y por ponerle tan buena onda al flyroom. Gracias a Nara, Nico y Lía, los "grandes" del laboratorio, porque, además de haberme reído mucho con (y de) ustedes, en este tiempo me enseñaron un montón de cosas. Gracias por las discusiones científicas y, sobretodo, por toda la ayuda en la búsqueda de un futuro laboral. Gracias a Beck y Axel, eternos cómplices de todas las telenovelas que han sabido suceder en estos 8 años en el 109. ¡Algún día vamos a tener que escribir un libro juntos! Gracias a Guille, por ser tan buen amigo y tener siempre una pavada o un chocolate que me roba una sonrisa. Y además de pavadas de vez en cuando hablamos en serio, y eso también está muy bueno. Gracias a la nueva camada, Cari, Maggie y Anas, por traer la alegría de la juventud al 109.

Muchas gracias a los grandes amigos del 112 (no me importa que se hayan mudado de edificio, ¡ustedes siempre serán el 112!). Gracias a Agos, Juli, Maxi y Joel por ponerle tanta buena onda al flyroom y a las reuniones del club social 109-112.

Quiero agradecer también a la UBA. Hace más de 15 años que soy parte de esta gran familia y ahora, luego de un bachillerato, una licenciatura y un doctorado, va siendo hora de despedirme de mi querida Universidad. Muchas gracias por todos estos años de excelencia educativa.

Gracias a las amistades que me acompañan y apoyan siempre. Gracias a las chicas de la facu con las que hemos compartido infinitas charlas de “la crisis del doctorado”. Sí, sí, todo el mundo tiene que pasar por ese momento pero con un poco de inteligencia, perseverancia y, por sobre todo, mucha suerte finalmente uno sale airoso ¡Gracias a Clari, Gabi y Manu, las locas lindas que me hacen feliz desde hace ya más de 15 años!

Muchas gracias a mi familia, mis viejos, mis hermanos y mis abuelos. A ellos les debo todo. Ellos son y serán siempre el mejor ejemplo de que con honestidad, voluntad e inteligencia se pueden conseguir muchas más cosas de las que uno se imagina. Muchas gracias, los amo.

Y finalmente, el agradecimiento más grande va para Diego. Millones de gracias por estar a mi lado en todo momento, tanto para levantarme cuando los ánimos andaban por el piso como para aconsejarme cuando las cosas se ponían complicadas y acompañarme cuando había que festejar los logros. ¡Gracias por soportar mis puteadas, mis insomnios y mis épocas de locura laboral! Y también muchas gracias por la perspectiva, porque a veces se necesita la mirada de otro para saber ponerle a las cosas la importancia real que merecen. Y muchas gracias por querer compartir conmigo muchas etapas y aventuras más.

*A Diego,  
por el apoyo, la comprensión,  
la hermosa compañía  
y por elegir siempre las palabras justas*

# *Índice*



<b>Índice</b> .....	<b>7</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>11</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>14</b>
1. Los ritmos circadianos.....	15
1.1 La medición del paso del tiempo y sus ventajas adaptativas.....	15
1.2 El sistema circadiano.....	17
1.3 El reloj molecular.....	18
1.4 El circuito circadiano de <i>Drosophila</i> .....	20
1.5 Las vías de salida desde el marcapasos central de la mosca.....	25
1.6 La plasticidad estructural de las neuronas PDF.....	27
1.7 El origen del oscilador: ¿actividad de membrana o reloj molecular?.....	29
2. Mecanismos de plasticidad neuronal.....	31
2.1 Ensamblado de circuitos neuronales durante el desarrollo.....	33
2.2 Remodelamiento axonal durante la adultez.....	35
2.3 Cambios estructurales circadianos.....	37
<b>Objetivos e hipótesis de trabajo</b> .....	<b>40</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>41</b>
1. Líneas de <i>Drosophila</i> empleadas.....	42
1.1 Mantenimiento de stocks.....	42
1.2 Nomenclatura de <i>Drosophila</i> .....	42
1.3 Cromosomas balanceadores y generación de líneas.....	43
1.4 El sistema GAL4/UAS y el sistema GeneSwitch.....	44
1.5 Inducción del sistema de expresión en larvas, pupas y adultos.....	46
1.6 Stocks utilizados.....	46
2. Análisis de la actividad locomotora.....	47
2.1 Análisis automatizado de la actividad locomotora.....	47
2.2 Perfiles de actividad locomotora en luz-oscuridad y oscuridad constante.....	49
3. Técnicas de biología molecular.....	50
3.1 Análisis de presencia de elementos transponibles en líneas recombinantes.....	50
3.1.1 Extracción de ADN genómico de una cabeza.....	50
3.1.2 Oligonucleótidos utilizados.....	50
3.2 Análisis de los niveles de expresión génica por qRT-PCR.....	51

3.2.1	Extracción de ARN de cabeza de moscas .....	51
3.2.2	Reacción de retrotranscripción .....	51
3.2.3	PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).....	51
3.2.4	Oligonucleótidos utilizados .....	52
4.	Inmunohistoquímica y análisis de imágenes.....	52
4.1	Inmunohistoquímicas en cerebros de moscas adultas .....	52
4.2	Anticuerpos utilizados.....	53
4.3	Microscopía y procesamiento de imágenes.....	54
4.4	Curvas de tiempo y análisis de los niveles de PER .....	55
4.5	Análisis de niveles de PDF en la proyección dorsal y en los somas.....	55
4.6	Análisis de niveles de ANF-GFP en la terminal dorsal.....	56
4.7	Análisis de complejidad del circuito PDF: cruces totales y largo de la terminal .....	56
4.8	Cuantificación de partículas BRP <sup>+</sup> .....	57
4.9	Análisis de señal de reconstitución de GFP (técnica de GRASP) .....	58
5.	Análisis estadístico .....	59
	<b>Resultados .....</b>	<b>61</b>
	CAPÍTULO 1: Acoplamiento membrana-oscilador molecular .....	62
	Parte 1: La actividad eléctrica como modulador del paso de las oscilaciones moleculares .....	62
1.1	El silenciamiento eléctrico limitado a etapas adultas conduce a arritmicidad comportamental sin alterar el paso del reloj molecular.....	62
1.2	Alteraciones eléctricas a largo término afectan irreversiblemente el comportamiento y, en última instancia, alteran el paso del reloj molecular .....	69
	Parte 2: La actividad eléctrica de las neuronas PDF como una vía de salida desde el oscilador .....	74
1.3	El silenciamiento eléctrico adulto específico reduce reversiblemente los niveles de PDF en las terminales axonales .....	74
1.4	La plasticidad estructural y el número de contactos sinápticos están disminuidos en las neuronas PDF silenciadas.....	78
	CAPITULO 2 Cambios circadianos de los contactos sinápticos del circuito PDF .....	82
2.1	El circuito PDF sufre cambios morfológicos notables durante la transición noche-día .....	82
2.2	Búsqueda de circuitos postsinápticos a las neuronas PDF.....	85
2.3	Las neuronas PDF contactan distintos grupos neuronales a lo largo del día.....	91
	CAPITULO 3 Mecanismos moleculares subyacentes a la plasticidad estructural de las neuronas PDF .....	96

3.1 Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son reguladores claves de la plasticidad estructural	96
3.2 MMP1 pero no MMP2 afecta la ritmicidad comportamental .....	102
3.3 MMP1 actúa en conjunto con Fasciclina 2 y la vía del Receptor de Ecdisona .....	106
<b>CAPITULO 4 MMP1, un nuevo modulador del neuropéptido PDF.....</b>	<b>109</b>
4.1 MMP1 reduce los niveles de PDF en las proyecciones dorsales.....	109
4.2 Ahondando en el mecanismo. ¿Cómo modula MMP1 los niveles de PDF en las terminales axonales?.....	111
4.3 Los niveles del neuropéptido son esenciales para el control de la plasticidad estructural ...	115
<b>Discusión y conclusiones.....</b>	<b>117</b>
La actividad eléctrica como un reforzador de las oscilaciones circadianas .....	118
La actividad eléctrica como modulador de las vías de salida.....	120
Las metaloproteasas de matriz, la vía de Ecdisona y el neuropéptido PDF coordinan la plasticidad estructural circadiana.....	122
Coordinación de señales eléctricas y moleculares en el control del remodelamiento axonal diario .....	126
Relevancia funcional de la plasticidad estructural.....	129
<b>Anexos .....</b>	<b>133</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>137</b>

*Abreviaturas*

AAP: *Average Activity Plot* (gráficos de actividad promedio).

CAM: molécula de adhesión celular.

CT: tiempo circadiano. Generalmente indica la cantidad de horas transcurridas desde el inicio del día subjetivo.

$DN_1s$ : neuronas dorsales 1.

$DN_2s$ : neuronas dorsales 2.

$DN_3s$ : neuronas dorsales 3.

EcdR: receptor de Ecdisona.

EP: *evening peak*.

EPB: *en passant boutons*. Se refiere a un tipo de botón sináptico.

Fas2: Fasciclina 2.

GS: GeneSwitch.

GRASP: *GFP Reconstitution Across Synaptic Partners*.

$LN_d s$ : neuronas laterales dorsales.

$l-LN_v s$ : neuronas laterales ventrales grandes.

LL: luz constante.

LO: luz-oscuridad.

LPNs: neuronas laterales posteriores.

MMP: metaloproteasas de matriz.

MP: *morning peak*

NPF: neuropéptido F

OO: oscuridad constante.

PDF: *Pigment Dispersing Factor*

POT: tracto óptico posterior.

PI: *pars intercerebralis*.

RU: RU486, droga inductora del sistema GeneSwitch.

SCN: núcleo supraquiasmático

s-LN<sub>v</sub>s: neuronas laterales ventrales pequeñas.

sNPF: *short neuropeptide F*.

TB: *terminal boutons*. Se refiere a un tipo de botón sináptico.

ZT: *zeitgeber time*: Tiempo medido en horas transcurrido desde el inicio de la señal sincronizadora.

# *Introducción*

## 1. Los ritmos circadianos

### 1.1 La medición del paso del tiempo y sus ventajas adaptativas

Los movimientos de la Tierra sobre su propio eje (rotación) y alrededor del sol (translación) así como los movimientos de rotación y translación de la luna imponen sobre los seres vivos cambios ambientales cíclicos. En particular, la rotación de la Tierra determina cambios diarios de la disponibilidad de radiación solar mientras que el movimiento de translación, sumado a la inclinación del eje terrestre, implica cambios anuales de fotoperiodo y temperatura. De manera interesante, todos los organismos presentan cambios de variables biológicas (ritmos biológicos) que son capaces de ajustarse a la periodicidad de estos ciclos geofísicos. Más aun, la presencia de relojes biológicos capaces de anticipar dichos cambios ambientales otorga una clara ventaja adaptativa.

Los ritmos biológicos pueden diferenciarse según su periodicidad. De esta manera, existen *ritmos circadianos* (con periodos cercanos a 24 horas), *ritmos circalunares* (con periodos cercanos a los 28 días o un mes lunar) y *ritmos circaanuales* (con periodos cercanos a los 365 días o año terrestre). Por otra parte, existen ritmos biológicos cuyo periodo no responde directamente a los cambios geofísicos, como son los *ritmos ultradianos* de menos de 24 horas de periodo (por ejemplo el ritmo cardíaco y pulmonar) o algunos *ritmos infradianos* de más de 24 horas de periodo (por ejemplo, el ciclo menstrual de mamíferos). De todos ellos, los ritmos circadianos son los más conservados entre los distintos organismos y el reloj biológico que lo gobierna es, por lo tanto, el más estudiado.

Organismos tan diversos como procariotas, hongos, plantas, moscas, roedores y seres humanos comparten los principios generales de funcionamiento que subyacen a estos relojes. Esto sugiere que incluso durante el inicio de la vida en la Tierra la presencia de ritmos con periodos cercanos al ciclo luz-oscuridad diario debe haber generado una ventaja adaptativa. En el caso de cianobacterias, la ventaja adaptativa que representa el poseer un reloj funcional ha sido demostrada experimentalmente en ensayos de competencia entre cepas con distintos periodos endógenos. La cepa con un periodo endógeno más cercano al ciclo de luz-oscuridad aplicado tiene mayor sobrevivencia (Ouyang *et al.*, 1998). En estos organismos primitivos la presencia de un sistema circadiano podría haber surgido como consecuencia de un mecanismo de protección contra daño al ADN por la intensa radiación solar durante la fase lumínica<sup>1</sup> (Pittendrigh, 1993) así como un mecanismo de

---

<sup>1</sup> En la Tierra primitiva la radiación ultravioleta (UV) no era filtrada por la atmósfera.



almacenamiento de ATP durante la fase de oscuridad<sup>2</sup> (Hut & Beersma, 2011). En mamíferos, en cambio, las evidencias de la ventaja adaptativa de la presencia de un reloj circadiano son escasas. Una excepción importante son los experimentos realizados por DeCoursey en donde se demuestra que ardillas con un reloj circadiano intacto presentan mayor sobrevivencia en la naturaleza que ardillas con el núcleo supraquiasmático (estructura donde reside el oscilador circadiano en el cerebro en mamíferos) lesionado (DeCoursey & Krulas, 1998).

Otra posible ventaja adaptativa de la presencia de un reloj circadiano es su capacidad de regular ritmos circanuales en la fisiología y el comportamiento (Goldman, 2001). En líneas generales, la duración del fotoperiodo es un indicativo del momento del año y la mayoría de los organismos responden a cambios de fotoperiodo utilizando su sistema circadiano. Los animales ajustan su comportamiento según el fotoperiodo y la temperatura maximizando la sobrevivencia y el éxito reproductivo; de esta manera, es esperable que las presiones de selección sobre un sistema que permita identificar el momento del año óptimo sean fuertes.

Una de las propiedades más interesantes de los ritmos circadianos es que, si bien son sincronizados diariamente por claves ambientales o *zeitgebers* (del alemán, dador del tiempo), se evidencian con un periodo cercano a las 24 horas aun en ausencia de ellas. Y es gracias a que cuentan con un reloj circadiano endógeno que los individuos pueden anticipar y preparar su fisiología a los cambios ambientales. En ausencia de claves ambientales que sincronicen el reloj, los ritmos presentan un periodo no exacto sino cercano a 24 horas (de ahí el nombre. En latín, *circa* cercano *diem* día). Por otra parte, el reloj circadiano se caracteriza por poseer mecanismos que le permiten compensar por cambios de temperatura es decir que el paso del reloj no se modifica significativamente dentro de un rango fisiológico (entre 18 y 28 °C en la mayoría de los organismos). De esta manera, por ejemplo, los animales cuya temperatura interna varía acorde con la externa (poiquilotermos) pueden tener un reloj interno con un periodo inalterado dentro de un rango fisiológico.

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.

---

<sup>2</sup> Una de las proteínas canónicas del reloj de cianobacterias, KaiC, forma hexámeros en presencia de ATP durante la fase lumínica y deshace estos hexámeros durante la noche, liberando ATP. Estos hexámeros estarían implicados en la compactación del ADN, protegiéndolo contra la radiación UV durante el día además de proveer de ATP durante la noche cuando el organismo no puede fotosintetizar.

## 1.2 El sistema circadiano

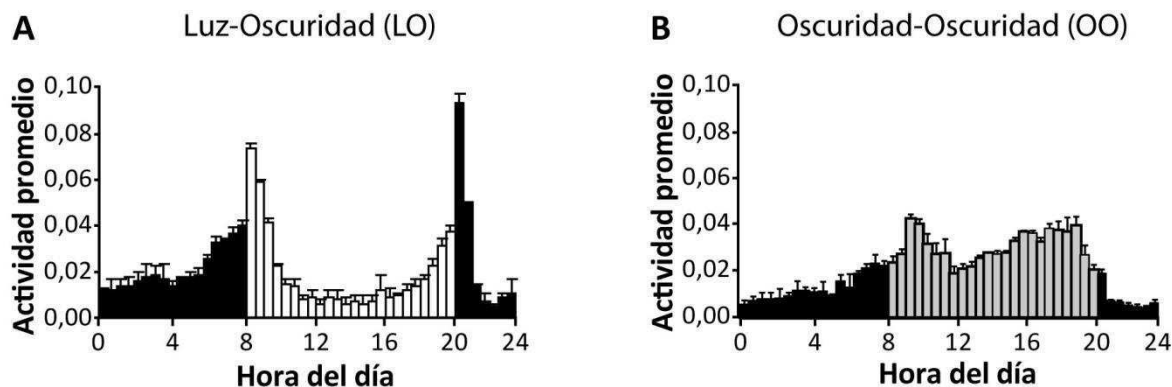
El sistema circadiano consta de 3 componentes distinguibles: las llamadas *vías de entrada* a través de las cuales llega la información del ambiente; un *oscilador central* formado por células marcapasos que mantienen el ritmo y determinan el periodo endógeno y las *vías de salida* que reciben la información del oscilador y modulan circadianamente diversas funciones biológicas.

En *Drosophila*, la principal clave sincronizadora es la luz, aunque también los ciclos de alta y baja temperatura (Glaser & Stanewsky, 2007) y la actividad social (Eban-Rothschild & Bloch, 2012) funcionan como *zeitgebers*. Por lo tanto, las *vías de entrada* del sistema circadiano consisten principalmente en estructuras fotoperceptivas como los fotorreceptores de los ojos compuestos, los ocelos y dos estructuras extrarretinales llamadas *Hofbauer-Buchner (H-B) eyelets*. A su vez, la luz es percibida directamente en todas las células que contienen un oscilador a través del fotorpigmento criptocromo (CRY por su nombre en inglés *cryptochrome*) (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998).

El oscilador central reside en un grupo de neuronas del sistema nervioso central que funciona como marcapasos, comandando el ritmo endógeno del individuo y sincronizando la actividad de osciladores periféricos subordinados en distintos tejidos (Hall, 2005; Reppert & Weaver, 2001). En el caso de mamíferos el oscilador central se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés), mientras que en *Drosophila* constituye una red circadiana de aproximadamente 150 neuronas. En estas neuronas las oscilaciones moleculares de los ARN mensajeros y proteínas codificadas por ciertos genes del reloj serían las responsables de generar y mantener el periodo endógeno (aunque existe controversia sobre el origen de las oscilaciones. Ver apartado “el origen del oscilador”).

Las *vías de salida* desde el oscilador central constituyen el elemento circadiano del que menos información se posee. Estas vías incluyen procesos biológicos de distinto grado de complejidad que van desde el control de expresión de genes de segundo orden por parte de componentes canónicos del reloj, hasta la modulación de señales eléctricas, endócrinas y metabólicas que impactan en la fisiología de tejidos periféricos. Por medio de estas *vías de salida*, el reloj circadiano modula procesos como ciclos de actividad y reposo, temperatura corporal, síntesis y liberación de hormonas, habilidad cognitiva, entre otros. En *Drosophila*, el comportamiento circadiano más estudiado es la actividad locomotora (Figura I1) dado la existencia de sistemas automatizados para su análisis. Sin embargo, se conocen varios comportamientos que presentan modulación circadiana, entre ellos la emergencia del

pupario (Konopka & Benzer, 1971), la sensibilidad olfativa (Krishnan *et al.*, 1999), oviposición (Howlander & Sharma, 2006), ciertos aspectos del cortejo (Fujii & Amrein, 2010; Fujii *et al.*, 2007) y el aprendizaje y la memoria de corto plazo (Lyons & Roman, 2009).



**Figura 11. Patrón poblacional locomotor de moscas macho salvajes. A. En presencia de ciclos de luz-oscuridad.** Las moscas son animales crepusculares con dos picos de actividad, uno al amanecer y otro al atardecer, separados por una fase de baja actividad o *siesta*. Las barras negras y blancas representan períodos de oscuridad y luz respectivamente. **B. En ausencia de claves ambientales.** El patrón comportamental es básicamente constante a lo largo del día subjetivo con pequeños incrementos de actividad en torno al inicio del día y de la noche subjetiva. Las barras negras y grises representan períodos de noche y día subjetivos respectivamente. Día/noche subjetivo: momento del día donde debería haber luz/oscuridad respectivamente si es que hubiera claves ambientales.

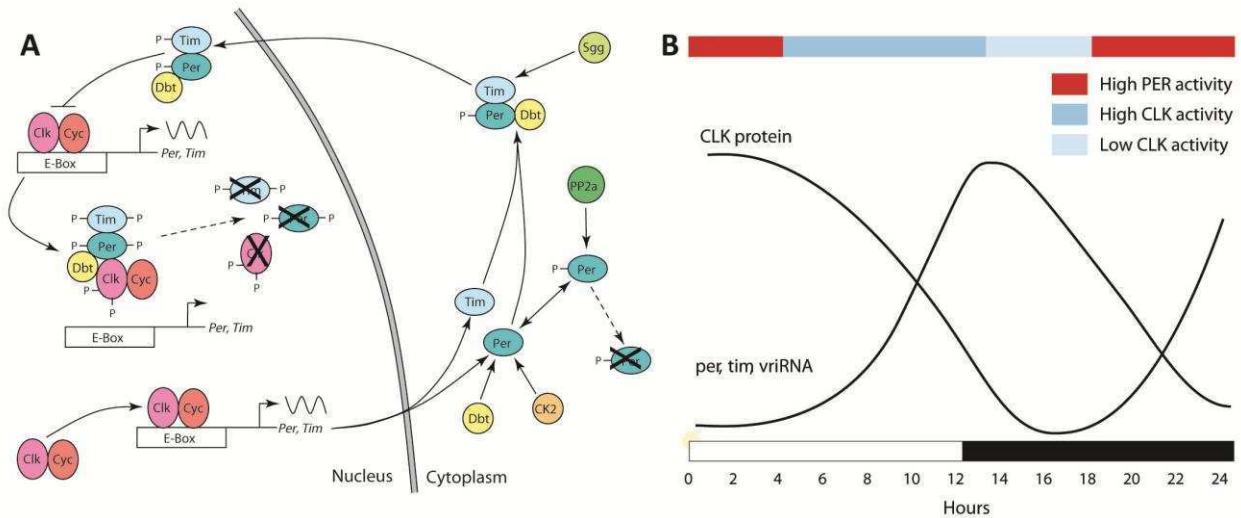
Por otra parte, existen mecanismos de *enmascaramiento* por medio de los cuales las vías de entrada pueden modular directamente la fisiología obviando el oscilador circadiano. Por ejemplo, la luz afecta de forma directa la actividad locomotora por lo cual incluso aquellos organismos que no poseen un reloj funcional pueden responder a las transiciones de fase demostrando un comportamiento que varía a lo largo del día pero no está controlado por un ritmo endógeno (Ashmore & Sehgal, 2003; Wheeler *et al.*, 1993).

### 1.3 El reloj molecular

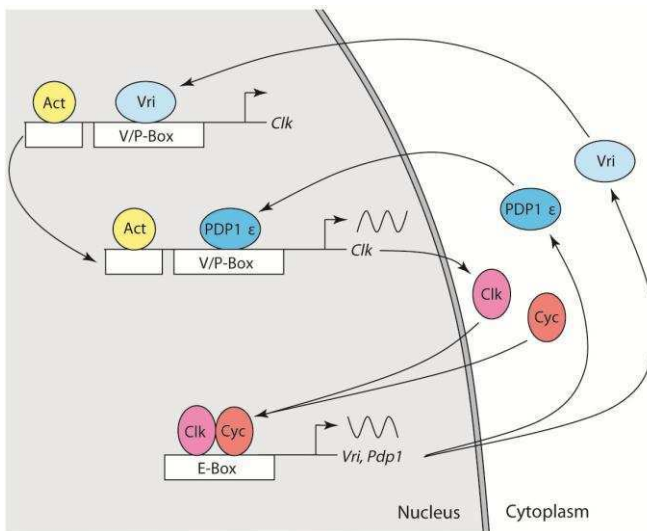
La facilidad de realizar *screen* genéticos en *Drosophila*, combinado con el análisis automatizado de la actividad locomotora ha permitido identificar los genes responsables de generar las oscilaciones circadianas a nivel molecular. Hoy en día se entiende que el paso del reloj circadiano depende de la regulación transcripcional y postraduccional de la expresión de genes canónicos del reloj en un ciclo que dura aproximadamente 24 horas. La regulación transcripcional se lleva a cabo por medio de dos

ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa que operan en fases opuestas, mientras que modificaciones postraduccionales realizan el control fino de la estabilidad y localización subcelular de las proteínas canónicas del reloj (Ozkaya & Rosato, 2012). En el primero de los ciclos, los factores de transcripción CLK y CYC heterodimerizan y se unen a las secuencias E-box presentes en los promotores de los genes *per* y *tim* (y de varias decenas de otros genes regulados directamente por el reloj, entre ellos *vri* y *pdp1*). La unión del heterodímero a las secuencias promotoras activa la transcripción generando un pico máximo de ARN mensajero de *per* y *tim* al inicio de la noche (2-4 horas después de apagada la luz o ZT14-16. ZT –*Zeitgeber Time*- se refiere a las horas transcurridas desde la última transición luz-oscuridad) (Figura I2B). Sin embargo, las proteínas no se acumulan debido a la fosforilación de PER vía DBT que lleva a la ubiquitinación y degradación mediada por la E3 ligasa SLIMB. A su vez, durante el día la unión de CRY a TIM dirige su fosforilación que promueve su degradación vía proteasoma. Hacia la mitad de la noche se alcanzan niveles de PER y TIM tales que permiten su dimerización y el complejo PER-TIM-DBT es translocado al núcleo en un proceso dependiente de la fosforilación por SGG. Una vez en el núcleo, el complejo PER-TIM o sólo PER se uniría a CLK reprimiendo su propia transcripción. Este ciclo finaliza al comenzar el día cuando la presencia de luz determina la degradación de TIM mediada por CRY (Figura I2A).

El segundo ciclo está determinado por las oscilaciones de VRI y PDP1  $\epsilon$ . Durante el día y el inicio de la noche CLK y CYC activan la transcripción de *vri* y *pdp1*. VRI se acumula en fase con su mensajero e inhibe la transcripción de *clk*. Por su parte, PDP1 se acumula más lentamente y al final de la noche activa la transcripción de *clk* (Figura I3). De esta forma, los niveles de CLK oscilan en antifase con los mensajeros de los genes bajo su control de transcripción. Finalmente, una vez que se libera la represión por parte de PER, el dímero CLK/CYC es capaz de dirigir la transcripción de *per*, *tim*, *vri* y *pdp1* para que comience un nuevo ciclo. La relevancia de VRI y PDP1  $\epsilon$  en la regulación positiva sobre los niveles de *clk* es clara en las neuronas del marcapasos central pero factores adicionales parecerían ser relevantes para el segundo ciclo en otras neuronas de la red circadiana (Ozkaya & Rosato, 2012).



**Figura 12. Primer ciclo de retroalimentación negativa. A. Modelo de los cambios de mensajero, estabilidad proteica y localización subcelular.** CLK/CYC activan la transcripción de *per* y *tim*, estos se acumulan, translocan al núcleo y reprimen su propia transcripción actuando sobre CLK. La acción de quinasas (DBT, CK2, SGG y CRY -no indicada en el esquema-) y fosfatasa (PP2a) determina la estabilidad de las proteínas PER y TIM. **B. Niveles de mensajero de *per*, *tim* y *vri* y de proteína CLK durante el día.** Los números debajo de las barras corresponden a las horas desde el encendido de la luz (ZT). Las barras blancas representan periodos de luz mientras que las negras, de oscuridad. **Modificado de Hardin, 2005; Young & Kay, 2001.**



**Figura 13. Segundo ciclo de retroalimentación negativa.** CLK/CYC activan la transcripción de *vri* y *pdp1* quienes funcionarán luego como represores y activadores de la transcripción de *clk* respectivamente durante el momento del día determinado. **Modificado de Hardin, 2005.**

#### 1.4 El circuito circadiano de *Drosophila*

El patrón de expresión de estos genes canónicos del reloj en el cerebro provee un marco para el entendimiento de la organización anatómica y funcional de los osciladores que controlan el

comportamiento locomotor rítmico. Cabe destacar que diferentes procesos modulados circadianamente podrían requerir de la actividad de otros grupos neuronales (e incluso depender de otros genes del reloj molecular), pero en esta tesis nos enfocaremos en el circuito neuronal que controla la actividad locomotora por ser el comportamiento circadiano más estudiado.

El clonado del gen *per* y la producción de anticuerpos permitió determinar la expresión de PER en la cabeza de la mosca, estando presente en fotorreceptores del ojo compuesto y ocelo, en la glía y en un grupo definido de neuronas en el cerebro (Ewer *et al.*, 1992; Siwicki *et al.*, 1988). Experimentos con mutantes descartaron la expresión de PER en las células fotorreceptivas como necesaria para el control de la ritmicidad comportamental (Helfrich, 1986; Vosshall & Young, 1995). Por otra parte, análisis de mosaicos *per<sup>01</sup>/per<sup>01</sup>*<sup>3</sup> demostraron que la correcta expresión de PER sólo en la glía no es suficiente para sostener la ritmicidad comportamental, a diferencia de la expresión de PER neuronal que determina un comportamiento rítmico robusto (Ewer *et al.*, 1992). Estos resultados demuestran que las neuronas PER<sup>+</sup> son el foco del control circadiano comportamental aunque, hoy en día, se sabe que la glía cumple un rol modulador del comportamiento locomotor rítmico (Ng *et al.*, 2011). Luego de la identificación, clonado (Myers *et al.*, 1995; Sehgal *et al.*, 1994) y generación de anticuerpos contra TIM, ensayos de inmunohistoquímica indicaron una gran superposición en la inmunoreactividad de PER y TIM (Kaneko & Hall, 2000; Kaneko *et al.*, 1997) y desde entonces las neuronas PER/TIM<sup>+</sup> son consideradas el circuito neuronal circadiano de *Drosophila*. Actualmente se han identificado cerca de 150 neuronas en el cerebro de la mosca que expresan PER y TIM junto con otros genes canónicos del reloj, existiendo así en cada una de ellas un reloj molecular funcional.

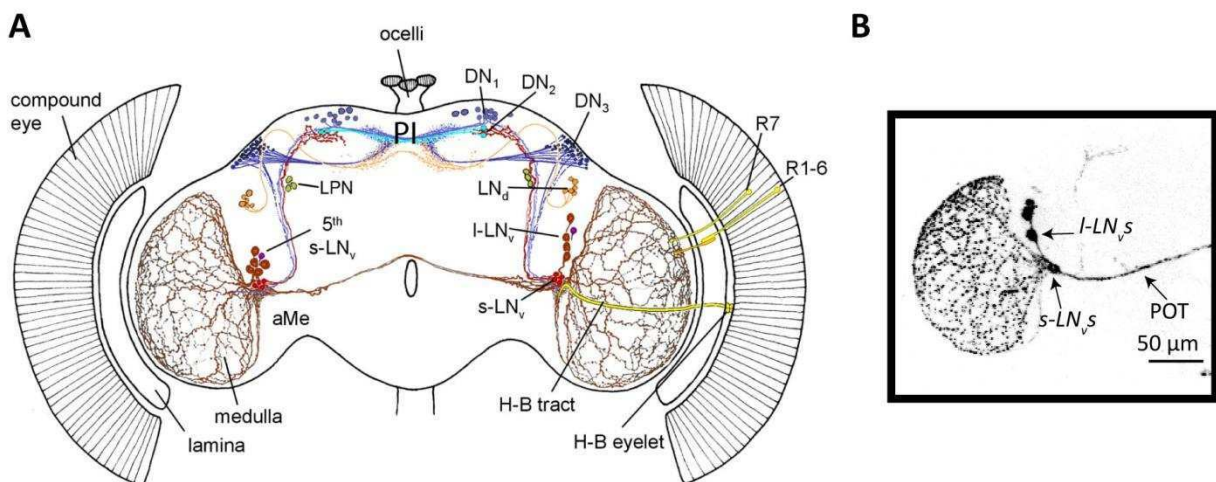
Las 150 neuronas que integran el circuito circadiano en el cerebro del adulto se dividen en 6 grupos de simetría bilateral, fundamentalmente en base a su localización (Figura I4). A grandes rasgos, se identifican un grupo de neuronas dorsales (en inglés, *DNs* por *Dorsal Neurons*) y otras laterales (en inglés, *LNs* por *Lateral Neurons*) ambas ubicadas en el protocerebro<sup>4</sup> de la mosca. Las neuronas dorsales se dividen a su vez en 16 *DN<sub>1s</sub>* (subdivididas a su vez en un grupo más posterior, *DN<sub>1p</sub>*, y un grupo más anterior, *DN<sub>1a</sub>*), 2 *DN<sub>2s</sub>* y aproximadamente 40 *DN<sub>3s</sub>*. Las neuronas laterales, por su parte, se dividen en 6 neuronas laterales dorsales (en inglés, *LN<sub>d</sub>s* por *dorsal Lateral Neurons*), 3 neuronas laterales posteriores que no expresan todos los componentes del reloj circadiano (en inglés, *LPNs* por *Lateral Posterior Neurons*) y 9 neuronas laterales ventrales (en inglés, *LN<sub>v</sub>s* por *ventral*

---

<sup>3</sup> *per<sup>0</sup>* es un mutante nulo para *per*.

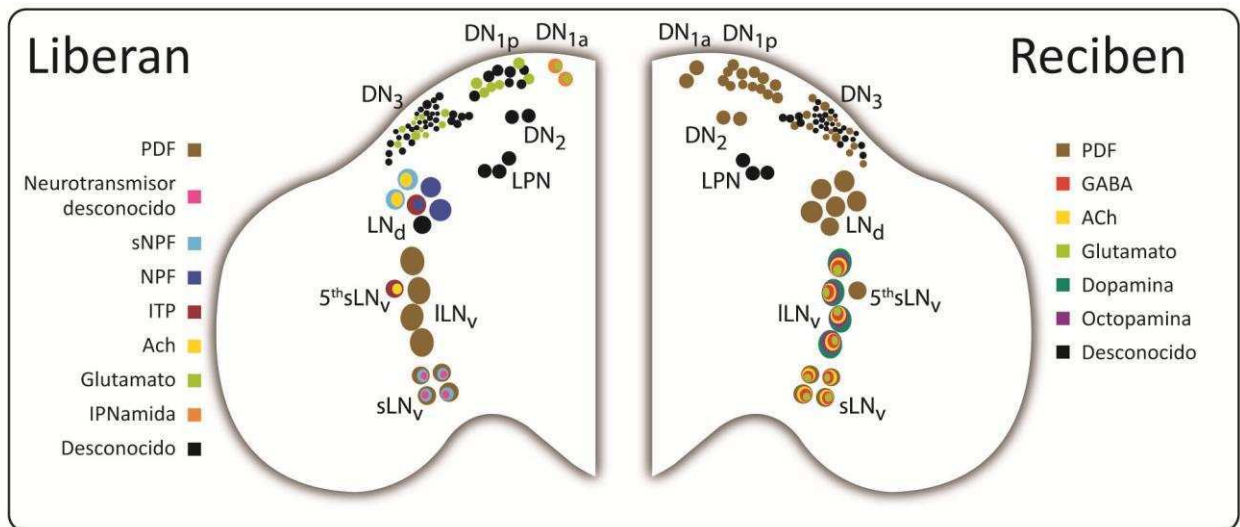
<sup>4</sup> En el cerebro de insectos se distinguen 3 lóbulos principales, el protocerebro, el deutocerebro y el tritocerebro. El protocerebro es el mayor centro integrativo y recibe además la información desde los ojos compuestos y ocelos.

*Lateral Neurons*). A su vez, las  $LN_v$ s se dividen según su tamaño en 4 neuronas grandes (en inglés *I-LN<sub>v</sub>s* por *large-ventral Lateral Neurons*) y 5 más pequeñas (en inglés *s-LN<sub>v</sub>s* por *small-ventral Lateral Neurons*). Las  $LN_v$ s también son conocidas como las neuronas PDF puesto que expresan el neuropéptido PDF (*Pigment Dispersing Factor*) salvo una de las *s-LN<sub>v</sub>s* que es PDF<sup>-</sup> (también conocida como la 5ta *s-LN<sub>v</sub>s*). Como se observa en la Figura 14, a excepción de las *I-LN<sub>v</sub>s* que proyectan sus axones a la médula del lado ipsi y contralateral, todos los grupos neuronales envían proyecciones al protocerebro dorsal donde sus terminales se superponen (Helfrich-Forster, 2003). La región dorsal presenta conexiones a todo el cerebro y alberga la mayoría de las áreas neurosecretoras importantes de *Drosophila* (como ser la *Pars Intercerebralis*, *PI*).



**Figura 14. El circuito neuronal de la mosca adulta. A. Grupos neuronales que expresan los genes del reloj.** Además de las neuronas del circuito circadiano, el esquema representa las principales estructuras foperceptivas que transmiten la información lumínica al reloj endógeno (los rabdomeros R7 y R1-6 del ojo compuesto, los ocelos, *H-B eyelet* y *H-B tract*). *aMe* es la médula accesoria, región donde se encuentran los somas de las  $LN_v$ s. *PI*: *Pars Intercerebralis*. **Modificado de Helfrich-Forster et al., 2007. B. Circuito PDF.** Inmunohistoquímica de hemiserebro adulto contra el neuropéptido PDF delimitando las neuronas PDF, *I-LN<sub>v</sub>s* y *s-LN<sub>v</sub>s*. POT: tracto óptico posterior. La imagen corresponde a una fotografía sacada durante el transcurso de esta tesis.

Cabe destacar que a pesar de la proximidad anatómica, las neuronas dentro de un mismo grupo pueden no ser funcionalmente idénticas puesto que pueden recibir y liberar distintos neurotransmisores o neuropéptidos, expresar distintos complementos de genes e incluso diferenciarse en las proyecciones axonales y dendríticas (Figura 15).



**Figura 15. Caracterización neuroquímica de neuronas del circuito circadiano.** El color distinto en las neuronas indica las moléculas que expresan dichas células. NPF (Neuropéptido F), sNPF (*short* NPF), ITP (*Ion Transport Peptide*) y Ach (Acetilcolina). Cuando no se conoce el contenido peptidérgico de las neuronas se indica con color negro. **Modificado de Muraro et al., en revisión.**

La actividad conjunta de las neuronas del circuito circadiano define un comportamiento locomotor rítmico robusto pero plástico a distintas condiciones ambientales. En ese sentido, las DN<sub>2</sub>s y LPNs están involucradas en el entrenamiento por temperatura (Miyasako *et al.*, 2007; Yoshii *et al.*, 2009), un subgrupo de las DN<sub>1</sub>s integra tanto información lumínica como térmica para controlar el comportamiento locomotor rítmico (Zhang *et al.*, 2010), las LN<sub>d</sub>s y la 5ta s-LN<sub>v</sub>s (PDF<sup>-</sup>) controlarían la actividad locomotora durante el atardecer (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004) o la actividad durante todo el día en fotoperiodos largos (Rieger *et al.*, 2009) mientras que las s-LN<sub>v</sub>s PDF<sup>+</sup> controlarían la actividad locomotora durante el amanecer (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004) y la actividad durante todo el día en fotoperiodos cortos (Picot *et al.*, 2007; Stoleru *et al.*, 2007).

Los trabajos mencionados demuestran la capacidad de la red neuronal circadiana de adaptarse a distintas condiciones ambientales y que cada grupo neuronal juega un rol relevante en dicha plasticidad. Sin embargo, existe una clara jerarquía en cuanto a la relevancia de la función de cada grupo neuronal para el control rítmico en ausencia de claves ambientales. El correcto funcionamiento de las LNs es necesario y suficiente para generar ritmos robustos de actividad locomotora y eclosión en ausencia de claves ambientales. El mutante *disconnected* (*disco*) que no posee LNs funcionales es arrítmico y la aparición ocasional de un mutante *disco* con al menos una s-LN<sub>v</sub> funcional correlaciona con actividad rítmica (Helfrich-Forster, 1998). Por otra parte, moscas que expresan *per* sólo en las LNs



son rítmicas aunque no con la misma robustez que individuos salvajes (Frisch *et al.*, 1994). Más aun, el rescate de la expresión de *per* restringido a las  $LN_v$ s es suficiente para restaurar la ritmicidad comportamental (Grima *et al.*, 2004). A su vez, la ablación específica de las neuronas  $LN_v$ s PDF<sup>+</sup> redundante en la pérdida del comportamiento rítmico de actividad locomotora (Renn *et al.*, 1999) por lo que las neuronas PDF constituirían el marcapasos circadiano principal.

Si bien los trabajos de Grima y Renn no permiten discernir cual de los subgrupos de neuronas PDF es el marcapasos principal, múltiples evidencias sugieren que el oscilador central de *Drosophila* se encuentra dentro de las  $s-LN_v$ s. La primera evidencia surge de la observación de la morfología; mientras que las  $l-LN_v$ s envían sus axones hacia el sistema visual, las  $s-LN_v$ s proyectan y liberan PDF hacia el protocerebro dorsal donde posiblemente contacten con grupos relevantes para el control del comportamiento (Helfrich-Forster *et al.*, 2007; Shafer *et al.*, 2008). En segundo lugar, varios laboratorios observaron que las oscilaciones moleculares en las  $l-LN_v$ s se pierden al tercer día en ausencia de claves ambientales mientras que se mantienen en las  $s-LN_v$ s (Taghert & Shafer, 2006). Por otra parte, los niveles de PDF se encontrarían regulados por los factores de transcripción CLK y CYC, aunque no de forma cíclica, en las  $s-LN_v$ s pero no en las  $l-LN_v$ s (Park *et al.*, 2000). Finalmente, y tal como ya se mencionó, los mutantes *disco* que ocasionalmente presentaban alguna  $s-LN_v$  proyectando hacia el protocerebro dorsal resultaban rítmicos en actividad locomotora (Helfrich-Forster, 1998).

Además de la ritmicidad en ausencia de claves ambientales, el reloj circadiano controla ciertos aspectos del comportamiento en ciclos de Luz-Oscuridad (LO, fase de entrenamiento). En *Drosophila*, además de la respuesta directa a las transiciones de fase existen anticipaciones de cada una de ellas que se manifiestan como un incremento gradual de la actividad hacia el final del día y hacia el final de la noche (Figura 11). La anticipación al cambio de fase es un aspecto del comportamiento en LO que está controlado por el sistema circadiano. En los años '70s Pittendrigh y Daan propusieron que este comportamiento estaría comandado por 2 osciladores distintos; un oscilador M (del inglés, *Morning oscillator*) controlaría la anticipación a la mañana y se aceleraría por la acción de la luz mientras que el oscilador E (del inglés, *Evening oscillator*) sería responsable de inducir la actividad de anticipación a la noche y se enlentecería por la acción de la luz. En el año 2004, dos trabajos encontraron el correlato neuronal de estos dos osciladores. Por medio de manipular el reloj molecular (Grima *et al.*, 2004) o la ablación de distintos grupos neuronales circadianos (Stoleru *et al.*, 2004) y luego analizar el comportamiento en LO estos trabajos demostraron que las  $LN_v$ s PDF<sup>+</sup> (probablemente sólo las  $s-LN_v$ s PDF<sup>+</sup>) controlan la anticipación de la mañana (en inglés *MP* por *Morning Peak*) mientras que la

anticipación de la tarde (en inglés *EP* por *Evening Peak*) está controlada por las  $LN_{dS}$ ,  $DN_{1S}$  y posiblemente la 5ta  $s-LN_v$  PDF. Actualmente se entiende que la función como oscilador M o E no estaría necesariamente restringida a ciertos grupos neuronales definidos anatómicamente sino que dependería de las condiciones ambientales de entrenamiento (Peschel & Helfrich-Forster, 2011).

### 1.5 Las vías de salida desde el marcapasos central de la mosca

Como se comentó anteriormente, las vías de salida desde el marcapasos central ( $s-LN_v$ s) constituyen el elemento circadiano del que menos información se posee hoy en día. Entre los mecanismos que se proponen para la transferencia de la información circadiana se destacan la acción del neuropéptido PDF, cambios diarios de la conectividad de las neuronas PDF y modulación de la actividad eléctrica del circuito circadiano.

Moscas que no expresan el neuropéptido PDF (moscas con el alelo nulo  $pdf^0$ ) presentan claras alteraciones en la ritmicidad comportamental (Renn *et al.*, 1999) así como una desincronización en las oscilaciones moleculares en los grupos dorsales ( $LN_{dS}$  y  $DN_{1S}$ ) (Lin *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2003). Por estas razones, se ha postulado al neuropéptido PDF como un factor sincronizador del circuito circadiano. La señal de PDF actúa por medio de su receptor PDFR que está asociado a proteína G y la activación del receptor lleva a un incremento de los niveles de  $AMP_c$  (Lear *et al.*, 2005b; Mertens *et al.*, 2005). En respuesta a aplicación exógena de PDF se observa un aumento de  $AMP_c$  en varias de las neuronas del reloj, implicando que gran parte de la red circadiana, incluidas las propias  $s-LN_v$ s pero no las  $l-LN_v$ s, podría responder al neuropéptido (Shafer *et al.*, 2008). De manera interesante, recientemente se ha descrito que el neuropéptido PDF señala a través de distintas adenilatos ciclasas en diferentes grupos neuronales (Duvall & Taghert, 2012) y comunicación personal del Dr. Paul Taghert); de esta manera, la información circadiana provista por el neuropéptido podría ser leída por las neuronas PDFR<sup>+</sup> de manera distinta y activar diferentes cascadas de señalización río abajo del mismo receptor.

Por otra parte, las neuronas  $LN_v$ s no expresan solamente el neuropéptido PDF. Hoy en día se sabe que las  $s-LN_v$ s expresan también el neuropéptido sNPF (del inglés, *small Neuropeptide F*) aunque la relevancia de dicho neuropéptido en el control de la actividad locomotora no ha sido claramente demostrada (Hermann *et al.*, 2012; Johard *et al.*, 2009). A su vez, imágenes de microscopía electrónica permitieron identificar en los axones de las  $s-LN_v$ s pequeñas vesículas claras asociadas a

estructuras presinápticas, además de las vesículas densas que contienen PDF (Yasuyama & Meinertzhagen, 2010), sugiriendo que algún neurotransmisor rápido podría formar parte del sistema.

Si bien los niveles de mensajero y proteína de PDF no oscilan (Park & Hall, 1998; Park *et al.*, 2000), la señal inmunoreactiva de PDF al nivel de las terminales dorsales de las *s-LN<sub>v,s</sub>* cambia a lo largo del día, observándose mayor inmunoreactividad durante la mañana y menor durante la noche (Park *et al.*, 2000). Estos cambios diarios son comúnmente interpretados como cambios circadianos en la liberación del neuropéptido y podrían constituir un mecanismo a través del cual las neuronas transmiten información diferencial durante el día, aunque dicha posibilidad aún no ha sido demostrada. Más aun, la relevancia de estos cambios en la terminal para el control del comportamiento ha sido puesta en duda (Kula *et al.*, 2006).

Sumado a los cambios en la señal del neuropéptido, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la estructura de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v,s</sub>* sufre groseros cambios morfológicos circadianos. Durante la mañana, cuando los niveles del neuropéptido son altos, las terminales axonales se encuentran más desarrolladas mientras que durante la noche, cuando los niveles de PDF son bajos, la complejidad de la terminal es menor (Fernandez *et al.*, 2008). Estos cambios morfológicos podrían implicar cambios diarios en los contactos sinápticos de las neuronas marcapasos y, en consecuencia, contribuir a la transmisión de la información circadiana.

En cuanto a la modulación de la actividad eléctrica, en mamíferos se ha reportado oscilaciones diarias en los niveles de calcio (Colwell, 2000) y de las corrientes evocadas por NMDA (Colwell, 2001) que podrían, en parte, explicar los ritmos circadianos en la frecuencia espontánea de disparo de las neuronas del SCN (Green & Gillette, 1982; Kuhlman & McMahon, 2004; Schwartz *et al.*, 1987; Welsh *et al.*, 1995). En *Drosophila*, se ha observado oscilación circadiana en la tasa de disparo de las *l-LN<sub>v,s</sub>* (Cao & Nitabach, 2008; Park & Griffith, 2006; Sheeba *et al.*, 2008) así como oscilación en el potencial de reposo de las *s-LN<sub>v,s</sub>* (Cao & Nitabach, 2008). En particular, las neuronas *l-LN<sub>v,s</sub>* presentan mayor frecuencia de disparo al principio del día y van disminuyendo su tasa hasta llegar a un mínimo al inicio de la noche; las *s-LN<sub>v,s</sub>*, por su parte, se encuentran más despolarizadas alrededor del inicio de la mañana (Cao & Nitabach, 2008). Resulta interesante que varios constituyentes básicos de la membrana que determinan su excitabilidad, como canales iónicos y receptores, están regulados circadianamente a nivel de ARN mensajero (Ceriani *et al.*, 2002; Claridge-Chang *et al.*, 2001; Kula-Eversole *et al.*, 2010). A su vez, la actividad eléctrica de las neuronas PDF puede modificar el estado del transcriptoma circadiano aunque no afecta el estado de los genes canónicos del reloj (Mizrak *et*

*al.*, 2012), es decir que la actividad eléctrica no determina el funcionamiento del reloj molecular. Este último punto será explayado más adelante.

Por otra parte, el silenciamiento eléctrico crónico así como la hiperexcitación de las neuronas PDF altera la ritmicidad comportamental y afecta el paso de las oscilaciones moleculares en neuronas dorsales (Nitabach *et al.*, 2002; Nitabach *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008a). Estos resultados, junto con el análisis de mutantes para canales iónicos de expresión endógena en el circuito circadiano (Fernandez *et al.*, 2007; Hodge & Stanewsky, 2008; Lear *et al.*, 2005a), demuestran la importancia de la modulación de la excitabilidad de las membranas para propagar la información circadiana.

### 1.6 La plasticidad estructural de las neuronas PDF

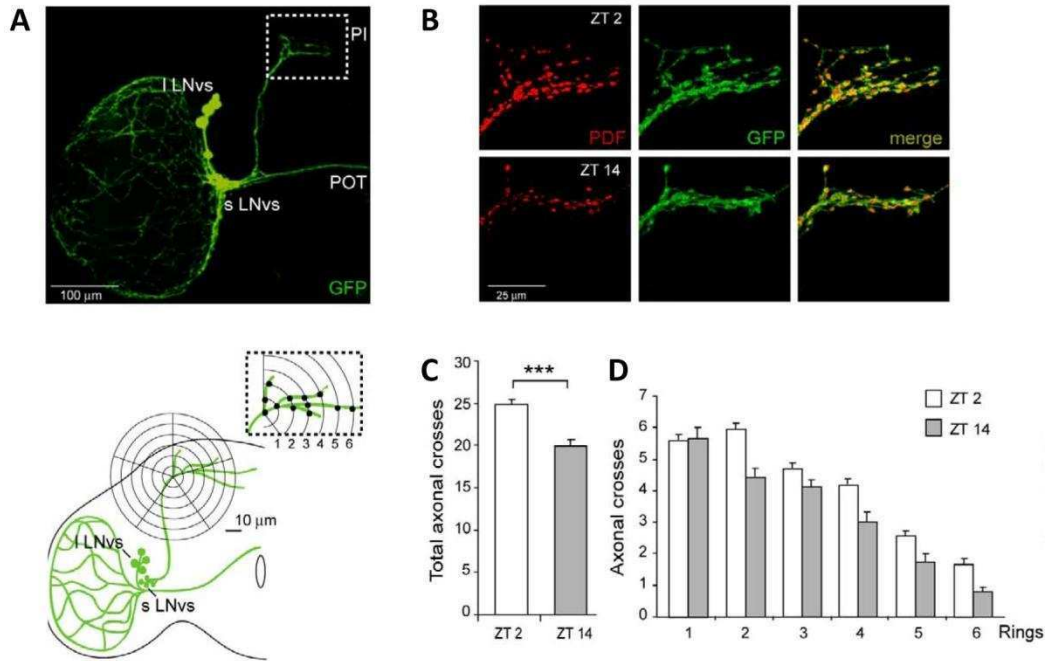
La plasticidad estructural que sufren las terminales axonales de las *s-LN<sub>s</sub>* es un fenómeno de sumo interés desde el punto de los mecanismos moleculares responsables de la misma<sup>5</sup> pero también por las implicancias funcionales que dicho remodelamiento axonal podría tener en la determinación de los contactos sinápticos así como en el control del comportamiento rítmico.

Estos cambios en la complejidad de las terminales de las *s-LN<sub>s</sub>* pueden ser cuantificados de una manera relativamente sencilla, mostrando más entrecruzamientos axonales durante el principio de la mañana y menos entrecruzamientos axonales durante el principio de la noche (Figura I6).

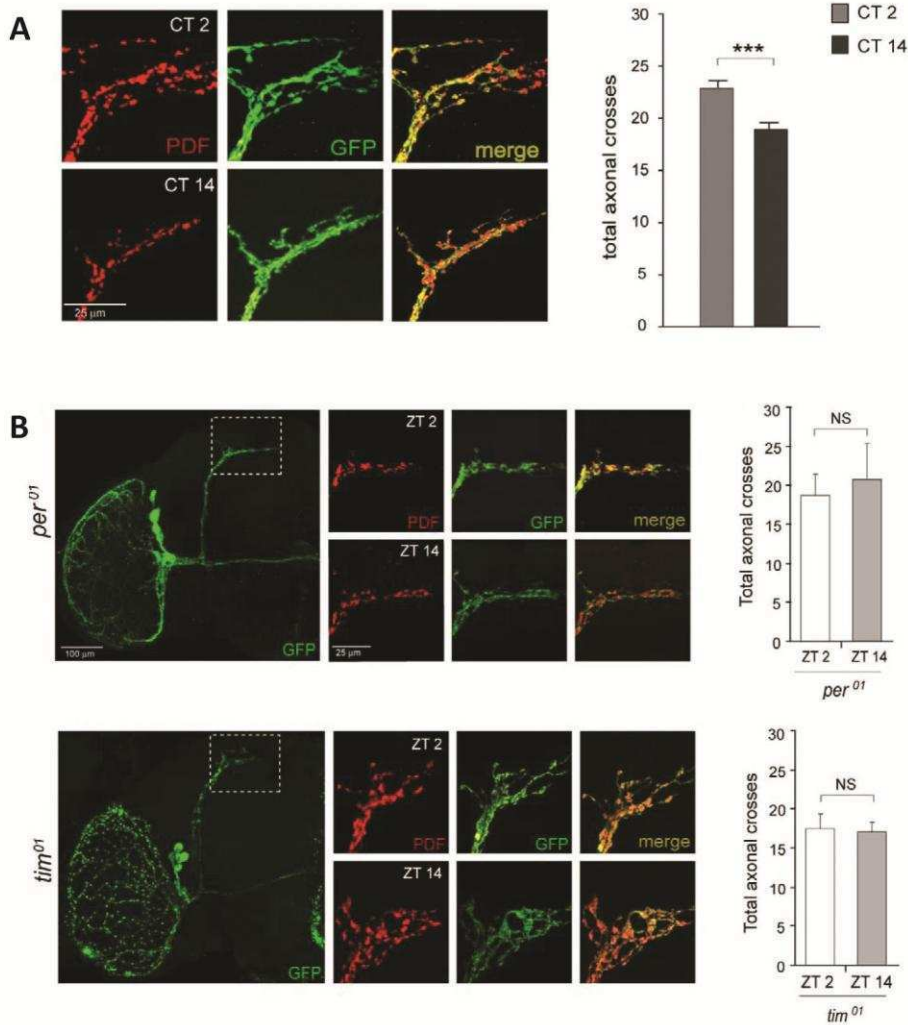
La plasticidad estructural de las neuronas PDF no es una respuesta directa de la luz sino un verdadero fenómeno regulado por el reloj endógeno puesto que sigue ocurriendo en ausencia de claves ambientales pero se abole en mutantes canónicos del reloj (Figura I7). Además, este tipo particular de plasticidad estructural circadiana persiste a lo largo de los días ya que no está restringida sólo a individuos recién eclosionados (incluso animales de 2 semanas de edad presentan remodelamiento axonal circadiano de las neuronas PDF) y no hay dimorfismo sexual evidente (Fernandez *et al.*, 2008).

---

<sup>5</sup> Ejemplos de plasticidad estructural axonal en la vida adulta de la magnitud del caso de las neuronas PDF no son comunes e implicarían cambios estructurales de gran escala en una relativa corta escala temporal.



**Figura 16. Remodelamiento axonal diario de las terminales dorsales de las neuronas PDF. A. Método de medición de la complejidad axonal.** Imagen confocal de un hemicerebro en donde la membrana de las neuronas PDF está marcada por la expresión de CD8GFP. La región de análisis está delimitada con línea punteada (**arriba**). Diagrama explicando el método de cuantificación de la complejidad de la estructura (**abajo**). **B.** Imágenes de confocal representativas tomadas durante el principio de la mañana (ZT2) y el principio de la noche (ZT14) mostrando la oscilación en la señal del neuropéptido PDF (rojo) así como los cambios estructurales (verde). El último panel hacia la derecha corresponde a la colocalización de ambas señales. **C.** El número total de intersecciones entre los anillos concéntricos y las proyecciones axonales es significativamente distinto entre animales salvajes disectados durante el día (ZT2) y la noche (ZT14). **D.** La complejidad de las arborizaciones axonales es consistentemente menor a lo largo de toda la proyección en la configuración nocturna. **Modificado de Fernandez et al., 2008.**



**Figura 17. El remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>s</sub>* es un fenómeno controlado por el reloj circadiano. A. Los cambios en el grado de ramificación están preservados en ausencia de claves ambientales. Imágenes de microscopio confocal representativas de cerebros disectados al principio del día subjetivo (CT2) y de la noche subjetiva (CT14) y teñidos con anti-PDF (rojo) y anti-GFP (verde) (izquierda). El número de entrecruzamientos totales es significativamente mayor a CT2 respecto a CT14 (derecha). B. Mutantes del reloj no presentan plasticidad estructural. Mutantes nulos de *per* (*per<sup>01</sup>*) y de *tim* (*tim<sup>01</sup>*) no muestran diferencias significativas en el número total de entrecruzamientos al inicio de la mañana (ZT2) y el inicio de la noche (ZT14). Modificado de Fernandez *et al.*, 2008.**

### 1.7 El origen del oscilador: ¿actividad de membrana o reloj molecular?

Los trabajos realizados en las últimas décadas han permitido desentrañar con gran precisión los complejos mecanismos que subyacen al funcionamiento del reloj molecular. Más que la “sencilla” oscilación de la expresión de un número definido de moléculas, el correcto paso del reloj molecular

depende de un fino control de los niveles de transcripción, estabilidad de mensajero, nivel de fosforilación de proteínas, formación de complejos proteicos y cambios de la localización subcelular (Ozkaya & Rosato, 2012). Este riguroso control del paso del tiempo a nivel molecular ha llevado a la idea actual de que son las oscilaciones moleculares de los genes del reloj la base funcional del reloj circadiano. Sin embargo, en la década del '70 se propuso un modelo alternativo en donde las oscilaciones circadianas estaban basadas en interacciones de retroalimentación entre sistemas de transporte de iones en la membrana y el gradiente de concentración iónica (Njus *et al.*, 1976). De esta forma, existen dos modelos para explicar el origen de las oscilaciones circadianas, uno basado en la actividad en el núcleo y el otro basado en la actividad en la membrana. Si el modelo correcto fuera el que se centra en la actividad en el núcleo, entonces el reloj molecular debería ser el responsable de las oscilaciones en la actividad de membrana de neuronas marcapasos. Alternativamente, si el modelo correcto fuera el basado en la membrana, entonces las oscilaciones diarias en el potencial de membrana de neuronas marcapasos deberían generar las oscilaciones a nivel de los genes canónicos del reloj.

En mamíferos, abolir reversiblemente las oscilaciones de actividad eléctrica (por medio del bloqueo de los potenciales de acción aplicando TTX –tetradotoxina- en neuronas disociadas de SCN en cultivo) no afecta la fase circadiana de los disparos, sugiriendo que el oscilador circadiano no se vio afectado durante la fase de silenciamiento (Welsh *et al.*, 1995). Más aun, experimentos en animales intactos sugieren que el SCN posee un marcapasos circadiano que es resistente a la acción de TTX (Schwartz *et al.*, 1987). Trabajos más recientes demuestran que al menos en un subgrupo de neuronas en el SCN las oscilaciones moleculares de un reportero circadiano no se detienen en ausencia de conexiones sinápticas, resaltando la autonomía del oscilador molecular. Por lo tanto, al menos en el sistema circadiano de mamíferos, el modelo que más se ajusta a las observaciones experimentales es el basado en la actividad en el núcleo.

En *Drosophila*, sin embargo existía una gran controversia respecto al origen del oscilador circadiano. Por un lado, interrumpir la transmisión sináptica o afectar groseramente la actividad eléctrica de la red circadiana no afecta las oscilaciones moleculares en el marcapasos central (Fernandez *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2000). Por otro lado, el silenciamiento crónico eléctrico de las neuronas PDF detiene el paso del oscilador molecular en cerebro de adultos (Nitabach *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2008a) y de larvas (Nitabach *et al.*, 2005). Estos últimos resultados llevaron a los autores a proponer que la actividad de las conductancias iónicas son un componente esencial del oscilador

circadiano (Nitabach *et al.*, 2005). Sin embargo, estos experimentos presentan el problema de que el silenciamiento eléctrico se realizó desde el inicio del desarrollo de las neuronas PDF. Afectar durante todo el desarrollo del circuito las propiedades intrínsecas de las neuronas, como es el caso del potencial de membrana, puede desencadenar mecanismos compensatorios o incluso afectar la fisiología celular de manera irreversible. En este sentido, las conclusiones sacadas a partir del análisis de estos experimentos pueden ser engañosas y, por lo tanto, resulta necesario acotar en el tiempo el silenciamiento eléctrico para poder analizar la validez del modelo propuesto por los autores.

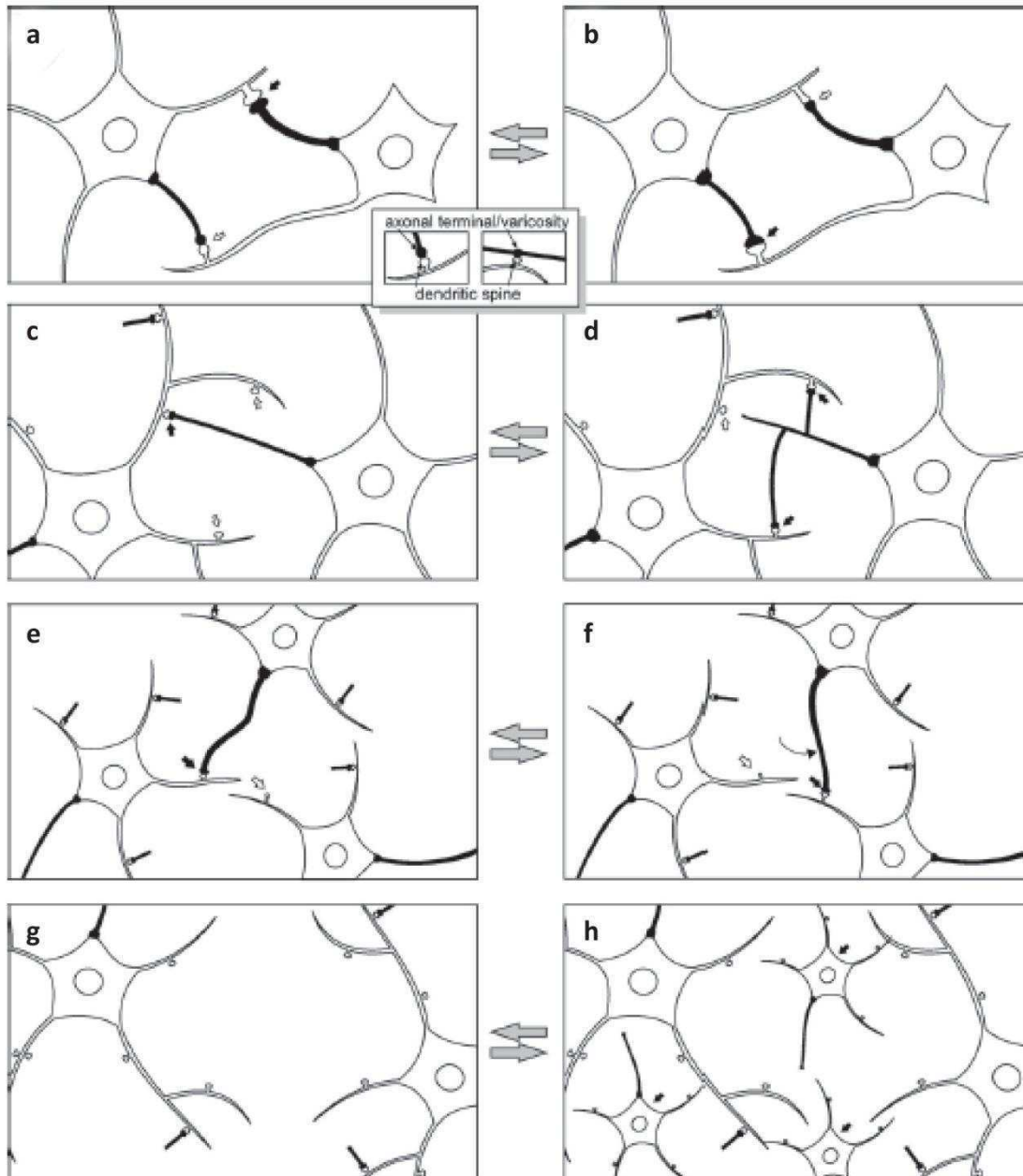
## 2. Mecanismos de plasticidad neuronal

Como se comentó anteriormente, los cambios morfológicos circadianos que sufren las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* son un ejemplo de plasticidad neuronal interesante del que aun no se conocen los mecanismos celulares y moleculares que lo subyacen. Para poder entender los mecanismos moleculares que podrían resultar responsables de los cambios morfológicos de las neuronas PDF es necesario primero familiarizarse con los mecanismos básicos de ensamblado de circuitos neuronales que se reclutan durante el desarrollo del sistema nervioso así como los que estarían implicados en la plasticidad neuronal durante la adultez.

La plasticidad neuronal puede implicar cambios en la fuerza de la transmisión sináptica en sinapsis individuales (plasticidad funcional) o bien cambios que afecten la conectividad anatómica de los circuitos (plasticidad estructural). En este sentido, la plasticidad estructural es un fenómeno de gran complejidad que compromete cambios en el número de sinapsis, en la densidad de fibras axonales, en el patrón de arborización de axones y dendritas, en los patrones de conectividad sináptica e incluso cambios en el número de células (Figura 18) (Butz *et al.*, 2009).

Tomando en consideración que la plasticidad del circuito PDF actúa sobre cambios estructurales en las terminales axonales, nos enfocaremos en los mecanismos involucrados en la plasticidad estructural de axones.





**Figura 18. Mecanismos de plasticidad estructural.** (a-b) A diferencia de la plasticidad estructural, la plasticidad funcional modifica la fuerza de transmisión sináptica sin afectar la conectividad anatómica de los circuitos. Esto se puede dar por aumento o disminución de receptores postsinápticos, cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisores o cambios en la morfología de sinapsis. (c-d) Diversos mecanismos de plasticidad estructural pueden modificar los contactos sinápticos entre los mismos pares de axones y dendritas. El crecimiento y formación de ramas axonales y/o dendríticas altera el número de elementos pre y postsinápticos que pueden conectarse, respectivamente. A su vez, la retracción de ramas axonales o dendríticas puede causar la pérdida de elementos sinápticos. (e-f) Otra forma de plasticidad estructural es la de recableado sináptico (en inglés, *synaptic rewiring*) e implica la retracción de elementos pre y postsinápticos de sus blancos originales para luego conectarse con otras neuronas. (g-h) La neurogénesis, durante el desarrollo o en el adulto, constituye otro mecanismo de plasticidad estructural puesto que conlleva a grandes cambios en la conectividad anatómica. Modificado de Butz *et al.*, 2009.

## 2.1 Ensamblado de circuitos neuronales durante el desarrollo

A medida que las neuronas se diferencian, sus axones en desarrollo tienen que encontrar su blanco apropiado, fenómeno que es conocido como guiado axonal. Para ello dependen principalmente de la comunicación entre células a través del contacto directo célula-célula, el contacto célula y matriz extracelular (de la cual pueden recibir las secreciones de otras células) y de la comunicación entre células distantes por medio de señales químicas difusibles. A su vez, a medida que las neuronas van adquiriendo sus propiedades funcionales comienzan a comunicarse vía disparo de potenciales de acción y transmisión sináptica. Como se detallará más adelante, la comunicación sináptica participa en la estabilización de las ramas axonales. En esta sección, se explicará muy brevemente los mecanismos claves que subyacen al ensamblado de los circuitos neuronales.

Una vez que los neuroblastos finalizan su migración y encuentran su posición apropiada en el sistema nervioso, las neuronas diferencian y extienden los procesos (neuritas) que eventualmente serán las dendritas y axones. La punta en crecimiento de la neurita constituye el cono de crecimiento. El cono de crecimiento presenta en su superficie receptores que le permiten percibir moléculas señalizadoras de corto y largo alcance, e indirectamente enlazar con la maquinaria de movimiento en el cono de crecimiento y de este modo atraer o repeler la elongación del cono (Suter & Forscher, 2000). A su vez, el cono de crecimiento secreta proteasas y enzimas que le permiten degradar la matriz extracelular a medida que va avanzando.

Entre las proteínas que expresa la matriz extracelular se encuentra la LAMININA. El axón en crecimiento expresa en su membrana INTEGRINAS que se unen a la LAMININA y esa interacción promueve la elongación axonal. Se ha visto que las neuronas tienen preferencia por diferentes sustratos de la matriz extracelular de acuerdo al subtipo de integrinas que expresen (McKerracher *et al.*, 1996). Además de la interacción LAMININA-INTEGRINA, el guiado axonal depende de diversos factores presentes en la matriz extracelular. Estos factores pueden ser atractantes o repelentes (como las SEMAFORINAS que actúan a través de los receptores PLEXINAS y NEUROPILINAS o SLIT que actúa a través de su receptor ROBO) del elongado axonal. Otras señales pueden funcionar como atractantes o repelentes según las moléculas expresadas en la membrana del axón. Por ejemplo, NETRINA-UNC6 es una señal secretada producida en la línea media ventral de vertebrados e invertebrados y atrae a algunos axones mientras que repele a otros, ayudando de esta forma a determinar los axones que se extenderán ventral o dorsalmente (Colamarino & Tessier-Lavigne, 1995; Hedgecock *et al.*, 1990).

A su vez, axones relacionados suelen viajar juntos y sólo se segregan cuando llegan a su destino final. La fasciculación axonal depende del balance entre señales neuronales que gobiernan el grado de asociación entre axones del mismo haz y señales no neuronales que pueden o atraer a axones particulares causando su salida del haz (defasciculación) o repeler el contacto entre axones y sustratos no neuronales y de esta forma promover el mantenimiento de los axones en el haz (fasciculación). Entre las señales neuronales se destacan las moléculas de adhesión celular (del inglés CAMs por *Cell Adhesion Molecules*) que promueven la fasciculación axonal. Por otra parte, existen interacciones entre axones heterotípicos que promueven la defasciculación asegurando así la correcta segregación de axones no relacionados que deben extenderse hacia regiones blancos diferentes. Por ejemplo, el receptor de EFRINA A (en inglés *EphA* por *Ephrin A*) en axones de motoneuronas *EphA*<sup>+</sup> previene el fasciculado con axones sensoriales *EphA*<sup>+</sup> dentro de los nervios axiales que viajan por los músculos (Gallarda *et al.*, 2008). Por otro lado, entre las señales no neuronales, la expresión de SEMAFORINA 3A en vertebrados alrededor de los axones promueve la hiperfasciculación (Kitsukawa *et al.*, 1997). En cambio la expresión axonal de SEMAFORINA 1A en *Drosophila*, actuando conjuntamente con CAMs (FASCICLINA 2 y CONECTINA), promueve la defasciculación axonal (Yu *et al.*, 2000).

Una vez que el cono de crecimiento llega a su destino final, éste colapsa permitiendo la formación de una sinapsis. El proceso de sinaptogénesis consiste en el reclutamiento de los elementos apropiados en los compartimentos pre y postsinápticos permitiendo luego la maduración y plasticidad sináptica. En el lado presináptico, las SINAPSINAS tienen un rol prominente en la regulación y maduración de nuevas varicosidades/terminales axonales. A su vez, el complejo de adhesión celular CADERINA-CATENINA contribuye a la formación, estabilización y plasticidad de sinapsis (Arikkath & Reichardt, 2008). En cultivos celulares se vio que las N-CAMs (del inglés, *Neuronal-Cell Adhesion Molecules*) se acumulan rápidamente en los sitios de formación de contactos durante la fase inicial de organización de elementos sinápticos. En *Drosophila*, la concentración de FASCICLINA 2, molécula homóloga a N-CAM, regula la capacidad de las neuronas de formar nuevos contactos sinápticos (Giachello *et al.*, 2012).

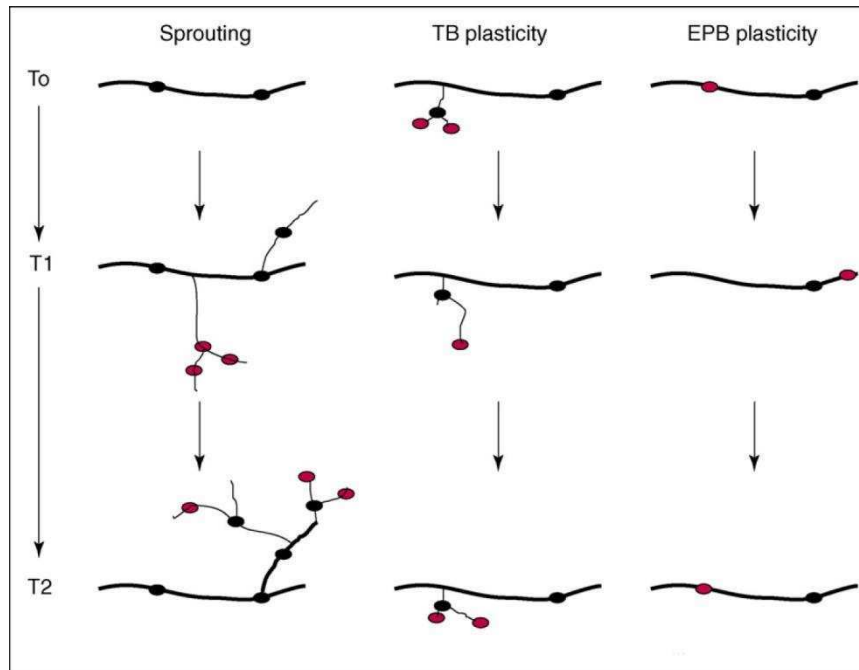
La siguiente etapa está caracterizada por intenso y balanceado crecimiento y retracción de ramas laterales durante periodos muy definidos acompañados de la formación y eliminación de sinapsis y final estabilización de las mismas (Portera-Cailliau *et al.*, 2005). El advenimiento de la microscopía basada en 2-fotones y el mejoramiento del marcado fluorescente de moléculas por medio de

herramientas genéticas permitieron seguir los procesos de crecimiento de ramas axonales y formación de sinapsis *in vivo*. De esta manera se realizaron experimentos en pez cebra, renacuajos y mamíferos que sugieren fuertemente que, una vez en la zona destino, el crecimiento del árbol axonal es guiado por los procesos de sinaptogénesis (Meyer & Smith, 2006; Portera-Cailliau *et al.*, 2005; Ruthazer *et al.*, 2006). En ese sentido, si bien la formación de una rama axonal puede darse sin actividad sináptica en última instancia la estabilización de dicha rama requiere de la estabilización de las sinapsis (Ruthazer *et al.*, 2006). Más aun, la plasticidad estructural en general se ve influida por la actividad eléctrica. De hecho, la “visión de la plasticidad centrada en la neurona” postula que la plasticidad estructural está implicada en contrabalancear cambios en los niveles generales de actividad neuronal (Butz *et al.*, 2009).

## 2.2 Remodelamiento axonal durante la adultez

Diversos estímulos pueden desencadenar que circuitos neuronales establecidos durante el desarrollo sufran nuevos cambios estructurales en el periodo adulto. Originalmente se consideraba a los axones como una estructura menos plástica y que sólo frente a lesiones físicas pueden invocarse cambios morfológicos. Gracias a los sofisticados métodos de monitoreo *in vivo*, hoy en día se sabe que los axones conllevan cambios estructurales y funcionales durante la neurogénesis adulta, experiencia sensorial, aprendizaje y memoria (Gogolla *et al.*, 2007), en respuesta a regulación homeostática luego de privación de sueño (Appelbaum *et al.*, 2010) o incluso como parte de un mecanismo endógeno circadiano (Appelbaum *et al.*, 2010; Becquet *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008).

La plasticidad estructural de los axones puede ocurrir a diferentes escalas, desde la aparición de ramas laterales (en inglés, *sprouting*) que significaría cambios en el área de acción del orden de los 10 a 100 micrones hasta cambios más locales por medio de aparición y desaparición de botones presinápticos (en inglés, *en-passant boutons* o EPBs) en ramas preexistentes o remodelado de botones terminales (en inglés, *terminal boutons* o TBs) basado en ramas laterales de corto alcance (Figura 19). De estos tres mecanismos no se han reportado aparición de ramas laterales en circuitos adultos. Sin embargo, los mecanismos más locales, EPBs y TBs, son comunes y permitirían a los axones explorar nuevas blancos postsinápticos y de esta forma, modificar localmente la conectividad de los circuitos frente a determinados estímulos (Gogolla *et al.*, 2007).



**Figura 19. Rango de acción de los distintos tipos de plasticidad estructural axonal.** La aparición de ramas laterales (*sprouting*) media acción sobre zonas postsinápticas que se encuentran entre 10 y 100 micrones alejadas de la rama axonal original. La plasticidad de TBs tiene un rango de acción del orden de varias decenas de micrones aunque podría no llevar a la formación de un nuevo circuito estable. La plasticidad de las EPBs está confinada al territorio cubierto por ramas axonales pre-existentes. Botones estables están denotados en negro y los botones dinámicos en rojo. Los procesos axonales pueden ser estables (línea gruesa) o dinámicos (línea fina). El esquema indica el estado del segmento axonal en 3 puntos temporales sucesivos (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) separados por alrededor de 10-15 días. **Modificado de Gogolla *et al.*, 2007.**

En general, la plasticidad a nivel de los TBs abarca zonas más grandes y suelen ser más dinámicos que los EPBs (De Paola *et al.*, 2006; Stettler *et al.*, 2006). Más allá de estas diferencias, en ambos casos hay subpoblaciones de botones más estables que persisten por meses y otros más dinámicos con vida media del orden de días.

En cuanto a los mecanismos moleculares que subyacen la plasticidad axonal durante la adultez, no hay muchos estudios que los analicen experimentalmente aunque es esperable que al menos algunos mecanismos sean similares a los que se reclutan durante el desarrollo. Futuros estudios utilizando modelos de invertebrados con sistemas nerviosos más sencillos podrán aportar importante información al respecto.

## 2.3 Cambios estructurales circadianos

Una de las formas de plasticidad neuronal que ocurren durante la adultez es la que implica cambios diarios en la morfología y funcionalidad de neuronas gobernados por un reloj endógeno. Además de la plasticidad estructural circadiana de las terminales axonales de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* existen en *Drosophila* diversos grupos neuronales que presentan cambios estructurales circadianos (Frenkel & Ceriani, 2011) (Tabla I1).

Estructura	Genotipo	LO	OO	LL
Axones L1 y L2	<i>salvaje</i>	+	+	N.D.
	<i>tim<sup>01</sup></i>	-	-	N.D.
	<i>per<sup>01</sup></i>	-	-	N.D.
	<i>cry<sup>b</sup></i>	N.D.	N.D.	N.D.
Dendritas L2	<i>salvaje</i>	+	+	-
	<i>tim<sup>01</sup></i>	N.D.	N.D.	N.D.
	<i>per<sup>01</sup></i>	-	-	-
	<i>cry<sup>b</sup></i>	+	+	-
Volumen de la lámina	<i>salvaje</i>	+	+	+
	<i>tim<sup>01</sup></i>	+	-	-
	<i>per<sup>01</sup></i>	+	-	-
	<i>cry<sup>b</sup></i>	N.D.	N.D.	N.D.
MN5	<i>salvaje</i>	+	+	N.D.
	<i>tim<sup>01</sup></i>	-	-	N.D.
	<i>per<sup>01</sup></i>	-	-	N.D.
	<i>cry<sup>b</sup></i>	N.D.	N.D.	N.D.
<i>s-LN<sub>v</sub>s</i>	<i>salvaje</i>	+	+	N.D.
	<i>tim<sup>01</sup></i>	-	N.D.	N.D.
	<i>per<sup>01</sup></i>	-	N.D.	N.D.
	<i>cry<sup>b</sup></i>	N.D.	N.D.	N.D.

**Tabla I1. Resumen de las estructuras neuronales que presentan plasticidad estructural circadiana en individuos adultos de *Drosophila*.** L1 y L2 son interneuronas de la lámina, primer neuropilo óptico. MN5, motoneuronas que inervan 2 músculos longitudinales indirectos del vuelo y *s-LN<sub>v</sub>s*, las neuronas pequeñas laterales ventrales que expresan el neuropéptido PDF. + indica presencia de plasticidad estructural circadiana; - indica ausencia del fenómeno; LL, luz constante y N.D., no determinado. **Modificado de Frenkel & Ceriani, 2011.**

El sistema visual de *Drosophila* está ajustado finamente por el reloj endógeno, presentando cambios estructurales y funcionales circadianos en varios niveles de la transmisión y procesamiento de la información visual. Así, existen cambios circadianos en la retina, en la amplitud de los electroretinogramas (Chen *et al.*, 1992), en el volumen de las terminales de fotorreceptores (Barth *et*

*al.*, 2010), en la estructura axonal (Pyza & Meinertzhagen, 1999) y dendrítica (Weber *et al.*, 2009) de interneuronas de la lámina y en el número de sinapsis en la lámina (Gorska-Andrzejak *et al.*, 2013).

Los axones de las interneuronas polares L1 y L2 de la lámina de la mosca se hinchan y encogen rítmicamente en presencia (ciclos de Luz-Oscuridad) y ausencia de claves ambientales (Oscuridad constante). Los axones aumentan de tamaño al comienzo del día y de la noche y se encogen en los intervalos intermedios, correlacionando con el patrón crepuscular de actividad locomotora. Además de estos cambios axonales, las terminales dendríticas de las L2 son más grandes durante el principio del día (ZT1) y sus espinas dendríticas son más largas y finas mientras que durante la noche las terminales son más pequeñas y las espinas, más cortas y engrosadas. Estos cambios morfológicos están controlados por el reloj circadiano endógeno puesto que persisten en oscuridad constante pero no así en luz constante<sup>6</sup> y están afectados en mutantes canónicos del reloj. De hecho, la presencia de plasticidad dendrítica en mutantes *cry<sup>b</sup>*<sup>7</sup> que tienen oscilador periférico disfuncional pero oscilador central intacto, sugiere que estos cambios postsinápticos están directamente controlados por el reloj central (Weber *et al.*, 2009).

Recientemente se ha reportado que cambios estructurales presinápticos a nivel de la lámina están controlados por el reloj circadiano pero también dependen de los mecanismos de fototransducción. A diferencia de la plasticidad dendrítica de las neuronas L1 que dependen del oscilador central, estos cambios presinápticos en la lámina están gobernados por el oscilador periférico residente en los fotorreceptores (Barth *et al.*, 2010).

Por otra parte, las terminales axonales de motoneuronas que inervan músculos del vuelo muestran cambios circadianos en el tamaño de los botones sinápticos, presentando un máximo de tamaño durante el principio del día (ZT3) y un mínimo durante el principio de la noche (ZT14). Dicho ritmo persiste en ausencia de claves ambientales y desaparece en mutantes del reloj circadiano (*per<sup>01</sup>* y *tim<sup>01</sup>*), demostrando que la plasticidad en cuestión es realmente un fenómeno regulado por un reloj endógeno (Mehnert *et al.*, 2007). Llamativamente, los cambios circadianos en el tamaño de los botones sinápticos siguen ocurriendo en animales decapitados, implicando que no precisa del oscilador central presente en el cerebro y no depende de actividad locomotora<sup>8</sup>, por lo cual este

---

<sup>6</sup> La luz constante afecta la ritmicidad comportamental y en esas condiciones PER está ausente en los fotorreceptores de la retina y en las neuronas LNs.

<sup>7</sup> CRY es una molécula esencial del reloj molecular en osciladores periféricos pero no así en el oscilador central.

<sup>8</sup> Una posibilidad es que los cambios en el tamaño de los botones sinápticos fuera una directa consecuencia de los aumentos y caídas diarias en la actividad sináptica de motoneuronas debido al patrón crepuscular de la actividad locomotora de las

ritmo está gobernado por un oscilador periférico probablemente localizado en el tórax o abdomen (Mehner & Cantera, 2008).

Un caso muy interesante de plasticidad estructural circadiana es el de las neuronas hipocretinas de la larva del pez cebra. El número de sinapsis (determinado como el número de puntos positivos para el marcador SINAPTOFISINA) en los axones de las neuronas hipocretinas es mayor hacia el final día con respecto a la noche. Estos cambios diarios están controlados por el reloj circadiano pero también se ven afectados por privación del sueño demostrando tanto regulación circadiana como homeostática de la plasticidad. Los autores del trabajo proponen a NPTX2b, una proteína implicada en agrupamiento de receptores AMPA, como central en el mecanismo responsable de la plasticidad circadiana. La expresión circadiana en el hipotálamo de NPTX2b comandaría su secreción rítmica promoviendo a la mañana el agrupamiento de receptores AMPA en neuronas postsinápticas y, consecuentemente, llevar a la formación de nuevas sinapsis (Appelbaum *et al.*, 2010).

---

moscas. Sin embargo, animales decapitados no se mueven y aun así presentan cambios circadianos en el tamaño de los botones sinápticos.



## Objetivos e hipótesis de trabajo

El presente trabajo de tesis se centró en estudiar los mecanismos involucrados en el control de los ritmos circadianos en la mosca *Drosophila melanogaster*, analizando desde la generación de las oscilaciones circadianas en el marcapasos central hasta los procesos implicados en la transmisión de la información temporal desde dicho marcapasos al resto del organismo. En ese sentido, nos propusimos los siguientes objetivos generales:

- Estudiar el origen del oscilador circadiano de la mosca y, particularmente, la validez del modelo basado en la actividad de la membrana.
- Estudiar las vías de salida desde el oscilador central y cómo las distintas señales se coordinan para controlar el comportamiento locomotor rítmico.
- Analizar la relevancia funcional de la plasticidad estructural circadiana de las neuronas marcapaso de la mosca así como los mecanismos moleculares que la subyacen.

A partir del estudio minucioso de la literatura en el tema y teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio, nosotros hipotetizamos que:

- El origen del oscilador circadiano de la mosca se centra en las oscilaciones moleculares de genes canónicos del reloj y la actividad de la membrana constituye un modulador de las mismas.
- La plasticidad estructural circadiana determina cambios diarios en los contactos sinápticos de las neuronas marcapaso.
- La plasticidad estructural constituye una vía de salida del marcapasos central relevante para el control del comportamiento locomotor rítmico.

Los objetivos particulares de la tesis serán comentados en los resultados en los capítulos correspondientes.

# *Materiales y Métodos*

## 1. Líneas de *Drosophila* empleadas

### 1.1 Mantenimiento de stocks

Se utilizaron dos sistemas distintos para el criado y mantenimiento de las moscas. Los cruzamientos y el mantenimiento de los stocks se realizaron en viales de vidrio o plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de altura conteniendo medio de cultivo a base de polenta, sacarosa, agar, levadura, nipagín y ácido propiónico. Para el criado a mayor escala se utilizaron botellas de plástico de 250 ml (Genesee Scientific) con aproximadamente 50 ml del mismo medio de cultivo. En los experimentos en donde se utilizó la línea *pdf-GS* se evitó la presencia de ácido propiónico en el medio de cultivo puesto que no sabíamos el efecto que podría tener el cambio de pH sobre la acción de la droga inductora.

Los stocks y las botellas para la recolección de moscas fueron mantenidos en un cuarto a 18 °C. El laboratorio cuenta también con 8 incubadoras que permiten controlar las condiciones de luz, temperatura y humedad. Los cruzamientos fueron mantenidos en estas incubadoras a 25 °C y en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Para seleccionar individuos según sexo, presencia o ausencia de cromosomas balanceadores, color de ojos, etc., las moscas se observaron bajo la lupa sobre una plataforma porosa a través de la cual se filtra CO<sub>2</sub>, que en *Drosophila* tiene efecto anestésico. En los casos donde fue necesario seleccionar individuos en ausencia de claves ambientales (oscuridad constante) se utilizó luz roja que no es percibida por las moscas. Los cruzamientos normalmente consistieron en 3 hembras por cada 2 machos. En general se agregó una pequeña cantidad de levadura hidratada (5 gr) a cada vial para optimizar la ovipuesta.

### 1.2 Nomenclatura de *Drosophila*

*Drosophila* es un organismo diploide que cuenta con un par de cromosomas sexuales (el par 1 que es, XX en hembras y XY en machos) y 3 autosomas (el par 2, 3 y 4). El cromosoma Y suele presentar estructura heterocromática por lo que no expresa muchos genes. De los 3 autosomas, el cuarto es muy pequeño, contiene muy pocos genes y por eso muchas veces es ignorado.

En *Drosophila* el genotipo de cada mosca se escribe de una manera estandarizada. El detalle de cada cromosoma se separa con punto y comas “;” y de izquierda a derecha se nombra desde el par 1 al 4. Cromosomas homólogos se separan por una barra inclinada / y los cromosomas que corresponden a cada parental se colocan ordenados hacia la izquierda y la derecha de dicha barra. Si el genotipo de un cromosoma es el mismo para ambos parentales, se lo indica sólo una vez sin poner la barra. Por otra parte, si el genotipo para un cromosoma es salvaje se indica con un +. Si el genotipo de los pares de cromosomas “hacia los extremos” es salvaje no se indica en el genotipo para resumir. A continuación se presenta un ejemplo de genotipo extendido y resumido.

Cromosoma	X	II	III	IV	
					(genotipo extendido)
					(genotipo resumido)

A su vez, cuando se quiere indicar más de un gen o transgen en un mismo cromosoma se indica separando con una coma. En el ejemplo presentado a continuación las transgenes *pdf-GAL4* y *UAS-CD8GFP* se encuentran en el mismo cromosoma (II del mismo parental) mientras que el transgen *UAS-MMP1* se encuentra en el par homólogo (II pero del otro parental).

*pdf-GAL4,UAS-CD8GFP/UAS-MMP1*

Por último, los genes se escriben en minúscula e itálica (*gen*) mientras que las proteínas se indican en mayúscula y letra regular (PROTEÍNA).

### 1.3 Cromosomas balanceadores y generación de líneas

Una de las herramientas más útiles del repertorio disponible para el análisis mediante enfoques genéticos de *Drosophila* son los cromosomas balanceadores, ya que impiden la pérdida de mutaciones de interés por recombinación y facilitan la combinación de elementos transponibles. Están formados por múltiples inversiones, lo que determina que tengan una baja probabilidad de recombinación homóloga. Suelen contar además con mutaciones que les atribuyen marcadores fenotípicos dominantes facilitando el análisis de segregación en la progenie. Además, en general 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 letales en homocigosis. En el transcurso de esta tesis se utilizaron los cromosomas balanceadores CyO (II), TM3 (III), TM6b (III) y FM7 (X). Además, la línea DB (*double balancer*), que posee los balanceadores CyO y TM3 sobre un marcador denominado ES, que es una fusión entre el segundo y tercer cromosoma. Para la identificación de los cromosomas balanceadores en estadios larvales y de pupa se utilizaron cromosomas balanceadores con marcadores moleculares fluorescentes (GFP o YFP) que se analizaron en la lupa de fluorescencia.

Gracias a dichos cromosomas balanceadores es posible combinar fácilmente mutaciones que están en distintos cromosomas (generando líneas denominadas comúnmente “dobles homocigotas”). Por otra parte, también es posible combinar mutaciones que se encuentren en el mismo cromosoma (generando “líneas recombinantes”). En esta tesis, se generaron las líneas recombinantes y dobles homocigotas detalladas a continuación.

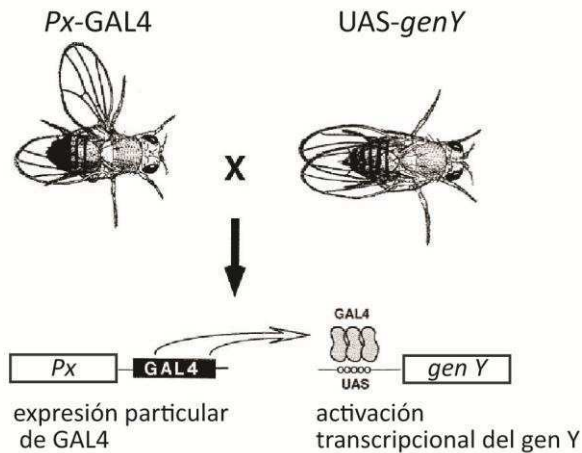
<b>Dobles homocigotas</b>	<b>Recombinantes</b>
<i>pdf</i> -LEXA>lexAop-CD4:: <i>GFP<sup>11</sup></i> ;UAS-CD4 <i>GFP<sup>1-10</sup></i>	UAS- <i>BRP-RFP</i> ,UAS- <i>kir2.1</i>
UAS- <i>MMP1<sup>ARNi</sup></i> ;UAS- <i>Dcr2</i>	<i>pdf</i> -LEXA>lexAop-CD4:: <i>GFP<sup>11</sup></i>
UAS- <i>MMP2<sup>ARNi</sup></i> ;UAS- <i>Dcr2</i>	UAS- <i>CD8GFP</i> ,UAS- <i>Dcr2</i>
UAS- <i>MMP1</i> ;UAS- <i>MMP1</i>	
UAS- <i>MMP2</i> ;UAS- <i>MMP2</i>	
UAS- <i>Fas2<sup>ARNi</sup></i> ;UAS- <i>Dcr2</i>	
UAS- <i>EcdR<sup>ARNi</sup></i> ;UAS- <i>Dcr2</i>	
UAS- <i>CD8GFP</i> ,UAS- <i>Dcr2</i> ;pdf-GS	
UAS- <i>ANF-GFP</i> ,UAS- <i>CD8RFP</i> ;pdf-GS	
UAS- <i>GFPn</i> ;UAS- <i>MMP1</i>	
UAS- <i>PDF</i> ;UAS- <i>MMP1</i>	

**Tabla MyM1.** Lista de líneas dobles homocigotas y recombinantes generadas en esta tesis.

#### 1.4 El sistema GAL4/UAS y el sistema GeneSwitch

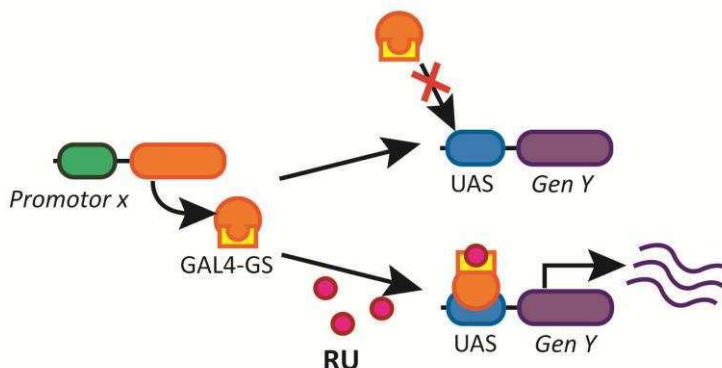
El sistema heterólogo proveniente de levadura UAS-GAL4 es una herramienta muy útil para dirigir la expresión de un gen de interés en un tejido determinado (Brand & Perrimon, 1993). La base de este sistema es la afinidad del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (*Upstream Activating*

Sequence). Una línea que expresa GAL4 bajo un promotor específico de tejido (Px), denominada línea inductora, se cruza por otra que expresa un gen Y bajo la secuencia UAS (línea UAS-genY); entre la progenie sólo en aquellos individuos que posean ambas construcciones se expresará el gen Y bajo el promotor Px (Figura MyM1). Otro sistema heterólogo que se utiliza en *Drosophila* es el de *lexA-lexAop*. Estos dos sistemas, UAS-GAL4 y *lexA-lexAop*, no se activan de forma cruzada por lo que se puede combinar ambos para inducir la expresión de genes en 2 patrones diferentes al mismo tiempo.



**Figura MyM1. Esquema del funcionamiento del sistema heterólogo UAS-GAL4.** Dos líneas transgénicas, una portando una construcción que alberga el promotor X controlando la expresión del factor de transcripción GAL4, y otra cuya construcción porta la secuencia UAS controlando el gen Y, se cruzan para obtener en la progenie moscas que expresen el gen Y en el patrón espacial y temporal del promotor X.

Además de la inducción tejida específica a veces es necesaria regular temporalmente la expresión de genes o transgenes. En *Drosophila* existen diversos sistemas inducibles de expresión basado en drogas inductoras o en moléculas represoras de la actividad de GAL4 inducibles por temperatura. En esta tesis, utilizamos el sistema GeneSwitch basado en la activación con drogas análogas a la progesterona (Osterwalder *et al.*, 2001). El sistema GeneSwitch (GS) es una fusión del dominio de reconocimiento al ADN de GAL4 al dominio de unión al ligando del receptor de progesterona humana. La unión de progesterona, o de análogos como el esteroide RU486 (*mifepristone*, Sigma, USA), activa el GAL4 permitiendo la activación de genes río abajo de la secuencia UAS (Figura MyM2).



**Figura MyM2. Esquema del funcionamiento del sistema inducible GeneSwitch.** En ausencia de inductor los animales que presentan ambos transgenes (Px-GAL4 y UAS-genY) no activan la transcripción de los genes río abajo de la secuencia UAS. En cambio, cuando se agrega el inductor RU al sistema el gen Y se expresa en el patrón espacial y temporal del promotor X.

1.5 Inducción del sistema de expresión en larvas, pupas y adultos

Para la inducción del sistema en larvas y adultos, se mezcló la droga RU486 (*mifepristone*, Sigma, USA) disuelta en etanol 80% en la comida hasta llegar a una concentración final de 200 µg/ml. En los experimentos de rescate con UAS-PDF del capítulo 4 se utilizó 500 µg/ml para aumentar el grado de inducción del sistema. En los controles sin inducción se reemplazó la droga por la misma cantidad de etanol (Vehículo).

Para asegurar la llegada de la droga durante la pupariación, se realizó una pequeña incisión anterior en el pupario y se sumergió la pupa por 2 minutos en 1 ml de solución de RU (4 µg/ml).

1.6 Stocks utilizados

<b>Líneas controles y Balanceadoras</b>		
Genotipo	Procedencia	Cromosoma
w1118	Bloomington Stock Center	
dB: $\gamma+$ ;CyO;TM3/ES	Generada en el laboratorio	
CyoGFP;TM6YFP/ES	Generada en el laboratorio	
<b>Líneas inductoras</b>		
<i>pdf</i> -GS	Generada en el laboratorio	III
<i>pdf</i> -GAL4	Bloomington Stock Center	II
<i>pdfR</i> -GAL4	Dra. Leslie Griffith (Brandeis Univ.)	II
OK107-GAL4	Dr. Josh Dubnau (CSHL)	IV
<b>Líneas UAS</b>		
UAS- <i>CD8GFP</i>	Bloomington Stock Center	II
UAS- <i>CD8RFP</i>	Bloomington Stock Center	II
UAS- <i>myrRFP</i>	Dr. Henry Chang (Purdue University)	III
UAS- <i>GFPn</i>	Dr. Ben-Zion Shilo (Weizmann Institute)	II
	Obtenida del Dr. Pablo Wappner	
UAS- <i>BRP-RFP</i>	Dr. Stephan Sigrist (Freie Universität Berlin).	III
	Obtenida de la Dra. Jimena Berni	
UAS- <i>Kir2.1</i>	Dr. Justin Blau (NYU)	III
UAS- <i>Dicer2</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)	II y III
UAS- <i>MMP1</i> <sup>ARNi</sup>	VDRC	II

UAS-MMP2 <sup>ARNi</sup>	VDRC	II
UAS-Fas2 <sup>ARNi</sup>	VDRC	II
UAS-EcdR <sup>ARNi</sup>	VDRC	II
UAS-MMP1	Dra. Andrea Page-McCaw (Vanderbilt Univ.)	II y III
UAS-MMP2	Dra. Andrea Page-McCaw (Vanderbilt Univ.)	II y III
UAS-pdf	Dr. Paul Taghert (Washington University)	II
UAS-ANF-GFP	Dr. David Deitcher (Cornell University)	X
UAS-CD4::spGFP <sup>1-10</sup>	Dra. Kristin Scott (Berkeley University)	III
<b>Líneas lexA</b>		
pdf-lexA	Dr. Michael Rosbash (Brandeis University)	II
lexAop- CD4::spGFP <sup>11</sup>	Dra. Kristin Scott (Berkeley University)	II

**Tabla MyM2. Líneas de moscas utilizadas en el transcurso de esta tesis.** Se detalla también la procedencia y el cromosoma en donde se encuentra la inserción del transgen. Cuando se indica más de un cromosoma es porque se utilizaron líneas con inserciones en uno y otro cromosoma.

Todas las líneas *enhancer-trap* usadas para el *screen* de GRASP provienen de la colección generada por el laboratorio de la Dra. Ulrike Heberlein (actualmente en Janelia Farm, USA).

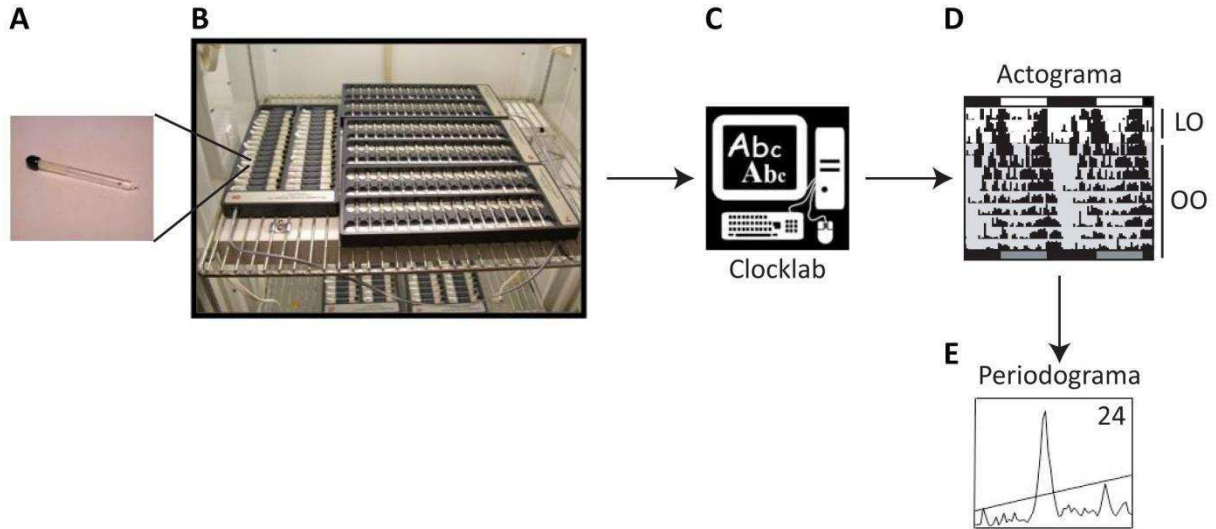
## 2. Análisis de la actividad locomotora

### 2.1 Análisis automatizado de la actividad locomotora

El monitoreo de la actividad locomotora se realizó colocando machos individuales en tubos de 0,5 cm de diámetro y ~6 cm de largo en uno de cuyos extremos hay comida. Se cuenta con monitores con capacidad para 32 tubos (Trikinetics, Waltham, MA) los cuales son atravesados por un haz de luz infrarroja imperceptible para las moscas. Cada vez que una mosca interrumpe el haz de luz se registra un dato. La actividad locomotora (número de veces que la mosca interrumpió el haz) se registró cada 30 minutos durante todo el experimento obteniéndose un registro diario de cada individuo a lo largo del experimento. Dicha información fue luego importada a un programa de análisis (Clocklab, Actimetrics, IL) en el cual se visualiza la actividad a lo largo de los días en forma de ‘actograma’ (gráficos de registro diario de la actividad locomotora individual). Los experimentos consistieron en



un entrenamiento de 3-4 días en incubadoras con condiciones controladas de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (fase de LO) a 25 °C, y luego se los dejó en condiciones de oscuridad constante por al menos 9 días más (fase de OO). (Figura MyM3).



**Figura MyM3. Esquema del proceso de adquisición de datos para los experimentos de actividad locomotora.** A. Tubos donde se cargan las moscas individuales. B. Monitores de actividad locomotora dentro de una incubadora que controla la temperatura y las condiciones de luz y oscuridad. C. Procesamiento de los datos con el software Clocklab. D. Obtención de los actogramas de actividad individual. En la vertical se representa la cantidad de actividad locomotora y en la horizontal el tiempo transcurrido. En cada fila se representa un día y el siguiente. Nótese que la información está duplicada. LO: ciclos de 12 hs de luz (barras claras) y 12 de oscuridad (barras oscuras). OO: oscuridad constante. Las barras grises en la fase de OO representan el día subjetivo. El fondo gris indica los días en OO. E. Periodograma obtenido por análisis de Chi cuadrado con el software Clocklab.

El periodo de actividad de cada mosca se analizó en la fase de OO utilizando el mismo programa de análisis realizando un Chi-cuadrado con una significancia de 0,05 (Sokolove & Bushell, 1978). Según el periodograma obtenido los individuos fueron clasificados como rítmicos, débilmente rítmicos o arrítmicos (Figura MyM4).

Se calculó el porcentaje de ritmicidad para cada genotipo en un determinado experimento como el número de moscas rítmicas según el análisis de periodograma sobre el total de moscas analizadas. Para el análisis de ritmicidad de cada genotipo se realizaron al menos 3 experimentos de actividad locomotora independientes. La determinación del periodo se realizó para cada mosca individual y se consideró el promedio por condición en cada experimento. La unidad experimental fue entonces, tanto para la variable “porcentaje de ritmicidad” como “periodo”, un experimento independiente.

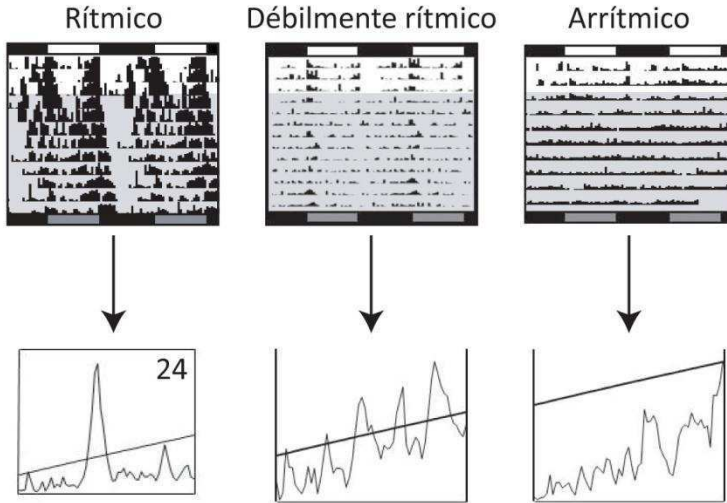


Figura MyM4. Actogramas (arriba) y periodogramas (abajo) representativos de moscas rítmicas, débilmente rítmicas y arrítmicas. En el caso de los rítmicos, los datos ajustan a una función con un único periodo dentro de un rango esperado (12 a 40 horas). En los débilmente rítmicos el periodo encontrado apenas pasa la línea de significancia o bien varios picos la atraviesan. Los arrítmicos corresponden a individuos donde el programa no identifica periodicidad alguna o lo hace en rangos fuera de lo esperado.

Para los experimentos con la línea *pdf-GS*, los grupos tratados presentaron RU486 en la comida a una concentración final de 200  $\mu\text{g/ml}$  dentro del tubo mientras que los controles sin inducir contenían cantidades equivalentes de etanol 80%.

## 2.2 Perfiles de actividad locomotora en luz-oscuridad y oscuridad constante

En los experimentos de reversión, la comparación de la fase de actividad locomotora entre condiciones de sincronización (LO) y la fase de recuperación de libre curso ( $\text{OO}_{9-18}$ ) se analizó por medio de la generación de gráficos de actividad promedio (AAP, *average activity plot*). Se usaron los datos de actividad crudos del sistema Trikinetics para generar los AAP. Se generó por separado un perfil de actividad promedio de la fase de LO y de  $\text{OO}_{9-18}$  para moscas controles *pdf-GS>kir2.1* (sin inducir) y *pdf-GS>kir2.1* tratadas transitoriamente (con inductor en la primer fase de  $\text{OO}_{1-8}$ ). Se testaron  $n$  individuos ( $n_1, n_2, \dots, n_n$ ) de cada genotipo. En primer lugar, para cada individuo y cada día (día  $D_1$  mosca  $n_1$ ) se normalizó la actividad registrada en cada intervalo de 30 minutos con la actividad total de ese día ( $A1/\Sigma A$ ); luego se promedió esa actividad normalizada en los  $n$  bichos analizados y por último se promediaron estos datos para los  $X$  días analizados en cada condición (3 para la fase de LO y 7 para la fase de  $\text{OO}_{9-18}$ ). La comparación de las fases de actividad se realizó cualitativamente superponiendo los perfiles de actividad de ambas fases para los mismos grupos experimentales.

### 3. Técnicas de biología molecular

#### 3.1 Análisis de presencia de elementos transponibles en líneas recombinantes

Para confirmar la presencia de elementos transponibles en algunas de las líneas recombinantes generadas en el transcurso de esta tesis se realizó la reacción de PCR sobre ADN genómico de individuos supuestamente recombinantes levantando específicamente alguno de los transgenes presentes en dicha línea. Para la línea recombinante *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* se analizó por PCR la presencia del transgen *lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* utilizando oligonucleótidos que amplifican la secuencia de *lexAop*. Para la línea recombinante *UAS-CD8GFP,UAS-Dcr2* se analizó por PCR la presencia del transgen *UAS-Dcr2* utilizando oligonucleótidos que amplificaran sólo el *Dicer2* proveniente del transgen y no el endógeno de la mosca (ver secuencias en 3.1.2).

##### 3.1.1 Extracción de ADN genómico de una cabeza

Para simplificar el análisis de la presencia de transgenes en líneas supuestamente recombinantes se extrajo ADN genómico de la cabeza de un solo individuo con un método rápido y sencillo que permite obtener ADN en cantidades suficientes para realizar una reacción de PCR estándar. Se procesó una cabeza de mosca en 10 µl de buffer de extracción (Tris 10 mM, NaCl 25 mM y EDTA 1mM) con una concentración final de 200 µg/ml de proteinasa K rompiendo el tejido con la punta de un tip de 20 µl. Se incubó 30 minutos a 37 °C. Se tomaron 2 µl de dicha muestra y se realizó una PCR a tiempo final en condiciones estándar (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de oligonucleótidos, buffer de PCR 1X de Invitrogen y Taq Polimerasa de Invitrogen en un volumen final de 20 µl).

##### 3.1.2 Oligonucleótidos utilizados.

Amplicón	Oligonucleótidos	TA (°C)	T. ext. (min)
Secuencia <i>lexAop</i>	<b>Forward:</b> 5' AGCGGATCCTAATCTTACCTCGACTGC 3' <b>Reverse:</b> 5' CAGCAAGCTTATCATCCCTCGACGTAC 3'	55	1
<i>Dicer2</i> del transgen	<b>Forward:</b> 5' CGTCTACGGAGCGACAAT 3' * <b>Reverse:</b> 5' GTCTATGATGACAACGCTCAGG 3'	55	2

**Tabla MyM3: Oligonucleótidos utilizados para detectar la presencia de transgenes en líneas supuestamente recombinantes.** \* Para el caso de *Dicer2* el oligonucleótido Forward hibrida con la secuencia UAS por lo que combinándolo con el oligonucleótido Reverse sólo se levanta la secuencia del transgen y no el *Dicer2* endógeno de la mosca. TA indica temperatura de *annealing* y T. ext., tiempo de extensión. Para la extensión de *Dicer2* se utilizó 40 ciclos de PCR para obtener una masa de amplicón detectable en un gel de agarosa.

### 3.2 Análisis de los niveles de expresión génica por qRT-PCR

#### 3.2.1 Extracción de ARN de cabeza de moscas

Para la preparación de ARNm se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se partió de 30 o 40 cabezas de moscas adultas, se utilizaron 200µl de TRIzol y se resuspendió el ARN purificado en 20 µl de H<sub>2</sub>O calidad ARN (Water –Molecular Laboratory Reagent - SIGMA). Para confirmar la calidad de la preparación se corrieron geles de agarosa analíticos (al 1%) de modo de observar las bandas características de los ARN ribosomales de *Drosophila*. La cuantificación de las muestras se realizó 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.

#### 3.2.2 Reacción de retrotranscripción

Partiendo de 1 µg de ARN total, de los cuales se eliminaron las trazas de ADN mediante la digestión con DNasa I (Invitrogen), se procedió 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.

#### 3.2.3 PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)

Las reacciones de PCR realizadas para evaluar la abundancia relativa de ARNm se llevaron a cabo en el equipo Mx3005P (Stratagene). Se utilizó el kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) de Roche. Las reacciones se realizaron en 25 µl finales, utilizando SYBRGreen como intercalante y ROX como fluoróforo de referencia. La puesta a punto de las reacciones se realizó de modo de obtener eficiencias de amplificación de  $100 \pm 10\%$ . Se generaron curvas de calibración con 5 puntos (diluciones seriadas de 1:4 desde la muestra tal cual hasta la dilución 1:256) para el gen *pdf* y el gen normalizador a partir de ADNc (ADN copia) de mezcla de todas las muestras controles. Se realizaron duplicados técnicos para todos los puntos de la curva de calibración y para cada muestra biológica a medir. A partir del valor Ct y las curvas de calibración se calculó el número de copias de ADNc para *pdf* y para el gen normalizador en cada muestra. Se analizó la relación “copias de *pdf*/copias de normalizador”. Los genes normalizadores utilizados fueron *tubulina* en el caso del experimento de

silenciamiento eléctrico (Figura 1.11), y *rpl49* para el experimento de desregulación de MMP1 (Figura 4.4).

### 3.2.4 Oligonucleótidos utilizados

<b>Amplicón</b>	<b>Oligonucleótidos</b>
<i>pdf</i>	<b>Forward:</b> 5' GCCACTCTCTGTCGCTATCC 3' <b>Reverse:</b> 5' CAGTGGTGGGTCGTCTAAT 3'
<i>tubulina</i>	<b>Forward:</b> 5'GCCTGAACATAGCGGTGAAC 3' <b>Reverse:</b> 5'ATCCCAACAACGTGAAGAC 3'
<i>rpl29</i>	<b>Forward:</b> 5' GAACAAGAAGGCCCATCGTA 3' <b>Reverse:</b> 5' AGTAACAGGCTTRGGCTTGC 3'

**Tabla MyM4: Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de qRT-PCR.** En todas las reacciones se utilizó una temperatura de *annealing* de 60 °C.

## 4. Inmunohistoquímica y análisis de imágenes

### 4.1 Inmunohistoquímicas en cerebros de moscas adultas

Se decapitaron bajo lupa machos adultos (salvo para el *screen* de GRASP que se usaron hembras) con pinzas de disección y se colocaron las cabezas en solución de fijación (paraformaldehído 4% en solución de PB 0,1 M) durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Luego de la fijación se enjuagaron las cabezas en PT (PBS 0,1 % Tritón X-100) y se disectaron los cerebros en PT con pinzas nº 5 (Dumont) bajo una lupa Leica CLS 100X. Se lavaron los restos de fijador con PT 4 veces durante un periodo de 30 minutos. Luego, se bloquearon los cerebros entre 30 y 45 minutos con suero de cabra 7% en PT y se incubó a 4 °C con el anticuerpo primario hasta la mañana siguiente. Al otro día se removió el primario, se lavó con agitación 4 veces con PT por un periodo de 2 horas y se incubaron los cerebros con el anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación. A partir del momento en que los cerebros estuvieron en contacto con el anticuerpo secundario los tubos fueron tapados con aluminio ya que el fluoróforo es fotosensible. Los lavados del secundario se hicieron de la misma manera que con el primario. Los cerebros fueron mantenidos en eppendorfs de 2 ml en una solución de glicerol 80% en PT hasta el momento de su visualización en el microscopio, cuando fueron montados en portaobjetos (Fisher) en 10 µl de la misma solución y se cubrieron con

cubreobjetos (Marienfeld GmbH). Los cubreobjetos se sellaron con esmalte de uñas para evitar la desecación de los cerebros.

Para los experimentos de calibración del sistema GeneSwitch (Figura 1.1) y del *screen* por GRASP (Capítulo 2) se utilizó una solución de PT 0,6% (PBS 0,6 % Tritón X-100) en todos los pasos de la inmunohistoquímica.

Los detalles de los momentos circadianos o días de LO o OO en los que fueron sacrificados los animales en cada experimento están indicados en la sección de resultados.

#### 4.2 Anticuerpos utilizados

##### Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-GFP	Conejo	1:500	Invitrogen, USA.
Anti-GFP	Conejo	1:800	Abcam, USA.
Anti-GFP	Pollo	1:500	Upstate, USA.
Anti-GFP	Ratón (IgG1)	1:10	Sigma, USA.
Anti-RFP	Conejo	1:500	Rockland, USA.
Anti-PDF	Conejo	1:1500	Molecular Probes, FRANCIA.
Anti-PDF	Rata	1:500	Generado en el laboratorio.
Anti-PDF	Ratón (IgG2b)	1:20	DSHB, USA.
Anti-PAP	Conejillo de indias	1:500	Donación del Dr. Paul Taghert (Washington Univ.).
Anti-PER	Conejo	1:500	Donación del Dr. Ralf Stanewsky (Queen's College, UK).
Anti-PER	Conejo	1:500	Alpha Diagnosis.

**Tabla MyM5: Anticuerpos primarios utilizados.** “Especie” se refiere a la especie animal en la que fue generado en anticuerpo. Todos los anticuerpos son policlonales a excepción del anti-GFP y anti-PDF de ratón.

##### Anticuerpos secundarios

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

Contra conejo: Cy2, Cy3, Cy5.

Contra ratón: Cy3, Cy2 específico de IgG1, Cy5.

Contra pollo: Cy2.

Contra rata: Cy3, Cy5 y Alexa647.

Contra conejito de Nueva Guinea: Cy3.

#### 4.3 Microscopía y procesamiento de imágenes

Todas las imágenes fueron adquiridas con microscopios confocales Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, NJ) y, en particular, se usaron los microscopios Pascal y Meta 510. Las fotos de cerebros enteros se tomaron con un aumento de 10 X y entre 1,2 y 1,8 de zoom digital, y las de proyecciones dorsales con un aumento de 40X y 2 de zoom digital. Se realizaron secciones de confocal en el eje Z para registrar la señal de inmunofluorescencia de todo el cerebro o sólo de las proyecciones dorsales del circuito PDF. Luego, se realizaron proyecciones en Z para obtener una imagen bidimensional que luego se exportó como JPEG desde el software del microscopio. Para los experimentos en donde se compararon niveles de inmunoreactividad se tomaron todas las fotos en las mismas condiciones de excitación del láser, y ganancia y *offset* del detector. Solo se cambiaron dichas condiciones entre experimentos independientes y en los casos en los que fue necesario para poder obtener una buena señal detectable y que a la vez no saturara. En esos casos se realizaron luego normalizaciones de la señal (respecto al promedio de señal para todas las muestras de ese experimento) para poder comparar entre experimentos independientes.

Las cuantificaciones de intensidad se realizaron utilizando el programa Image J (bajado de <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para el armado de figuras con múltiples paneles se utilizaron los programas Adobe Illustrator o Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, línea CS). 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.

#### 4.4 Curvas de tiempo y análisis de los niveles de PER

Para el análisis de curvas temporales se sincronizaron moscas durante 3 días en LO y luego se mantuvieron en ausencia de claves ambientales por 4, 9 o 13 días más según el experimento (OO4, OO9 y OO13). Se disectaron cerebros de moscas a 4 tiempos circadianos (CT5, 11, 17 y 23) de los distintos genotipos analizados. Las reacciones de inmunohistoquímica fueron realizadas como se describió en la sección anterior.

Para cuantificar la intensidad de PER en el núcleo y citoplasma de los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* se adquirieron imágenes confocales de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, seleccionando el plano donde el tamaño nuclear es máximo. La cuantificación se realizó a ciegas, es decir sin conocer el tratamiento de la muestra analizada, a partir de un solo plano utilizando el software Image J. Para cada una de las neuronas individualizables de cada cerebro se determinó manualmente el perímetro alrededor del núcleo y del citoplasma utilizando la señal del neuropéptido PDF como marcador de citoplasma y se midió la intensidad promedio de la señal de PER (píxeles/área) en cada compartimento. Se sustrajo la señal ruido (*background*) realizando un círculo de dimensiones similares al soma de las neuronas pero ubicado fuera de las células. Los valores de las distintas neuronas de un mismo cerebro se promediaron y luego se promedió las medias de los distintos cerebros de un mismo experimento para una dada condición Genotipo/CT. En ese sentido, cada experimento representó un N=1 y su valor de intensidad de PER estuvo ponderado por la media de alrededor de 10 cerebros, y cada cerebro representa la media de al menos 2 neuronas *s-LN<sub>v</sub>s*. Se analizaron por separado las diferencias a lo largo del día entre la señal de PER en el núcleo y en el citoplasma.

#### 4.5 Análisis de niveles de PDF en la proyección dorsal y en los somas

Los niveles de PDF en las terminales dorsales fueron analizados en distintos genotipos y en al menos dos momentos del día (CT2 y CT14 con excepción de los experimentos de la Figura 2.2 donde también se analizó a CT22). Para su análisis se realizó inmunohistoquímica anti-PDF y anti-GFP como se indicó previamente en animales que sobreexpresaban *CD8GFP* (marcador de membrana plasmática) en su circuito PDF. Se tomaron secciones en el confocal de un hemisferio cerebral enfocadas en las terminales dorsales utilizando las mismas condiciones de excitación y ganancia del láser como se describió en la sección 4.3 de materiales y métodos. Utilizando el programa Image J se realizó una proyección en Z utilizando la intensidad máxima. Se delimitó 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 CD8GFP. Este proceso se realizó pasando la señal de GFP a 8-bits, ajustando dicha señal a un umbral determinado y luego generando una selección con dicho umbral. Dicha selección se aplicó sobre la señal de PDF y se midió la intensidad media del neuropéptido. Para sustraer el ruido (*background*) se restó la intensidad media medida en un rectángulo ubicado fuera del circuito PDF y con un área igual o mayor que la de la señal del circuito analizada. Se promedió la señal de PDF entre cerebros de un mismo tratamiento dentro de un experimento y se consideró cada experimento independiente como un N=1.

La medición de los niveles de PDF en el soma de las *s-LN<sub>v</sub>s* se realizó también sobre proyecciones bidimensionales de las secciones sacadas en el confocal pero esta vez centradas en la médula accesoria (donde se encuentran los somas de las neuronas PDF). En el programa Image J se delimitó el soma de cada neurona utilizando la señal de membrana de *CD8GFP*. En cada soma se midió la intensidad media de la señal del neuropéptido y se sustrajo la intensidad media de un círculo de dimensiones similares pero ubicado fuera de la célula (donde no hay señal de PDF específica). Al igual que con el análisis de la señal de PER, se promedió la señal de distintos somas de un mismo cerebro y luego se promedió los distintos cerebros de una misma condición en un mismo experimento independiente.

#### 4.6 Análisis de niveles de ANF-GFP en la terminal dorsal

El análisis de los niveles de ANF-GFP expresados en el circuito PDF se realizó de manera idéntica al de los niveles de PDF en las terminales, con la diferencia que se utilizó CD8RFP como marcador de membrana para delimitar el área de interés.

#### 4.7 Análisis de complejidad del circuito PDF: cruces totales y largo de la terminal

Para cuantificar la complejidad del árbol axonal de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* en el protocerebro dorsal se utilizó el método de Sholl modificado (Fernandez *et al.*, 2008). Se realizó inmunohistoquímica contra GFP de moscas que expresaban CD8GFP en el circuito PDF, se tomaron secciones de confocal de las terminales axonales dorsales y se realizó la proyección en Z como se detalló previamente. En estas imágenes bidimensionales de las terminales se superpuso un arreglo de 6 anillos concéntricos

separados por 10  $\mu\text{m}$  entre sí tomando como centro de los anillos el punto de primera ramificación dorsal que se abre hacia el asta lateral (Figura 1.6 de la introducción). Se contaron a ciegas (sin conocer el tratamiento del cerebro analizado) los entrecruzamientos entre la terminal axonal y cada anillo concéntrico y se sumó todos los entrecruzamientos para obtener el número de cruces totales. En la mayoría de los experimentos se consideró solamente los cruces totales aunque para los experimentos de sobreexpresión de MMPs también se analizó las diferencias para cada anillo (Figura 3.4) considerando un diseño experimental de medidas repetidas en el espacio (ver sección 5 de análisis estadístico).

El largo de la terminal se midió en las mismas proyecciones bidimensionales con el software del microscopio de fluorescencia confocal (Zeiss LSM Image Browser). Con la herramienta regla del programa se midió el largo de la terminal desde el punto de primera arborización y siguiendo las proyecciones axonales en el sentido medio hacia el lateral (Figura 2.1 C).

Para todas las mediciones estructurales se analizó un único hemisferio por cada cerebro y luego se consideró el promedio de cerebros de una condición dada para cada experimento independiente. El número de cruces totales varió entre experimentos por lo que para el análisis estadístico se consideró un diseño de bloques al azar (ver sección 5 de análisis estadístico).

#### 4.8 Cuantificación de partículas BRP<sup>+</sup>

Para estimar el número de zonas activas de transmisión neuroquímica se cuantificó el número de partículas BRP<sup>+</sup> en la terminal dorsal de moscas que expresaban BRP-RFP y CD8GFP específicamente en el circuito PDF. Se estudiaron las diferencias entre genotipos y entre dos momentos del día (CT2 y CT14). Se realizó inmunohistoquímica anti-RFP y anti-GFP como se describió anteriormente y se obtuvieron secciones de confocal de las proyecciones axonales de las *s-LN<sub>s</sub>*. Se realizaron proyecciones 2-D utilizando el programa Image J y, con el mismo programa, se delimitó el área que contiene el circuito PDF como se indicó en la sección anterior. A partir de la selección se eliminó la señal ruido (*background*) de la imagen con el objetivo de minimizar la sobrestimación de partículas positivas. Se aplicó un filtro de alisado para definir más claramente las partículas positivas, se aplicó una máscara que define las partículas positivas y se utilizó la herramienta “Analyse Particules” para contar el número de partículas y evaluar sus dimensiones. Se consideró como partículas BRP<sup>+</sup> a toda aquella señal con un diámetro mayor a 0,1 $\mu\text{m}$ . Se promedió el número de partículas BRP<sup>+</sup> entre

cerebros de un mismo tratamiento dentro de un experimento y se consideró cada experimento independiente como un N=1.

#### 4.9 Análisis de señal de reconstitución de GFP (técnica de GRASP)

El *screen* de GRASP se realizó con un subgrupo de líneas *enhancer trap* de la colección generada en el laboratorio de la Dra. Ulrike Heberlein (actualmente en Janelia Farm, USA) y a tres momentos del día (ZT2, ZT14 y ZT22). La colección está depurada para líneas de expresión neuronal y presentan un elemento transponible con la secuencia GAL4 inserto al azar en el genoma de la mosca. Los criterios de elección de las líneas con las que se realizó el *screen* están explicados en la sección de resultados correspondiente. Para poder realizar el *screen* más eficientemente se generó la línea doble homocigota *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* de las cuales se obtuvo hembras vírgenes, se cruzó en cada oportunidad con machos de la línea GAL4 a estudiar y se analizaron hembras de la progenie<sup>9</sup>. La presencia de todos los transgenes en la línea doble homocigota se testeó por medio de PCR sobre ADN genómico (Tabla MyM3) y por inmunohistoquímica contra GFP utilizando el anticuerpo anti-GFP hecho en conejo de Invitrogen que reconoce la porción de GFP<sup>11</sup>.

La señal positiva del *screen* por GRASP se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-GFP mouse IgG1 (Sigma, USA) en una dilución 1:10 y luego el secundario Cy2 mouse IgG1 de Jackson 1:250. Todas las incubaciones se realizaron con PT 0,6% para aumentar la permeabilidad de los anticuerpos. A la par se realizó inmunohistoquímica contra el neuropéptido PDF (anti-PDF de conejo 1:1500 y secundario Cy3 contra conejo) para poder contar con una buena marca que indicara cuáles eran las proyecciones dorsales de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s*. Dada la baja señal de reconstitución las muestras fueron montadas y visualizadas en el microscopio lo más cercano posible al día de finalización de la inmunohistoquímica (nunca más de 10 días después de finalizada la inmunohistoquímica ni más de 5 días luego de haber sido montadas en portaobjetos). Se analizaron al menos 15 cerebros de cada genotipo y momento del día. Se consideró señal positiva en un momento del día si más de la mitad de los cerebros analizados presentaban señal de reconstitución. Para las líneas en las que se obtuvo señal de reconstitución en alguno de los ZT analizados se realizaron los controles negativos parentales que no deberían mostrar señal de reconstitución (*pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* y *X-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*). Se utilizó como control positivo del *screen* los contactos esperables entre el circuito PDF y el circuito que expresa su receptor (PDFR).

---

<sup>9</sup> Algunas líneas GAL4 presentan la inserción en el cromosoma X por lo que al analizar hembras de la progenie nos aseguramos que en todos los casos se encuentren todos los transgenes presentes.

## 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos de esta tesis se realizó con el programa Infostat versión 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Para todos los experimentos los individuos estudiados fueron seleccionados al azar de una población mayor (vial con la progenie del cruzamiento). La adjudicación de los tratamientos fue aleatorio en los casos que resultó posible (el genotipo es un tratamiento que no puede ser adjudicado al azar, pero la determinación de cuales animales fueron disectados a cada CT o fueron inducidos con RU fue aleatorio). En cada cruzamiento las moscas provinieron de los mismos parentales y estuvieron en las mismas condiciones de cría por lo que no se consideraron completamente independientes. Por eso mismo, en todos los experimentos las mediciones en moscas de un mismo cruzamiento se consideraron pseudoréplicas y se utilizaron para estimar mejor la variable a analizar. En ese sentido, la unidad experimental fue en todos los casos la totalidad de la progenie de cada cruzamiento. En los experimentos de actividad locomotora se analizaron más moscas por condición y experimento por lo que en varios casos la muestra analizada provino de más de un cruzamiento. En todos los experimentos se descartaron valores *outliers* que se desviaban más de 2 veces de la media.

El diseño experimental en todos los experimentos fue completamente aleatorizado (DCA) con excepción del análisis de plasticidad estructural en donde se realizó un diseño de bloques (DBA) para controlar la variabilidad entre experimentos. En el DBA cada experimento independiente (cruzamiento) correspondió a un bloque y dentro del bloque se analizaron todos los tratamientos de interés.

El análisis estadístico aplicado en la mayoría de los experimentos fue el de ANOVA de un factor y ANOVA Factorial. Los supuestos del ANOVA de homogeneidad de varianza y normalidad se probaron por medio de la prueba de Levene y Shapiro-Wilks modificado. En algunos casos fue necesario aplicar transformaciones a las variables para cumplir los supuestos (detallado en la leyenda de figura). Cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para alguno de los factores o interacciones se realizaron *a posteriori* comparaciones por Tukey, Bonferroni o Duncan según lo especificado en la leyenda de cada figura.

El diseño de medidas repetidas en el espacio se aplicó cuando se analizó las diferencias entre genotipos de acuerdo a los entrecruzamientos para cada anillo (Figura 3.4). Si bien se contaron los entrecruzamientos para los 6 anillos, se eligió analizar estadísticamente solo los anillos 1, 3 y 6 para

simplificar el análisis. Dentro de cada experimento los cruces de un determinado genotipo a lo largo de los distintos anillos constituye una medida repetida en el espacio (se analiza la misma variable “número de cruces” en los mismos individuos pero separadas por distancia en el espacio). Se consideraron los factores entre individuos “momento del día” y “genotipo” y el factor dentro “anillo”. Se graficó por separado CT2 y CT14 para simplificar la figura pero el análisis estadístico incluyó las diferencias entre CT. El supuesto de normalidad se analizó con la prueba de Shapiro-Wilks modificado. Los supuestos adicionales de medidas repetidas en el espacio fueron probados con la prueba de Box (supuesto de homogeneidad de matrices de varianzas y covarianzas) y la prueba de esfericidad de Mauchly (usando el programa de análisis estadístico SPSS).

El número de experimentos independientes (N), el número mínimo de moscas analizadas (n) y los detalles del análisis estadístico realizado se detallan en las leyendas de cada figura.

# *Resultados*

## CAPÍTULO 1: Acoplamiento membrana-oscilador molecular

### Parte 1: La actividad eléctrica como modulador del paso de las oscilaciones moleculares

El objetivo de esta primer parte de la tesis fue analizar la validez del modelo basado en la actividad de la membrana como generador de las oscilaciones circadianas en la mosca. En particular nos preguntamos: ¿Cuál es el efecto del silenciamiento eléctrico del marcapasos central sobre las oscilaciones moleculares? ¿Este efecto varía según la duración del silenciamiento eléctrico?

#### 1.1 El silenciamiento eléctrico limitado a etapas adultas conduce a arritmicidad comportamental sin alterar el paso del reloj molecular

Como se comentó en la introducción, existe una controversia respecto a la naturaleza del oscilador circadiano de *Drosophila*. Diversos trabajos apoyan el modelo que propone a las oscilaciones de genes canónicos del reloj en el núcleo de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* (marcapaso central de *Drosophila*) como generador de las oscilaciones circadianas. Sin embargo, los trabajos de Nitabach y Holmes retomaron la idea de que la actividad en la membrana sería responsable de las oscilaciones circadianas puesto que el silenciamiento eléctrico crónico a partir del desarrollo de las neuronas PDF detiene el paso de las oscilaciones moleculares de la proteína PER (Nitabach *et al.*, 2002). Un aspecto de este último trabajo que nos llamó la atención es que los autores sacan conclusiones muy fuertes sobre el rol fisiológico de las conductancias iónicas de la membrana cuando en sus experimentos afectan groseramente una propiedad intrínseca de la neurona desde el inicio del desarrollo del circuito. De hecho, como se discutió en la introducción, la actividad eléctrica es esencial para el ensamblado de los circuitos neuronales (Butz *et al.*, 2009), por lo que es de esperar que en esa condición las neuronas PDF no hayan podido desarrollarse correctamente llevando posiblemente a mecanismos compensatorios, alteraciones irreversibles de toda la fisiología de la neurona (no sólo las propiedades de la membrana) o incluso a la muerte celular.

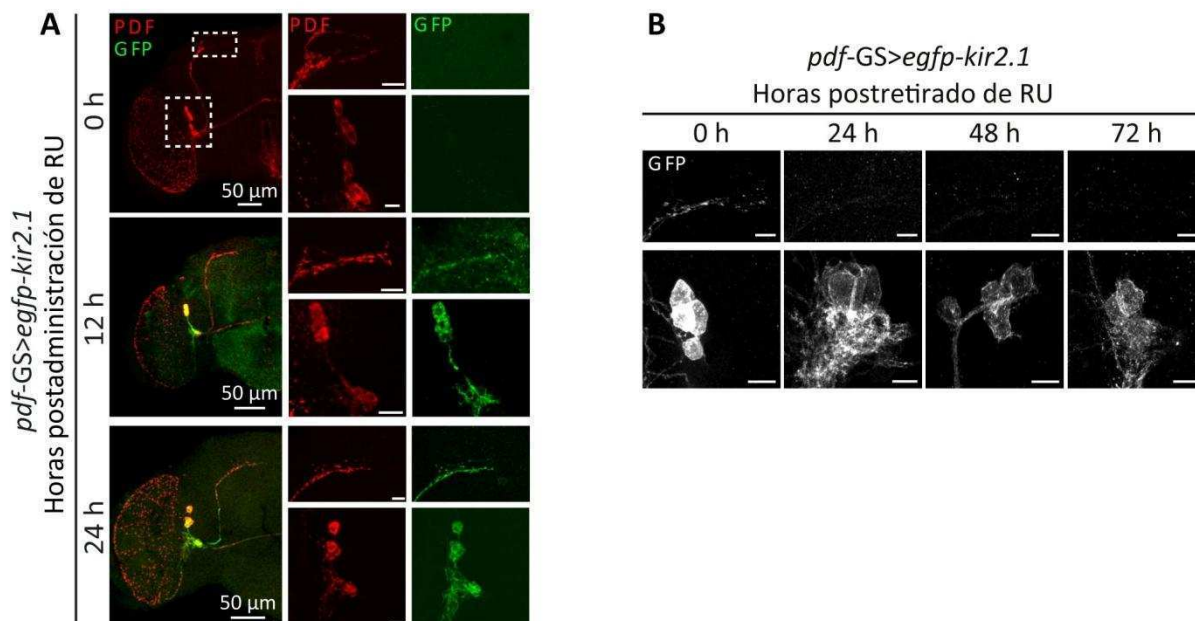
Con el fin de resolver esta controversia decidimos reanalizar la validez del modelo basado en la actividad de la membrana pero esta vez evitando afectar el correcto desarrollo de las neuronas PDF y controlando con mayor precisión el silenciamiento eléctrico. Para ello se utilizó una línea transgénica inducible basada en el sistema GeneSwitch generada por la Dra. Jimena Berni y el Licenciado Ezequiel Aranovich en el laboratorio. La línea *pdf*-GS presenta la región promotora del gen *pdf* río arriba del

GAL4 modificado (ver Materiales y Métodos) por lo que en presencia del inductor RU permite encender la expresión de genes de interés específicamente en las neuronas PDF. Al igual que en el trabajo de Nitabach y colaboradores, se expresó en las neuronas PDF el canal de potasio *kir2.1* que hiperpolariza la membrana llevando al silenciamiento eléctrico.

La versión empleada del canal KIR2.1 está fusionado a GFP, por lo que al cruzar esta línea con *pdf-GS*, administrar RU de forma sistémica (a través de la comida), se pudo analizar la cinética del encendido de la herramienta siguiendo la expresión de GFP dentro del circuito PDF. En ausencia de inductor, no se observó señal de GFP en las neuronas PDF. 12 horas de inducción del sistema fueron suficientes para detectar señal de GFP en los somas del 40% de los cerebros. A las 16 horas postinducción un 60% de los cerebros expresaron niveles detectables de EGFP-KIR y para las 24 horas postinducción todos los cerebros presentaron señal positiva apreciable tanto en el soma como en la proyección dorsal (Figura 1.1 A).

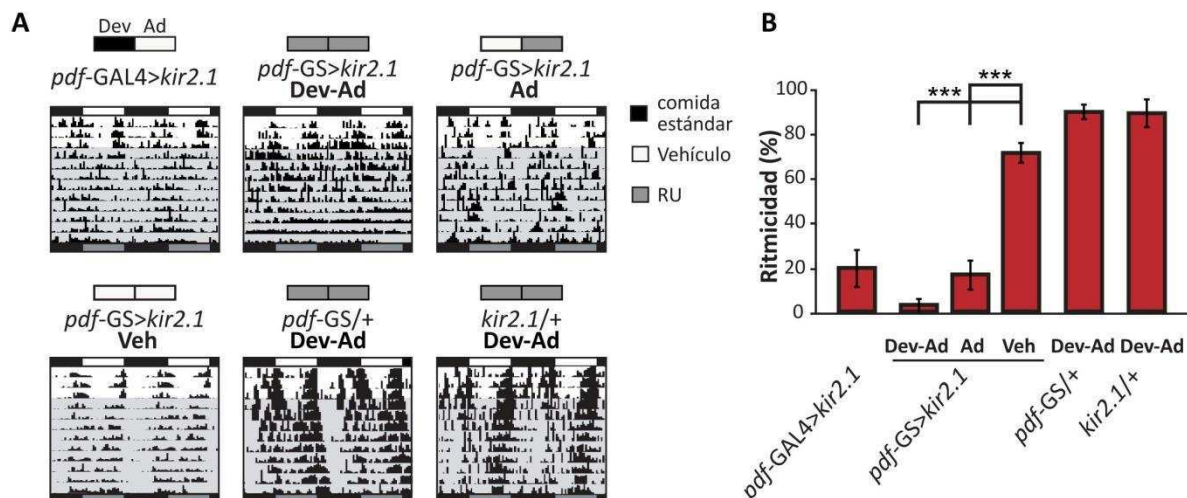
Por otra parte se analizó la cinética de apagado del sistema definiendo el tiempo requerido para dejar de ver señal de EGFP-KIR en las neuronas PDF. Moscas adultas fueron inducidas durante una semana por medio de la administración de RU, luego se retiró la droga y se analizó la señal de EGFP-KIR a distintos tiempos postretirado de la droga (24, 48 y 72 h). Una vez pasadas las 24 horas de retirado el inductor la mayoría de los cerebros no presentaban señal de GFP en las proyecciones dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s*, indicando que la tasa de recambio del canal en la membrana de las terminales fue rápida. Sin embargo, una baja señal en los somas de las *l-LN<sub>v</sub>s* siguió evidente a las 24, 48, 72 h (Figura 1.1 B) e incluso 144 h (dato no mostrado) luego de retirado el inductor. Esto puede deberse a una gran estabilidad de GFP que determinaría una vida media de la proteína fusionada de varios días, o tal vez a la retención del inductor RU dentro del organismo (quizás en una estructura conocida como el cuerpo graso).





**Figura 1.1. Calibración del sistema *pdf-GS*.** **A. Cinética de activación del sistema.** Imágenes de confocal representativas de cerebros *pdf-GS>egfp-kir2.1* disectados 0, 12 y 24 horas postinducción con RU (administrado en la comida). Los cerebros fueron teñidos contra GFP (verde) y contra PDF (rojo). Para cada tiempo se muestra un detalle de las proyecciones axonales dorsales (detalle superior) y los somas de las *LN<sub>v</sub>s* (detalle inferior). **B. Cinética de inactivación del sistema.** Imágenes de confocal representativas de cerebros *pdf-GS>egfp-kir2.1* disectados 0, 24, 48 o 72 horas postretirado del inductor. Como se ve en el panel superior, a las 24 h ya no se observó señal en las proyecciones dorsales, aunque se siguió viendo señal residual de EGFP-KIR en los somas de las *l-LN<sub>v</sub>s* incluso 72 horas luego de retirada la droga. La escala para los detalles de somas y proyecciones es de 10  $\mu$ m.

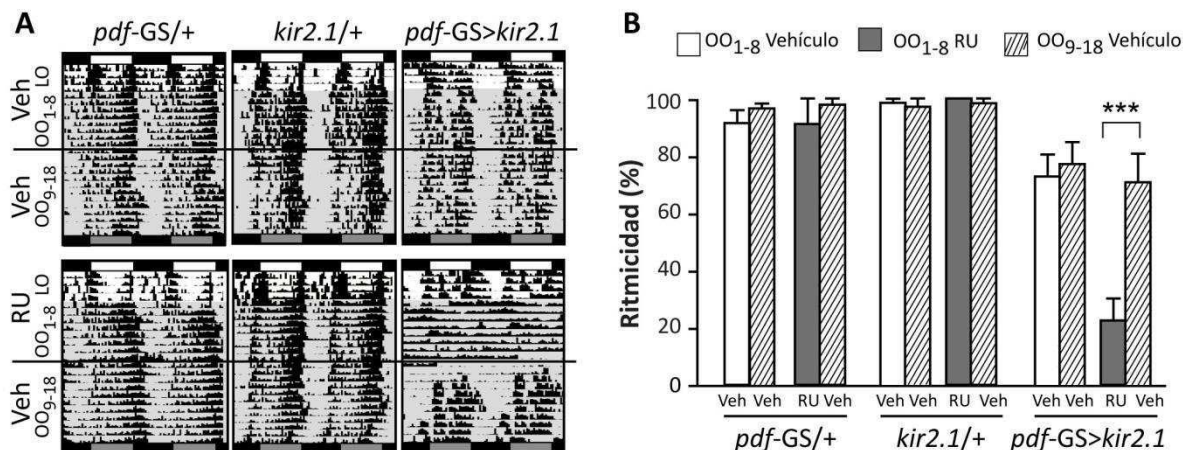
A continuación, y para confirmar la fuerza del sistema inducible, se compararon los efectos sobre la ritmicidad comportamental del silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF generados con la línea constitutiva *pdf-GAL4* o induciendo desde el embrión con la línea inducible *pdf-GS*. Para ambos sistemas, la expresión de KIR2.1 desde el desarrollo hasta la adultez condujo a arritmicidad comportamental (Figura 1.2 y (Nitabach *et al.*, 2002)), mientras que los controles genéticos o moscas *pdf-GS>kir2.1* tratadas con sólo vehículo son completamente rítmicas. Más aun, el silenciamiento eléctrico restringido a la fase adulta también condujo a arritmicidad comportamental (Figura 1.2), demostrando un rol específico de la actividad eléctrica de las neuronas PDF en el control del comportamiento locomotor rítmico del adulto.



**Figura 1.2 El silenciamiento eléctrico altera la ritmicidad comportamental A.** Actogramas representativos de los genotipos y condiciones analizados. Moscas de entre 3 y 5 días de edad fueron entrenadas por 3 días en LO y luego transferidas a OO por 9 días. En los actogramas las barras blancas representan la fase de luz, las negras, la fase de oscuridad y las grises, el día subjetivo. El fondo gris indica la fase de OO. Arriba de cada actograma se indica el genotipo y el tratamiento aplicado durante el desarrollo (barra de la izquierda) y la adultez (barra de la derecha). En gris, aplicación de RU; blanco, de vehículo, y negro, comida estándar. Dev significa RU presente durante el desarrollo y Ad, sólo durante la adultez. **B.** Porcentaje de ritmicidad poblacional. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes con un mínimo de 28 moscas analizadas. \*\*\* indica diferencias significativas con un  $p < 0,001$  (ANOVA con test *post-hoc* de Bonferroni).

Dada la efectividad de la herramienta inducible, decidimos analizar si el efecto de la actividad eléctrica sobre la actividad locomotora era reversible. Nuevamente, se restringió el silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF sólo a la fase adulta y registró la actividad locomotora durante 3 días en ciclos de luz oscuridad (LO, fase de entrenamiento) y luego 8 días más en ausencia de claves ambientales. Como se muestra en la Figura 1.2, en esta fase de silenciamiento eléctrico la mayoría de las moscas son arrítmicas (tan sólo un 20% de ritmicidad poblacional). Sin embargo, al retirar el inductor RU de la comida un 70% de las moscas recuperaron un patrón locomotor rítmico en un par de días (Figura 1.3). Esta pequeña ventana temporal requerida para recuperar la ritmicidad comportamental coincide con el escaso tiempo que es necesario para limpiar la gran mayoría de KIR en las proyecciones axonales dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* (Figura 1.1 B).

Los experimentos de actividad locomotora de las Figuras 1.2 y 1.3 fueron llevados a cabo por el Licenciado Ezequiel Aranovich como parte de su tesis de licenciatura.

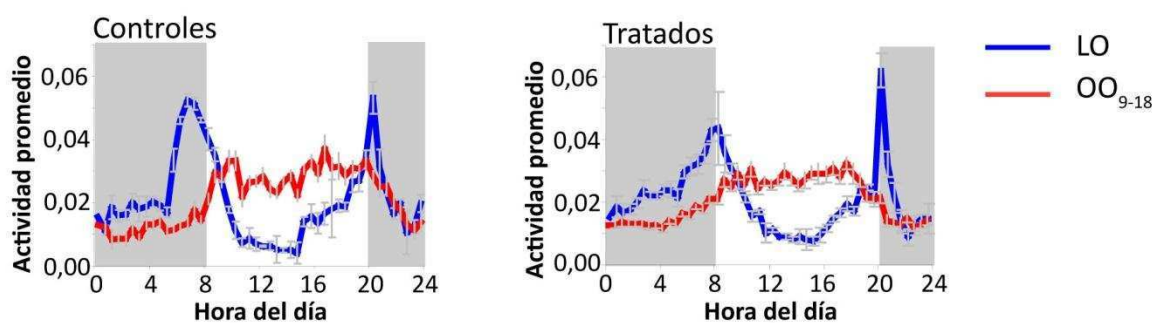


**Figura 1.3. El silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF altera la ritmicidad comportamental de manera reversible. A.** Actogramas representativos de animales controles y tratados. Las moscas fueron desarrolladas en medio estándar y adultos jóvenes fueron transferidos a tubos conteniendo RU o vehículo. Las moscas fueron entrenadas por 4 días (LO), estuvieron 8 días en condiciones constantes (OO<sub>1-8</sub>) con o sin RU (Veh) y luego todos los grupos experimentales pasaron a tubos sin RU (Veh) por 10 días más (OO<sub>9-18</sub>). **B.** Porcentaje de ritmicidad poblacional de cada grupo a lo largo de los distintos tratamientos. Los datos representan 3 experimentos independientes y el número total de moscas analizadas por tratamiento va desde 45 a 64. \*\*\* indica diferencias significativas con un  $p < 0,001$  (ANOVA con test *post-hoc* de Bonferroni).

La recuperación de un comportamiento locomotor rítmico luego de 12 días de tratamiento abre la interrogación sobre el estado del reloj molecular durante la fase de silenciamiento. Una posibilidad es que durante el silenciamiento eléctrico efectivamente el reloj molecular se detenga y una vez restauradas las propiedades eléctricas normales se recupere el correcto funcionamiento del oscilador molecular y, como consecuencia, el comportamiento locomotor rítmico. Sin embargo, si las oscilaciones moleculares se detuvieran durante el silenciamiento eléctrico no habría ningún mecanismo que permitiera medir el paso del tiempo correctamente, por lo cual la recuperación de la actividad locomotora en ausencia de claves ambientales no podría volver en la misma fase que tenía cuando había un oscilador funcional. Esto es así básicamente porque si no hay medición del tiempo circadiano durante el silenciamiento eléctrico, no hay forma de “recordar” la fase que imponía el ciclo de luz-oscuridad<sup>10</sup>. Para analizar si la fase está conservada respecto a la fase impuesta por el ciclo de luz-oscuridad se realizaron los mismos experimentos de recuperación pero sin afectar las propiedades eléctricas durante los primeros 3 días de LO. De esta manera, nos aseguramos que las moscas

<sup>10</sup> Moscas con un oscilador circadiano funcional presentan un comportamiento locomotor circadiano. Sin embargo, la fase de la actividad está impuesta por la sincronización por las claves ambientales. De esta manera, si moscas salvajes son criadas y mantenidas siempre en ausencia de claves ambientales todas presentarán comportamiento locomotor rítmico pero cada una con una fase distinta.

sincronicen correctamente su actividad locomotora a los ciclos de LO. Se compararon entonces, la fase de la actividad locomotora durante la recuperación ( $OO_{9-18}$ ) y el periodo de sincronización inicial (LO) en moscas controles (en las cuales nunca se silenció el circuito PDF) y moscas silenciadas durante la primer porción de oscuridad constante ( $OO_{1-8}$ ). Como se observa en la Figura 1.4, durante la recuperación las moscas previamente silenciadas consolidaron su actividad locomotora en la etapa que correspondería a la fase lumínica según la sincronización impuesta. Lo mismo ocurre con las moscas controles que nunca silenciaron la actividad de su circuito PDF. Estos resultados indican que una vez recuperada la actividad locomotora rítmica ésta lo hizo en la misma fase que presentaba en presencia de claves ambientales sincronizadoras, sugiriendo que el oscilador circadiano no se vio alterado por el silenciamiento eléctrico.



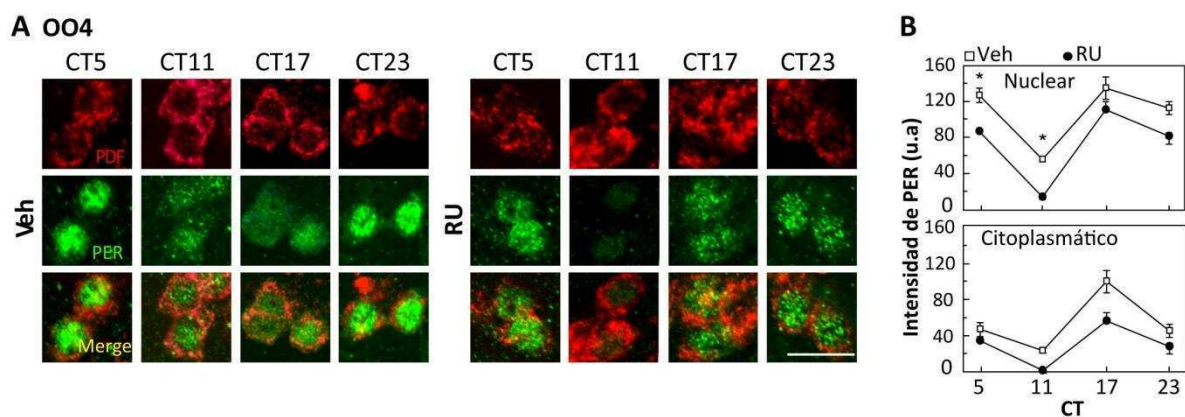
**Figura 1.4. La actividad locomotora se recupera con la misma fase de actividad que la desplegada antes del silenciamiento eléctrico.** Perfiles de actividad locomotora promedio durante la fase de sincronización (LO, azul) y en la fase de recuperación ( $OO_{9-18}$ , rojo) de moscas controles (*pdf-GS>kir2.1* que siempre estuvieron en Vehículo, **izquierda**) y moscas tratadas (*pdf-GS>kir2.1* que fueron transitoriamente expuestas a RU durante la fase  $OO_{1-8}$ , **derecha**). Se consideraron para el análisis sólo las moscas rítmicas durante la fase de recuperación  $OO_{9-18}$ . Los gráficos constituyen el promedio de la actividad locomotora de todas las moscas analizadas en cada grupo y promediado por todos los días de cada fase (LO o  $OO_{1-8}$ ).

La presencia de un oscilador circadiano funcional durante la fase de silenciamiento sugiere que el reloj molecular no alteró su paso a causa del silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF<sup>11</sup>. Para estudiar si efectivamente ése era el caso, se analizó el estado del reloj molecular de las *s-LN<sub>v</sub>s* durante la fase de silenciamiento eléctrico siguiendo la localización subcelular de PER a lo largo del cuarto día de oscuridad constante ( $OO_4$ ). Se disectaron moscas controles (*pdf-GS>kir2.1* mantenidas en Vehículo) o moscas con el circuito PDF silenciado (*pdf-GS>kir2.1* mantenidas en RU) a distintos tiempos circadianos (CT5, 11, 17 y 23) y se realizó inmunohistoquímica contra el neuropéptido PDF,

<sup>11</sup> La Dra. Nara Muraro hizo registros electrofisiológicos y confirmó que la inducción de KIR2.1 con nuestro sistema GeneSwitch efectivamente silencia la actividad eléctrica de las neuronas PDF por lo que el oscilador circadiano del que hablamos no puede ser cambios diarios en la actividad de la membrana (ver trabajo Depetris-Chauvin *et al.*, 2011).

para identificar las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s*, y contra PER, para examinar el estado del reloj molecular. En las *s-LN<sub>v</sub>s* de moscas controles PER se encontró principalmente nuclear y alto a CT5 y CT23. A CT11 los niveles de PER estaban reducidos significativamente y a CT17 PER se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma. Como se había predicho, las oscilaciones circadianas de PER persistieron durante la fase de silenciamiento y el perfil de acumulación temporal resultó indistinguible del de moscas controles aunque los niveles de proteína fueron ligeramente más bajos, diferencia que resultó significativa sólo a CT5 y 11 (Figura 1.5). Estos datos fueron generados por la Dra. Jimena Berni.

En conclusión, el silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF restringido a la adultez alteró reversiblemente la ritmicidad comportamental sin afectar las oscilaciones moleculares de PER. Estos resultados demuestran que la actividad de la membrana no es responsable de generar las oscilaciones moleculares, sugiriendo entonces que el reloj molecular es la base funcional de las oscilaciones circadianas en la mosca.



**Figura 1.5. El silenciamiento eléctrico adulto específico no altera el paso del reloj molecular.** Moscas jóvenes *pdf-GS> kir2.1* fueron mantenidas en presencia de inductor (RU) o en ausencia del mismo (Veh) durante 3 días en LO y luego 4 días en OO. Durante OO4 se tomaron muestras cada 6 horas (CT5, 11, 17 y 23) y se realizó inmunohistoquímica contra PDF (rojo) y contra PER (verde). **A.** Imágenes de confocal representativas de la señal de PER y PDF a los distintos tiempos circadianos en moscas controles y silenciadas **B.** Gráficos de la intensidad de PER en el núcleo y citoplasma a cada tiempo para cada tratamiento. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes. Ambos grupos mostraron cambios significativos en la localización nuclear de PER a lo largo del día (ANOVA de un factor con test *post-hoc* de Bonferroni). La intensidad de PER resultó significativamente distinta entre ambos grupos a CT5 y CT11 (\*  $p < 0,05$ ). Escala 10  $\mu$ m, u.a. indica unidades arbitrarias.

## 1.2 Alteraciones eléctricas a largo término afectan irreversiblemente el comportamiento y, en última instancia, alteran el paso del reloj molecular

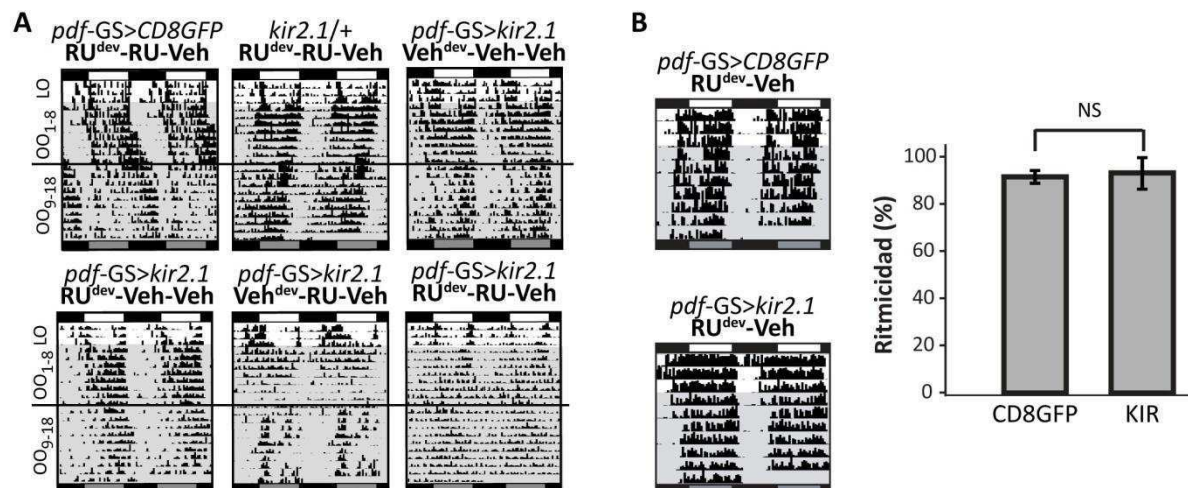
La falta de efecto del silenciamiento eléctrico adulto específico de las neuronas PDF sobre el paso del reloj molecular está en clara contradicción con los resultados presentados por Nitabach utilizando un silenciamiento crónico. En ese sentido, es posible que la falta de actividad eléctrica en el circuito durante el desarrollo desencadene mecanismos deletéreos que terminen afectando la funcionalidad de las neuronas PDF durante la adultez y, por lo tanto, el efecto sobre el desarrollo sea el responsable de las diferencias entre nuestros resultados y los de Nitabach. Para estudiar esta posibilidad decidimos restringir el silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF sólo al desarrollo del circuito y luego analizar el efecto en la adultez sobre la actividad locomotora, la salida más estudiada de las neuronas PDF. Nuestro razonamiento fue que si el silenciamiento eléctrico durante el desarrollo afecta irreversiblemente la funcionalidad de las neuronas PDF entonces, las moscas deben resultar arrítmicas en la adultez en el paradigma de actividad locomotora.

Moscas controles *pdf-GS>CD8GFP* o *UAS-kir2.1/+* mantenidas y analizadas en presencia de RU fueron mayoritariamente rítmicas. Sorprendentemente, el silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF durante todo el desarrollo del circuito (*pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-Veh-Veh) no afectó la ritmicidad comportamental durante la adultez sugiriendo que los pasos iniciales durante el desarrollo del circuito (migración y establecimiento de la conectividad) no se vieron particularmente afectados por el efecto dramático sobre la excitabilidad (Figura 1.6 A panel de abajo a la izquierda y Tabla 1.1). Más aun, asegurar la inducción del sistema durante la pupariación no incrementó la arritmicidad observada en animales mantenidos en RU durante el desarrollo<sup>12</sup> (Figura 1.6 B).

Por el contrario, el silenciamiento eléctrico a largo término, extendido desde el desarrollo temprano hasta 11 días entrada la adultez (*pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-RU-Veh), resultó en una gran reducción de la ritmicidad comportamental y este efecto no pudo ser revertido una vez transferidas a tubos sin inductor (Figura 1.6 A, panel de abajo a la derecha y Tabla 1.1). Esta observación contrasta con la arritmicidad observada cuando se restringió el silenciamiento eléctrico sólo durante la adultez (*pdf-GS>kir2.1* Veh<sup>dev</sup>-RU-Veh) puesto que dicho fenotipo pudo ser parcialmente rescatado al

<sup>12</sup> La inducción del sistema durante el desarrollo se hizo por medio de mantener las moscas desde el embrión en comida con RU. Sin embargo, dado que la inducción depende de que los individuos ingieran alimento, y considerando que durante los 5 días de la pupariación las moscas no comen, decidimos asegurar la inducción en este estadio generando una incisión en el pupario y sumergiendo las moscas en una solución de RU (Ver Materiales y Métodos).

remover el inductor de la comida (Figura 1.6 A, panel del medio abajo y Tabla 1.1). Estos resultados sugieren que un silenciamiento eléctrico a largo término (10 días de desarrollo y 11 días durante la adultez) conduce a cambios irreversibles en la fisiología de las neuronas PDF.



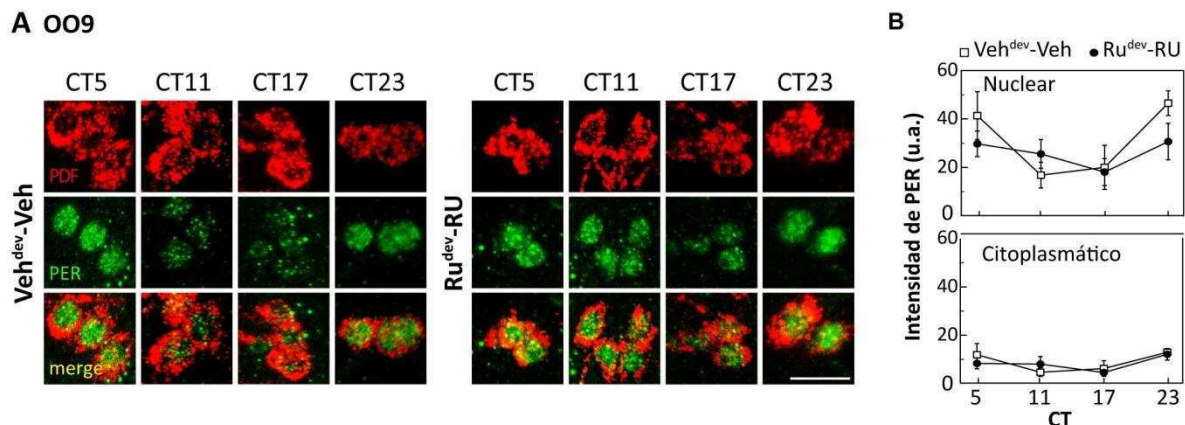
**Figura 1.6.** El silenciamiento eléctrico a largo término altera irreversiblemente la ritmicidad locomotora. **A.** Actogramas representativos de animales de los grupos experimentales más relevantes. Las moscas fueron criadas en medio con (RU) o sin inductor (Veh) a través de su desarrollo (dev). Machos adultos jóvenes fueron transferidos a tubos con (RU) o sin inductor (Veh), entrenados por 3 días y luego transferidos a oscuridad constante por 8 días (OO<sub>1-8</sub>). Luego de este punto todos los grupos experimentales fueron transferidos a tubos sin RU (Veh) y monitoreados por 10 días más (OO<sub>9-18</sub>). **B.** Actogramas representativos (**izquierda**) y gráfico de porcentaje de ritmicidad (**derecha**) de moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* RU<sup>dev</sup>-Veh. En el gráfico resumido a CD8GFP) y tratadas (*pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-Veh. En el gráfico resumido a KIR) con inducción adicional durante la pupariación (NS, diferencias no significativas. T-test).

Grupo experimental	OO <sub>1-8</sub>		OO <sub>9-18</sub>		n
	Ritmicidad (% +/- SEM)	Periodo (h +/- SEM)	Ritmicidad (% +/- SEM)	Periodo (h +/- SEM)	
<i>pdf-GS&gt;CD8GFP</i> Veh <sup>dev</sup> -Veh-Veh	92,7 +/- 3,9	23,8 +/- 0,2	89,4 +/- 7,9	23,7 +/- 0,1	108
<i>pdf-GS&gt;CD8GFP</i> RU <sup>dev</sup> -RU-Veh	85,4 +/- 8,2	25,2 +/- 0,3	65,7 +/- 9,2	24,4 +/- 0,1	98
<i>kir2.1/+</i> RU <sup>dev</sup> -RU-Veh	92,3 +/- 5,7	23,8 +/- 0,2	81,2 +/- 0,3	23,6 +/- 0,0	88
<i>pdf-GS&gt;kir2.1</i> Veh <sup>dev</sup> -Veh-Veh	85,6 +/- 3,4	23,9 +/- 0,2	75,3 +/- 0,4	23,9 +/- 0,0	120
<i>pdf-GS&gt;kir2.1</i> RU <sup>dev</sup> -Veh-Veh	74,4 +/- 9,8	24,2 +/- 0,1	62,6 +/- 3,6	24,0 +/- 0,1	83
<i>pdf-GS&gt;kir2.1</i> Veh <sup>dev</sup> -RU-Veh	15,4 +/- 7,2	24,0 +/- 0,3	56,1 +/- 7,9	24,6 +/- 0,1	93
<i>pdf-GS&gt;kir2.1</i> RU <sup>dev</sup> -RU-Veh	11,1 +/- 8,7	24,0 +/- 0,3	10,6 +/- 5,0	24,1 +/- 0,3	104

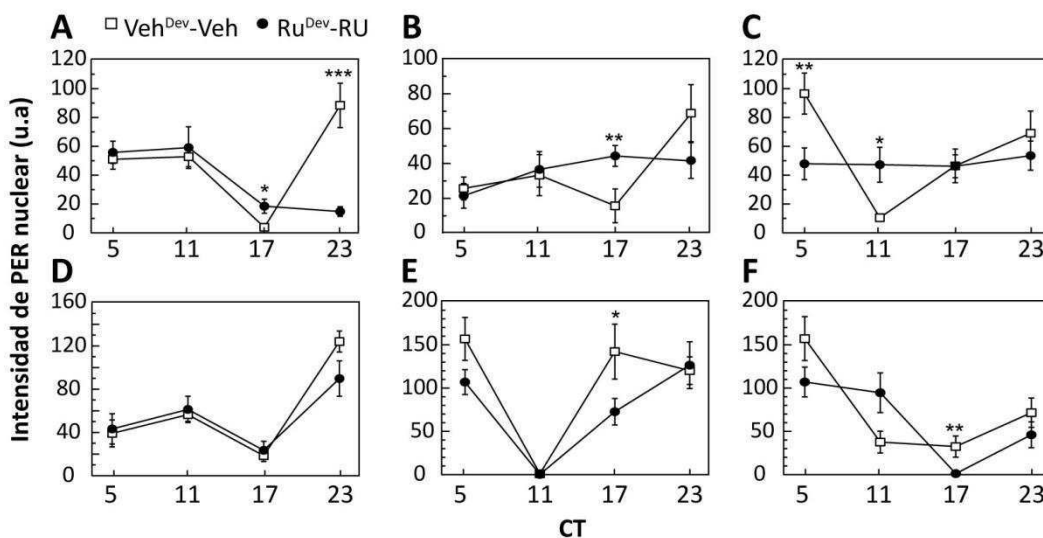
**Tabla 1.1. Porcentaje de ritmicidad y periodos promedios de todos los grupos experimentales de la Figura 1.6 A determinados para las 2 fases de oscuridad.** Los datos representan la media de 3 experimentos independientes. n se refiere al número de animales analizados. El porcentaje de ritmicidad de *pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-Veh-Veh no difirió de los grupos controles (*pdf-GS>kir2.1* Veh<sup>dev</sup>-Veh-Veh y *pdf-GS>CD8GFP* RU<sup>dev</sup>-Veh-Veh) en ninguna de las fases de OO analizadas (ANOVA de 2 factores con corrección de Bonferroni). *pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-RU-Veh no recuperaron la ritmicidad comportamental luego de retirar el RU (el porcentaje de ritmicidad es estadísticamente diferente a los grupos controles en la fase de OO<sub>9-18</sub>, p < 0,001 ANOVA de 2 factores con corrección de Bonferroni). Por el contrario, *pdf-GS>kir2.1* Veh<sup>dev</sup>-RU-Veh recuperó la ritmicidad a niveles similares a los controles (el porcentaje de ritmicidad no difirió estadísticamente en la fase de OO<sub>9-18</sub>).

A continuación nos preguntamos si la incapacidad de recuperar la ritmicidad comportamental en moscas que sufrieron un silenciamiento eléctrico a largo término (*pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-RU-Veh) se debió a que en estas condiciones se detuvo el reloj molecular del marcapasos central. Para analizar esta opción se realizaron curvas temporales siguiendo el estado de la proteína PER en los somas de las *s-LN<sub>s</sub>* durante el día en el que las moscas deberían haber sido transferidas a tubos sin inductor (OO9). En moscas controles (*pdf-GS>kir2.1* Veh<sup>dev</sup>-Veh) la proteína PER osciló a lo largo del día dentro del núcleo a OO9 (Figura 1.7 A Panel izquierda y 1.7 B). Por el contrario, en promedio, no se observaron oscilaciones de los niveles de PER en el núcleo o citoplasma de moscas mantenidas en RU desde el desarrollo (*pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-RU) (Figura 1.7 A Panel derecha y 1.7 B). Esta falta de oscilaciones en promedio resultó, en realidad, de diferentes patrones de acumulación de PER en el núcleo de moscas tratadas con RU entre los distintos experimentos realizados. En 3 de 6 curvas temporales realizadas no se observó oscilación de PER o la oscilación tuvo muy baja amplitud (Figura 1.8 A-C). Sin embargo, en los otros 3 experimentos se observaron claras oscilaciones de PER con un patrón temporal similar al de los controles (Figura 1.8 D-F). Estas diferencias entre los experimentos sugieren que el tratamiento aplicado lleva al sistema a un punto límite donde leves diferencias en el grado de inducción puede conducir a efectos deletéreos en la fisiología de las neuronas PDF, y por consiguiente, en su reloj molecular.



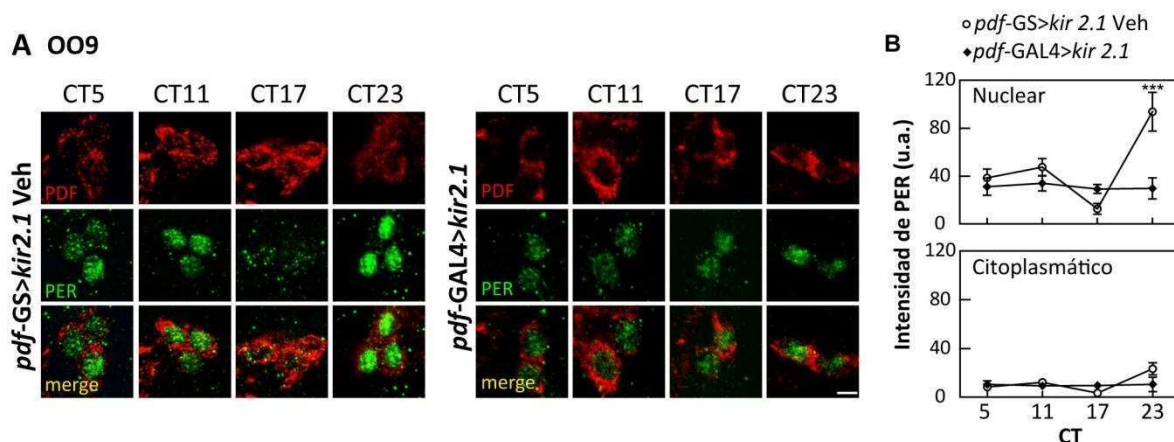


**Figura 1.7. El silenciamiento eléctrico a largo término eventualmente afecta el paso del reloj molecular.** Las moscas fueron criadas en medio con (RU) o sin inductor (Veh) a través de su desarrollo (dev) y en la misma condición durante la adultez. Se tomaron muestras cada 6 horas durante OO9 (CT5, 11, 17 y 23) y se realizó inmunohistoquímica contra PDF (rojo) y contra PER (verde). Escala: 10  $\mu$ m. **A.** Imágenes de confocal representativas de los somas de las *s-LN<sub>V</sub>s* en moscas controles y tratadas. **B.** Gráficos de la intensidad de PER en el núcleo y citoplasma a cada tiempo para cada tratamiento. Los controles mostraron cambios significativos de la señal de PER en el núcleo durante el día (CT17 vs CT23,  $p < 0,05$ ). A pesar de que no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales, no se encontraron oscilaciones significativas de los niveles de PER en el núcleo en moscas tratadas con RU. El experimento fue repetido 6 veces con 10 cerebros analizados por tratamiento/CT/experimento. Las fotos y figuras representan el promedio de todos los experimentos. U.a.: unidades arbitrarias.



**Figura 1.8. Curvas temporales de PER de moscas controles y eléctricamente silenciadas a largo término durante OO9.** Los gráficos muestran la acumulación de PER en el núcleo de controles y tratados para cada uno de los 6 experimentos realizados. El análisis estadístico (ANOVA de 2 Factores con test *post-hoc* de Tukey) arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*) en los CT indicados en la figura. **A.** En este experimento el silenciamiento eléctrico a largo término redujo la amplitud de las oscilaciones de PER mientras que en **B-C** no se observó oscilación significativas de PER. En cambio en **D-F** moscas *pdf-GS>kir2.1* RU<sup>dev</sup>-RU presentaron oscilaciones diarias en los niveles de PER en el núcleo similares a sus respectivos controles. En todos los experimentos se detectó oscilación significativa de PER en el núcleo de moscas controles (*pdf-GS>kir2.1* Veh<sup>dev</sup>-Veh). U.a.: unidades arbitrarias.

Por último, se analizó en paralelo las oscilaciones de PER en moscas *pdf-GAL4>kir2.1* para confirmar que dicho tratamiento afecta el estado del reloj molecular. Efectivamente, en OO9 las moscas *pdf-GAL4>kir2.1* presentaron niveles bajos de la proteína PER en el núcleo que no oscilaron a lo largo del día (Figura 1.9).



**Figura 1.9. Las oscilaciones moleculares de PER en neuronas marcapasos están afectadas luego de la expresión constitutiva de KIR.** Moscas jóvenes *pdf-GS>kir2.1* en ausencia de RU (control) y moscas *pdf-GAL4>kir2.1* fueron sincronizadas, luego se tomaron muestras cada 6 horas (CT5, 11, 17 y 23) en OO9 y se realizaron inmunohistoquímicas contra PDF (rojo) y PER (verde). **A.** Imágenes de confocal representativas de somas de *s-LN<sub>s</sub>* de moscas controles (**izquierda**) y moscas *pdf-GAL4>kir2.1* (**derecha**). Note que estas curvas temporales se realizaron junto con las presentadas en la Figura 1.7 y por eso el control utilizado fue el que corresponde a esos tratamientos. **B.** Cuantificación de la señal de PER en el núcleo y citoplasma a lo largo del día. No se observaron oscilaciones moleculares en los cerebros silenciados. Los datos son la media de 3 experimentos independientes con 9-10 cerebros analizados para cada CT/tratamiento/experimento. U.a.: unidades arbitrarias.

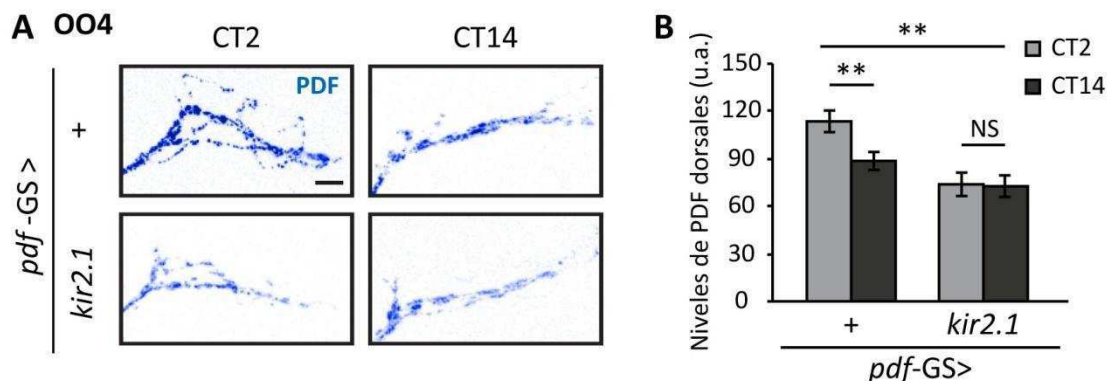
En resumen, nuestros resultados demuestran que la expresión prolongada de KIR en el circuito PDF afecta irreversiblemente el comportamiento locomotor rítmico y, en última instancia, el estado del oscilador molecular. Estos resultados, sumados a los presentados en la sección anterior, indican la relevancia de la actividad eléctrica de las neuronas PDF en el control del comportamiento locomotor rítmico mientras que su efecto sobre el reloj molecular sería indirecto y, presumiblemente, modulador.

## Parte 2: La actividad eléctrica de las neuronas PDF como una vía de salida desde el oscilador

El objetivo de esta segunda parte de la tesis fue analizar el rol de la actividad eléctrica de las neuronas PDF como una vía de salida desde el oscilador. En particular nos preguntamos: ¿Por qué el silenciamiento eléctrico afecta la ritmicidad comportamental? ¿La actividad eléctrica afecta las vías de salida ya conocidas del marcapasos central?

### 1.3 El silenciamiento eléctrico adulto específico reduce reversiblemente los niveles de PDF en las terminales axonales

La señal del neuropéptido PDF oscila circadianamente en las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* y estos cambios diarios se ven afectados en mutantes del reloj (Park *et al.*, 2000) así como también en situaciones de alteración de las propiedades de membrana (Fernandez *et al.*, 2008; Lear *et al.*, 2005a; Nitabach *et al.*, 2006). Por lo tanto, decidimos analizar si las oscilaciones de los niveles de PDF estaban afectadas durante la fase de silenciamiento. Para ello, se realizaron ensayos de inmunohistoquímicas contra PDF en moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU durante la adultez) y moscas con el silenciamiento eléctrico restringido al adulto (*pdf-GS>kir2.1* mantenidas en RU durante la adultez) al cuarto día de oscuridad constante (OO4) al principio del día subjetivo (CT2) y al inicio de la noche subjetiva (CT14). Moscas controles mostraron oscilaciones en los niveles de PDF en la terminales axonales, presentando altos niveles durante el día y bajos durante la noche. Por el contrario, moscas que expresaban KIR en el circuito PDF durante la adultez presentaron una clara reducción en los niveles del neuropéptido en las terminales y estos niveles se mantuvieron constantes a lo largo del día (Figura 1.10). Podemos decir, entonces, que el silenciamiento eléctrico restringido al adulto afecta directamente la acumulación y/o liberación del neuropéptido PDF.



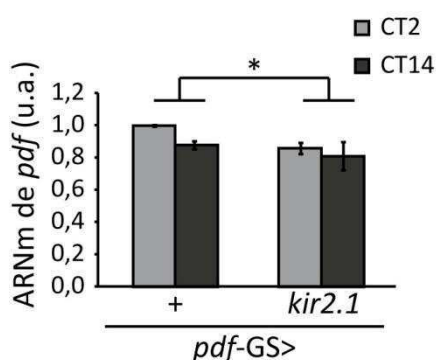
**Figura 1.10.** Los niveles de PDF en la terminal dorsal se encuentran bajos y constantes como consecuencia del silenciamiento eléctrico adulto específico. Adultos jóvenes fueron mantenidos en RU durante 3 días de sincronización y 4 días en oscuridad constante. Al cuarto día (OO4) se tomaron las muestras a 2 tiempos (CT2 y CT14), se analizaron por inmunohistoquímica contra el neuropéptido PDF y se cuantificó los niveles del neuropéptido en las terminales. **A.** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de las proyecciones axonales dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* de moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP*, arriba) y tratadas (*pdf-GS>kir2.1*, abajo) a CT2 y CT14. **B.** Cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en las terminales axonales. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos y un mínimo de 30 cerebros fueron analizados por punto. Los niveles de PDF oscilaron a lo largo del día en los controles mientras que los tratados no oscilaron y se mantuvieron bajos a un nivel comparable a la noche del control (ANOVA de 2 factores con un test *post-hoc* de Bonferroni. \*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,01$ . NS: No Significativo). Escala: 10  $\mu$ m.

El efecto sobre los niveles de PDF en las arborizaciones del protocerebro dorsal podría deberse a cambios en los niveles estables de ARN mensajero de *pdf* (por medio de afectar el nivel de transcripción o la estabilidad de los mensajeros) o en la cantidad total de proteína (por medio de afectar la traducción del propéptido o la producción del neuropéptido final<sup>13</sup>), en el transporte del neuropéptido hacia la terminal o por afectar la liberación del mismo.

En primer lugar, se analizó si el silenciamiento eléctrico afectó los niveles estables de ARN mensajero. Para ello, se analizaron los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *pdf* por la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en cabezas de moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU durante la adultez) y moscas con el silenciamiento eléctrico restringido al adulto (*pdf-GS>kir2.1* mantenidas en RU durante la adultez) al cuarto día de oscuridad constante (OO4) durante el principio del día subjetivo (CT2) y el principio de la noche subjetiva (CT14). Este experimento fue realizado por el Dr. Esteban Beckwith en nuestro laboratorio. De acuerdo con datos publicados (Park & Hall, 1998) en moscas controles los niveles de mensajero de *pdf* no presentaron variaciones significativas a lo

<sup>13</sup> PDF se traduce como un propéptido y viaja en vesículas hacia la terminal. Dentro de estas vesículas sería clivado por una endopeptidasa aún no descrita para dar el neuropéptido maduro de 19 aminoácidos. El anticuerpo anti-PDF utilizado reconoce específicamente al neuropéptido maduro.

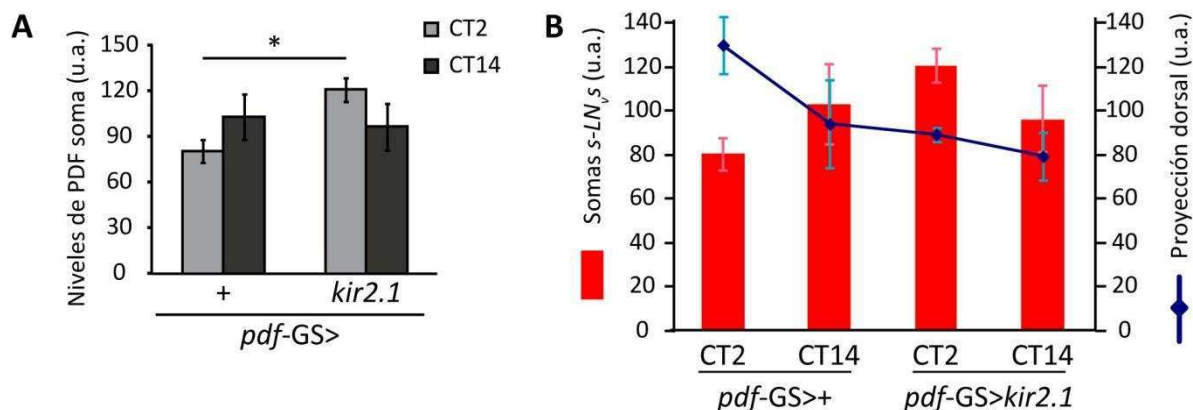
largo del día, aunque se vio una tendencia a una menor cantidad a CT14. Los niveles de ARNm de *pdf* en moscas que expresaban KIR fueron levemente menores, diferencia que resultó estadísticamente significativa. Sin embargo, la magnitud del efecto fue muy baja (reducción general del 14%), indicando que el silenciamiento eléctrico adulto específico no estaría modificando groseramente los niveles de transcripción y/o estabilidad del mensajero de *pdf* (Figura 1.11).



**Figura 1.11. Los niveles de mensajero de *pdf* están levemente afectados por el silenciamiento eléctrico.** Se midieron los niveles del ARNm de *pdf* y *tubulina* (usado como normalizador) en muestras de cabezas de moscas por qRT-PCR. Se observó una tendencia a menores niveles de ARNm hacia la noche pero dicha diferencia no resultó significativa. Se vieron diferencias significativas globales entre los genotipos con un  $p < 0,05$  indicado en la figura con un \* (ANOVA de 2 Factores. Interacción no significativa y diferencias significativas entre Genotipos con  $p = 0,04$ ). Se aplicó la transformación  $\arcseno(\sqrt{x})$  para cumplir con los supuestos del ANOVA. U.a. indica unidades arbitrarias.

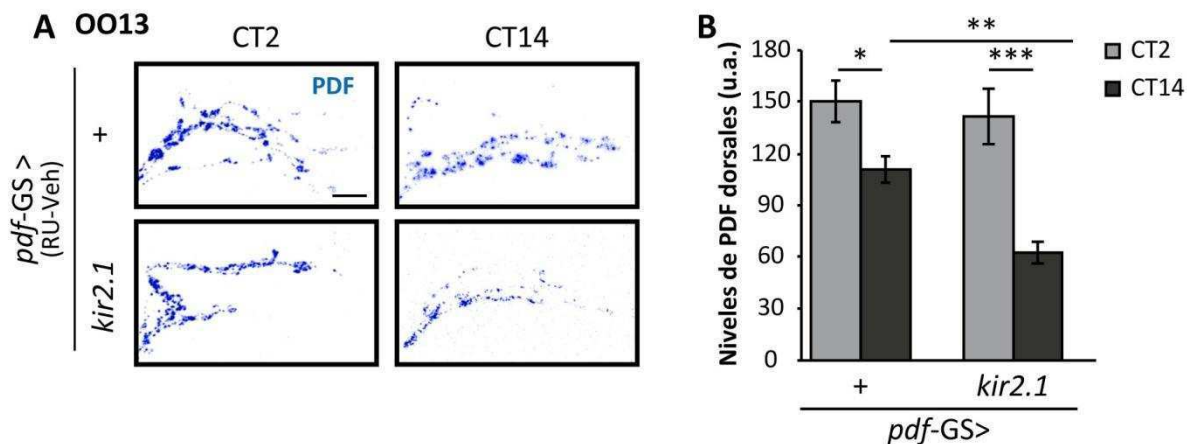
Con el fin de estudiar si el silenciamiento eléctrico afecta los niveles generales de la proteína PDF o su transporte hacia la terminal, se analizó los niveles de PDF en los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* por medio de la técnica de inmunohistoquímica en moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* con RU en el adulto) y moscas tratadas (*pdf-GS>kir2.1* con RU en el adulto) durante OO4 a CT2 y CT14. Si los niveles generales de la proteína se vieron afectados por la expresión de KIR y, considerando que se observaron niveles más bajos de PDF en la terminal axonal (Figura 1.10), se esperaba que en moscas con el circuito PDF silenciado los niveles del neuropéptido en los somas también sean más bajos que los controles. Alternativamente, si lo que está afectado es específicamente el transporte hacia las terminales entonces se esperaba que en moscas con el circuito PDF silenciado los niveles de PDF en los somas sean más altos que los controles (al no transportarse hacia las terminales el péptido se acumularía en el soma o en alguna parte de su trayecto axonal). En moscas controles los niveles de PDF en el soma tendieron a ser más bajos durante el día respecto a la noche aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística (Figura 1.12 A). Estos cambios están en clara antifase con lo que ocurre para los niveles de PDF en las terminales, sugiriendo que el neuropéptido podría ser transportado a una mayor tasa durante el día respecto a la noche en situaciones controles (Figura 1.12 B). De manera interesante, los niveles de PDF en los somas de moscas eléctricamente silenciadas fueron más altos que los controles y esta diferencia alcanzó significancia estadística al principio de la mañana (CT2 control vs CT2 tratado  $p < 0,05$ ) (Figura 1.12 A). Más aun, al comparar los niveles de PDF

en los somas y proyecciones en los mismos grupos de cerebros se apreció claramente el patrón opuesto; se observaron menores niveles de PDF en las terminales axonales de *s-LN<sub>v</sub>s* de moscas que expresaban KIR mientras que estas mismas moscas presentaron niveles en los somas mayores que sus controles (Figura 1. 12 B). Estos resultados sugieren que el transporte hacia la terminal axonal estaría aumentado a causa del silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF aunque no podemos descartar que otros procesos, como la liberación del neuropéptido, también estén afectados.



**Figura 1.12. Los niveles de PDF en los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* están aumentados como consecuencia del silenciamiento eléctrico adulto específico. A.** Cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en somas de moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* con RU en el adulto) y moscas tratadas (*pdf-GS>kir2.1* con RU en el adulto) durante el día (CT2) y la noche subjetiva (CT14). Los datos representan la media de al menos 3 experimentos y un mínimo de 30 cerebros fueron analizados por punto. En los controles se observó una tendencia a más niveles de PDF en somas a la mañana aunque esta diferencia no resultó significativa. Los niveles de PDF en los somas de moscas tratadas fueron más altos que los de moscas controles a CT2 (ANOVA de 2 Factores con un test *post-hoc* de Duncan. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .) **B.** Cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en somas y proyecciones en los mismos cerebros para apreciar el patrón opuesto de la señal de PDF en ambas regiones.

Dado que el comportamiento locomotor rítmico pudo ser recuperado una vez apagada la expresión de KIR (Figura 1.3), nos preguntamos si lo mismo ocurría con las oscilaciones y los niveles de PDF en las terminales axonales. Se analizaron los niveles de PDF en las proyecciones en la fase de recuperación (OO13, 13 días de oscuridad constante en general y 5 días luego de pasar las moscas a viales sin inductor) durante el día y la noche subjetiva (CT2 y CT14). Tanto en moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* RU-Veh) como moscas previamente silenciadas (*pdf-GS>kir2.1* RU-Veh) los niveles de PDF en la terminal oscilaron mostrando diferencias significativas entre CT2 y CT14 (Figura 1.13). Por lo tanto, afectar las propiedades eléctricas de las neuronas PDF sólo durante la adultez afecta los niveles y oscilación de PDF en la terminal de manera completamente reversible.

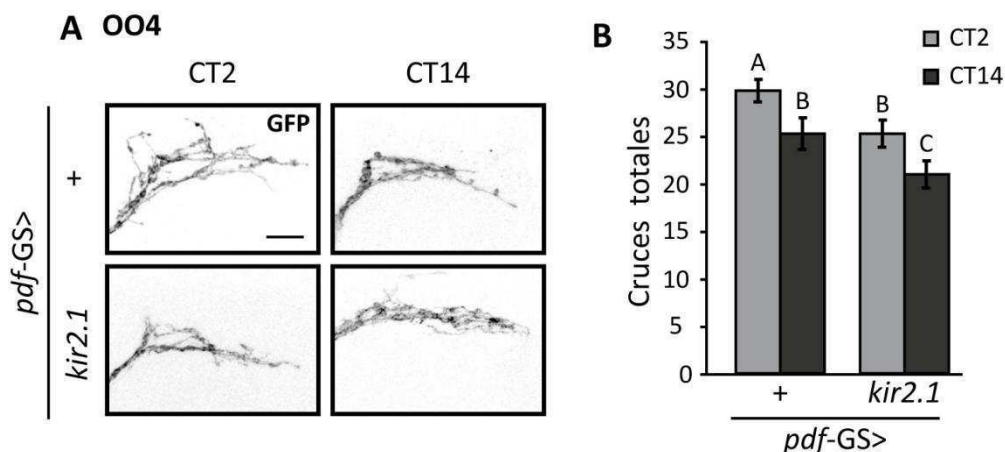


**Figura 1.13. Las oscilaciones y niveles de PDF en las terminales axonales se recuperan una vez restauradas las propiedades eléctricas de las neuronas PDF.** Adultos jóvenes fueron mantenidos en RU durante 3 días de sincronización y 8 días en oscuridad constante. Al noveno día se los transfirió a viales sin inductor (Veh) donde permanecieron por 5 días más (OO13). Durante OO13 se tomaron las muestras a CT2 y CT14, se realizaron inmunohistoquímica contra el neuropéptido PDF y se cuantificó los niveles del neuropéptido en las terminales. **A.** Imágenes de confocal representativas de las proyecciones axonales dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* de moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* RU-Veh, **arriba**) y tratadas (*pdf-GS>kir2.1* RU-Veh, **abajo**) a CT2 y CT14. **B.** Cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en las terminales axonales. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos y un mínimo de 30 cerebros fueron analizados por punto. Los niveles de PDF oscilaron a lo largo del día en ambos grupos experimentales y no se observó diferencias entre controles y tratados (ANOVA de 2 factores con un test *post-hoc* de Bonferroni. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ , \* con  $p < 0,01$  y \*\*\* con  $p < 0,001$ ). Escala: 10  $\mu$ m. U.a.: unidades arbitrarias.

#### 1.4 La plasticidad estructural y el número de contactos sinápticos están disminuidos en las neuronas PDF silenciadas.

Otra de las vías de salida conocidas del marcapasos central es la plasticidad estructural circadiana de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* (Fernandez *et al.*, 2008). Para examinar si el silenciamiento eléctrico adulto específico afecta esta vía de salida del marcapasos, se marcó la membrana de las neuronas PDF por medio de la expresión de CD8GFP. Adultos control de al menos dos días de edad (*pdf-GS>CD8GFP*) y tratados (*pdf-GS>CD8GFP;kir2.1*) fueron transferidos a comida con RU y disectados a CT2 y CT14 de OO4. En cerebros controles (*pdf-GS>CD8GFP*) las proyecciones axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* presentaron remodelación estructural a lo largo del día, exhibiendo más entrecruzamientos durante el día subjetivo con respecto a la noche subjetiva. De manera interesante, los cerebros tratados (*pdf-GS>CD8GFP;kir2.1*) presentaron un menor nivel de complejidad en la arborización de sus terminales axonales aunque se siguió evidenciando cambios circadianos en la morfología de dichas terminales (Figura 1.14). La persistencia de la plasticidad estructural es

indicativa de un oscilador molecular funcional en la fase de silenciamiento, mientras que la reducción general de la complejidad en los animales silenciados denota un rol novedoso de la actividad eléctrica sobre el refinamiento de la estructura del circuito PDF durante el periodo adulto.



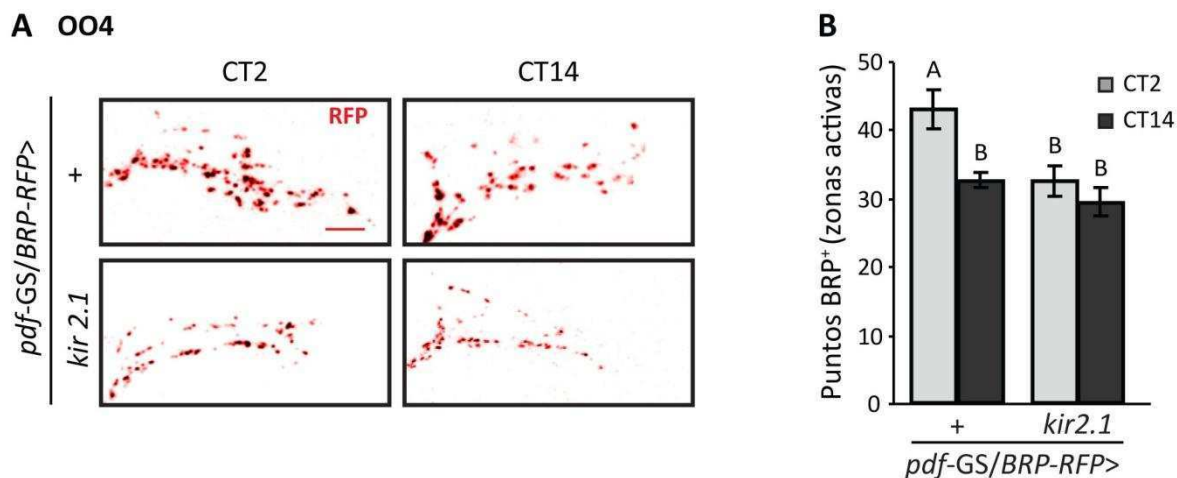
**Figura 1.14. La complejidad de las proyecciones axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* está comprometida durante la fase de silenciamiento.** **A.** Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de cerebros controlados (*pdf-GS>CD8GFP*) y tratados (*pdf-GS>CD8GFP;kir2.1*) teñidos con anti-GFP durante OO4 a CT2 y CT14. **B.** Cuantificación del número total de entrecruzamientos entre las proyecciones axonales y los círculos concéntricos. Los controles mostraron oscilación circadiana de la complejidad. Moscas con el circuito PDF silenciado durante la adultez presentaron una complejidad reducida a lo largo de todo el día, aunque con plasticidad estructural circadiana evidente. Los datos representan la media de 4 experimentos independientes y un total de entre 40 y 50 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Escala: 10  $\mu$ m.

Una de las posibles consecuencias de la remodelación diaria de las terminales axonales es que las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* cambien sus contactos sinápticos a lo largo del día. A favor de esa hipótesis, el Licenciado Axel Gorostiza demostró en el laboratorio que la señal de Bruchpilot (BRP), marcador de sinapsis activas en *Drosophila* (Kittel *et al.*, 2006; Wagh *et al.*, 2006), oscila circadianamente en las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*, sugiriendo que al menos el número de contactos sinápticos cambia a lo largo del día. El análisis de la señal de BRP revela más contactos sinápticos durante el principio del día y menos al principio de la noche y esta diferencia se mantiene en ausencia de claves ambientales (Gorostiza EA & Depetris-Chauvin A *et al.*, manuscrito en preparación).

Puesto que la complejidad de las proyecciones axonales se vio afectada por un silenciamiento eléctrico restringido al adulto, nos preguntamos si el número de contactos sinápticos también era sensible a la expresión de KIR. Para analizar esta posibilidad sobreexpresamos la proteína de fusión BRP-RFP en el circuito PDF de moscas controladas (*pdf-GS>BRP-RFP*) y moscas silenciadas (*pdf-GS>BRP-*



*RFP/kir2.1*), se tomaron muestras a CT2 y CT14 de OO4 y se realizaron ensayos de inmunohistoquímica contra RFP. Como se había demostrado previamente, en cerebros controles se observó más puntos BRP<sup>+</sup> a CT2 respecto a CT14. Por el contrario, el silenciamiento eléctrico durante la adultez condujo a una reducción en el número de puntos BRP<sup>+</sup>, los cuales se mantuvieron constantes durante todo el día. Este número reducido de puntos BRP<sup>+</sup> fue comparable a los de la noche subjetiva del control (Figura 1.15).



**Figura 1.15. La sobreexpresión adulto específica de KIR en el circuito PDF detiene las oscilaciones en el número de contactos sinápticos de la proyección dorsal. A.** Imágenes de confocal representativas de cerebros controles (*pdf-GS>BRP-RFP*) y silenciados (*pdf-GS>BRP-RFP/kir2.1*) teñidos contra RFP tomados a CT2 y CT14 durante OO4. **B.** Cuantificación del número de puntos BRP<sup>+</sup>. Moscas controles mostraron mayor número de zonas activas BRP<sup>+</sup> a CT2 que a CT14 mientras que moscas *pdf-GS>BRP-RFP/kir2.1* presentaron una reducción en el número de zonas activas BRP<sup>+</sup> constantes a lo largo del día. Mismas letras indican diferencias no significativas ( $p < 0,05$  ANOVA de 2 Factores y test *post-hoc* de Tukey). Escala: 10  $\mu$ m.

Por lo tanto, a diferencia de lo observado para la plasticidad estructural, los contactos sinápticos a nivel de la proyección dorsal no sólo se vieron afectados en número sino también en su oscilación como consecuencia de la expresión de KIR en las neuronas PDF.

En resumen, en este primer capítulo demostramos que el silenciamiento eléctrico adulto, específico de las neuronas PDF, afecta el comportamiento locomotor rítmico, la señal de PDF en la terminal (presumiblemente a través de alterar el transporte del neuropéptido hacia la terminal), la estructura fina de las mismas terminales y el número de contactos sinápticos de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Todos estos efectos se llevan a cabo sin afectar el paso del reloj molecular dentro de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan un rol de la actividad eléctrica de las neuronas PDF como una vía de

salida desde el marcapasos central en vez de ser un componente generador de las oscilaciones circadianas.

## CAPITULO 2 Cambios circadianos de los contactos sinápticos del circuito PDF

En los siguientes capítulos de la tesis nos centramos en las vías de salida desde el marcapasos central con el fin de comprender cómo se transmite la información circadiana hacia el resto del organismo. En particular, analizamos el remodelamiento axonal circadiano de las terminales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. En este segundo capítulo nos propusimos estudiar la relevancia funcional de dicha plasticidad estructural en cuanto a su capacidad de modificar diariamente los contactos sinápticos de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s*.

## 2.1 El circuito PDF sufre cambios morfológicos notables durante la transición noche-día

El fenómeno de remodelamiento estructural de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* fue identificado por primera vez en nuestro laboratorio por la Dra. María de la Paz Fernández mientras caracterizaba los cambios de niveles de PDF en la misma región (Fernandez *et al.*, 2008). Previamente se había reportado que los niveles de PDF en las terminales presentan un máximo hacia el inicio del día subjetivo (CT1-2) y un mínimo hacia el inicio de la noche subjetiva (CT13-14) sin mayores cambios en otros momentos del día (Park *et al.*, 2000). Por ese motivo y porque considerábamos improbable la ocurrencia de cambios más severos en la morfología en una escala temporal menor, asumimos que la plasticidad estructural también presentaría sus cambios más groseros coincidiendo con el inicio del día y de la noche subjetiva. Sin embargo, puesto que uno de los objetivos de esta tesis era profundizar en este fenómeno biológico decidimos aumentar la resolución temporal de la caracterización estructural de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* con el fin de establecer si efectivamente los cambios estructurales más severos son los que previamente se habían caracterizado hacia CT2 y CT14.

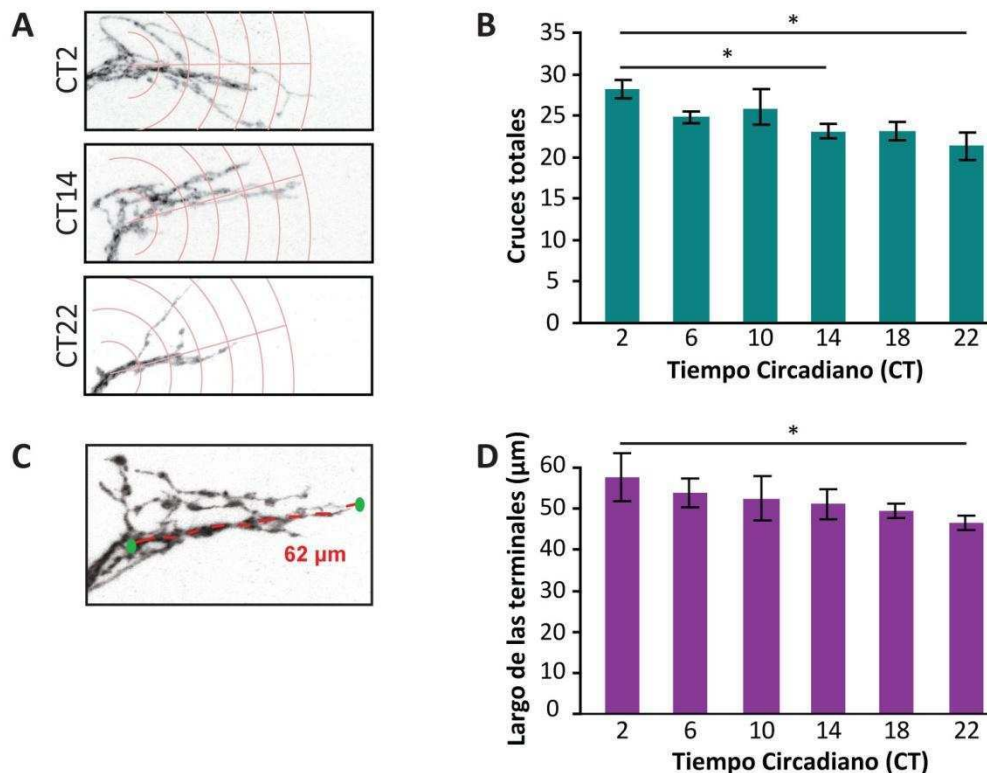
Moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU durante la adultez) fueron sincronizadas a ciclos de luz-oscuridad por 3 días, luego transferidas a oscuridad constante y durante la transición del cuarto al quinto día en esta condición (OO4-OO5) se tomaron muestras cada 4 horas (CT14, 18 y 22 del OO4 y CT2, 6 y 10 del OO5) y se realizó inmunohistoquímica contra GFP para relevar el grado de ramificación de las terminales en cada tiempo. De acuerdo con lo previamente reportado por nuestro laboratorio, las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* presentaron su mayor grado de arborización al inicio del día subjetivo (CT2). Se cuantificaron más entrecruzamientos axonales totales a CT2 con respecto a CT14 y dicha diferencia resultó estadísticamente significativa (Figura 2.1 B). A lo largo del día

subjetivo los entrecruzamientos axonales fueron disminuyendo hasta alcanzar el bajo grado de ramificación a CT14. Durante la noche subjetiva la complejidad del árbol axonal se mantuvo baja y, sorprendentemente, disminuyó aun más hacia el final de la noche subjetiva (CT22). Al analizar con mayor detenimiento las imágenes de microscopía confocal a los distintos tiempos resultó evidente que la menor complejidad a CT22 tenía una base estructural diferente que la de CT14. Mientras que al inicio de la noche subjetiva (CT14) la mayoría de los circuitos sobrepasaron el quinto anillo concéntrico, a CT22 una gran cantidad apenas llegó al cuarto anillo (Figura 2.1 A).

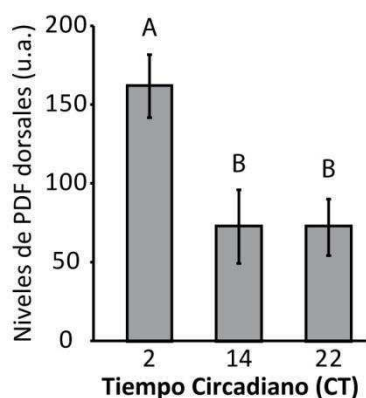
Para explorar esta posibilidad se midió el largo del circuito desde el punto de primera arborización y siguiendo las proyecciones axonales en el sentido medio hacia el lateral (Figura 2.1 C). Mientras que al inicio de la noche subjetiva (CT14) el largo del circuito no difería del largo al inicio del día subjetivo (CT2), a CT22 las terminales axonales eran significativamente más cortas (Figura 2.1 D). Estos resultados sugieren que durante el transcurso de la noche subjetiva se produciría retracción de neuritas principales, llevando al circuito a un mínimo de complejidad hacia CT22. Luego, durante las 4 horas que separan el final de la noche subjetiva y el inicio del siguiente día, la extensión de neuritas principales sumada a cambios generales en el grado de arborización de las terminales llevarían al circuito nuevamente a su máxima complejidad.

En conclusión, durante la transición noche-día las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* sufren cambios estructurales aun más groseros que los previamente reportados.

Por otra parte, se analizaron los niveles de PDF en las terminales a CT22 con el fin de estudiar si estos nuevos cambios estructurales se acompañan con una mayor reducción de los niveles de neuropéptido en la zona. Los niveles de PDF resultaron máximos a CT2 y mínimos durante la noche sin observarse una mayor reducción de los mismos hacia CT22 (Figura 2.2).



**Figura 2.1. Cambios morfológicos notables ocurren durante la transición noche-día.** **A.** Imágenes representativas tomadas durante la transición OO4-OO5 de moscas controlas (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU durante la adultez) a las que se les realizó inmunohistoquímica para detectar GFP. Se tomaron muestras a CT2, 6, 10, 14, 18 y 22 pero sólo se muestran imágenes representativas de los momentos de mayor diferencia estructural. Se destaca que a CT2 las proyecciones axonales fueron más complejas y extendidas, llegando al último anillo concéntrico, mientras que a CT22 el circuito resultó menos complejo y sólo llegó al cuarto anillo, indicando una configuración retraída. **B.** Cuantificación de los entrecruzamientos axonales totales a los tiempos CT2, 6, 10 (del OO5) y 14, 18 y 22 (del OO4). **C.** Esquema del método de cuantificación del largo total de las terminales. **D.** Cuantificación del largo total de las terminales axonales para cada tiempo circadiano. \* indica diferencias significativas con un  $p < 0,05$  (ANOVA de un factor con test *post-hoc* de Tukey).



**Figura 2.2. Los niveles de PDF en las terminales axonales no muestran mayor reducción a pesar de los cambios estructurales más groseros hacia el final de la noche.** El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de PDF en las terminales medidos por inmunohistoquímica durante CT2, 14 y 22. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$  (ANOVA de un Factor y test *post-hoc* de Tukey). U.a.: unidades arbitrarias.

## 2.2 Búsqueda de circuitos postsinápticos a las neuronas PDF

Como se comentó en el primer capítulo, la señal del marcador de zonas activas presinápticas Bruchpilot (BRP), oscila circadianamente en las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*, sugiriendo que el número de contactos sinápticos cambia a lo largo del día. Estos cambios podrían reforzar los contactos sinápticos con las mismas neuronas postsinápticas a lo largo del día, presentando más conexiones durante el día y menos durante la noche pero siempre entre los mismos pares de neuronas pre y postsinápticas. Alternativamente, a lo largo del día podrían estar cambiando las neuronas con las que se contactan las *s-LN<sub>v</sub>s* y, en líneas generales, presentar mayor conectividad durante la mañana y menor durante la noche. Decidimos entonces analizar esta segunda posibilidad realizando un relevamiento (a partir de ahora nombrado como *screen*) de putativas neuronas postsinápticas a lo largo del día por medio de la técnica de GRASP (*GFP Reconstitution Across Synaptic Partners*) (Feinberg *et al.*, 2008).

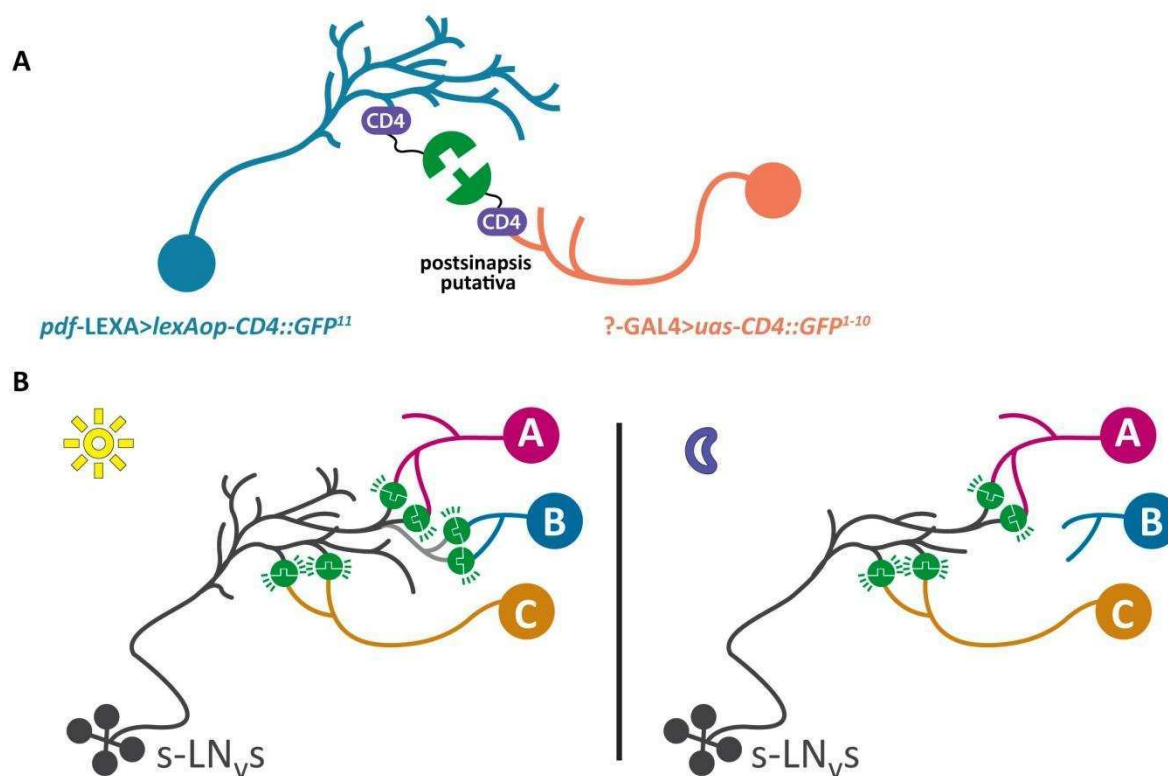
Las estrategias clásicas para elucidar la conectividad sináptica se basan en las técnicas de electrofisiología, microscopía electrónica y ultraestructura. Estos métodos si bien son extremadamente útiles y precisos, resultan muy complejos y, en particular, en el cerebro de *Drosophila* la electrofisiología conlleva grandes dificultades técnicas. Recientemente se desarrolló un ingenioso método para identificar compañeros sinápticos basado en la proximidad de las membranas plasmáticas pre y postsinápticas, que resulta más sencillo, rápido y económico puesto que utiliza microscopía óptica. Este método (GRASP por *GFP Reconstitution Across Synaptic Partners*) permite determinar la proximidad de neuronas que se encuentran a menos de 50 nm de distancia, sobrepasando así el límite de resolución del microscopio óptico<sup>14</sup>.

La técnica de GRASP se desarrolló primero en *C.elegans* (Feinberg *et al.*, 2008) y rápidamente se adaptó a *Drosophila* (Gordon & Scott, 2009). Básicamente, consiste en partir en 2 la molécula de GFP y expresar estas dos porciones que no emiten fluorescencia por sí solas en neuronas que uno quiere analizar si están conectadas sinápticamente. En *Drosophila*, la expresión diferencial se lleva a cabo por medio de dos sistemas de expresión heterólogos que no cruzan entre sí (GAL4-UAS y *lexA*-*lexAop*). Si las dos neuronas están conectadas sinápticamente, y teniendo en cuenta que el espacio sináptico es de menos de 50 nm, entonces la molécula de GFP se reconstituirá y emitirá fluorescencia

---

<sup>14</sup> La resolución del microscopio óptico está limitada por los *discos de Airy* que son una consecuencia de la difracción de la luz utilizada para incidir la muestra. En el mejor de los casos, la resolución óptica es de 200 nm (reducible hasta 100 nm en la microscopía de TIRF) mientras que el espacio sináptico es de unos 20-30 nm.

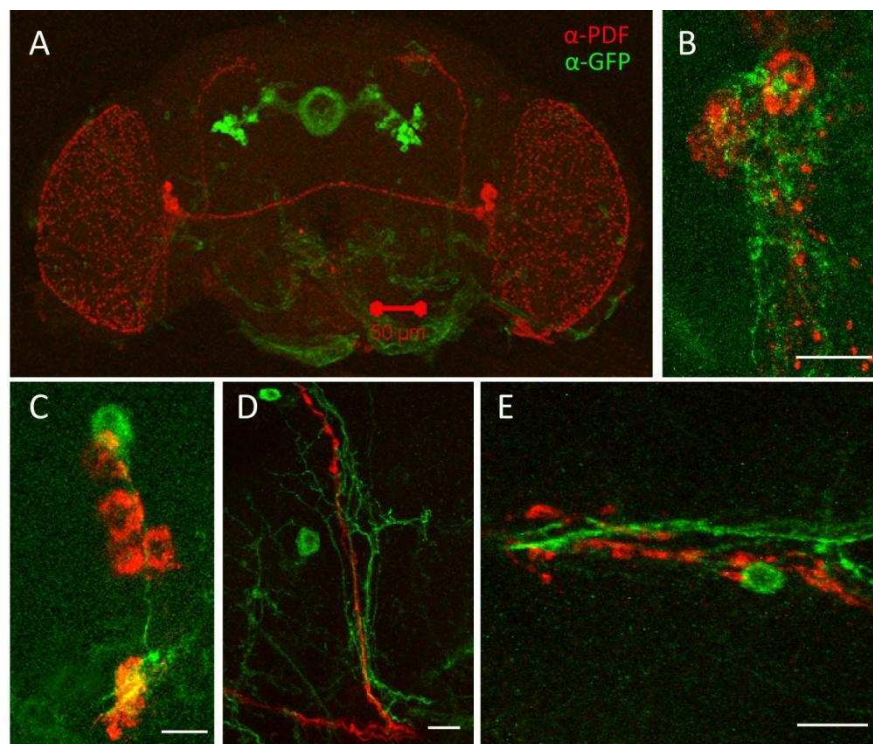
nuevamente. Por lo tanto, analizando la presencia de señal fluorescente uno tiene una idea de proximidad de neuronas lo cual da cuenta de posibles contactos sinápticos. Para identificar las neuronas que contactan a las *s-LN<sub>v</sub>s* se realizó un *screen* genético en donde se expresó un fragmento de GFP en el circuito PDF utilizando la línea *pdf-lexA* y el restante en un subgrupo de líneas que dirigen la expresión de GAL4 en distintos grupos neuronales (Figura 2.3). Las líneas GAL4 utilizadas constituyen un subgrupo de la colección de *enhancer trap* generadas por el laboratorio de la Dra. Ulrike Heberlein con quien se estableció una colaboración. Si nuestra hipótesis de cambio de conectividad a lo largo del día resultara válida, esperaríamos identificar en nuestro *screen* grupos neuronales distintos que contacten a las neuronas PDF específicamente en un momento del día y no en otro.



**Figura 2.3. Método de GRASP aplicado al estudio de la conectividad de neuronas PDF a lo largo del día.** **A.** Diagrama explicativo del método de GRASP. **B.** Esquema explicando la hipótesis de trabajo. Durante el día las *s-LN<sub>v</sub>s* se contactan con las neuronas postsinápticas prendidas con las líneas *enhancer trap* A, B y C por lo que se ve señal positiva de reconstitución utilizando las 3 líneas (**izquierda**). En cambio, durante la noche las *s-LN<sub>v</sub>s* se contactan con las líneas A y C pero, a causa de los cambios morfológicos de las terminales ya no contactan con la línea B y por eso sólo se ve señal de reconstitución con A y C (**derecha**).

La señal positiva de reconstitución no sólo se puede evidenciar por la recuperación de la fluorescencia de GFP sino también por la recuperación de la inmunoreactividad con anticuerpos anti-GFP específicos (Gordon & Scott, 2009). El poder utilizar anticuerpos anti-GFP que reconozcan sólo la molécula reconstituida permite aumentar la sensibilidad de la señal, reducir el fotoblanqueo y también realizar doble inmunohistoquímica con algún anticuerpo que posibilite visualizar toda la estructura de las neuronas (por ejemplo, el empleo del anticuerpo anti-PDF permite identificar las terminales de las *s-LN<sub>v</sub>s*).

En primera instancia se puso a punto las condiciones de la inmunohistoquímica para poder obtener una señal de reconstitución confiable y reproducible. Para ello, se empleó como control positivo los contactos sinápticos que se esperan entre el circuito PDF y el circuito que expresa su receptor (PDFR). Realizando una doble inmunohistoquímica anti-PDF y anti-GFP en moscas adultas *pdfr-GAL4>UAS-CD8GFP* se pudo evidenciar el patrón de expresión de la línea PDFR utilizada. Las neuronas que expresan el receptor arborizan sobre los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* y sobre el protocerebro dorsal (Figura 2.4).



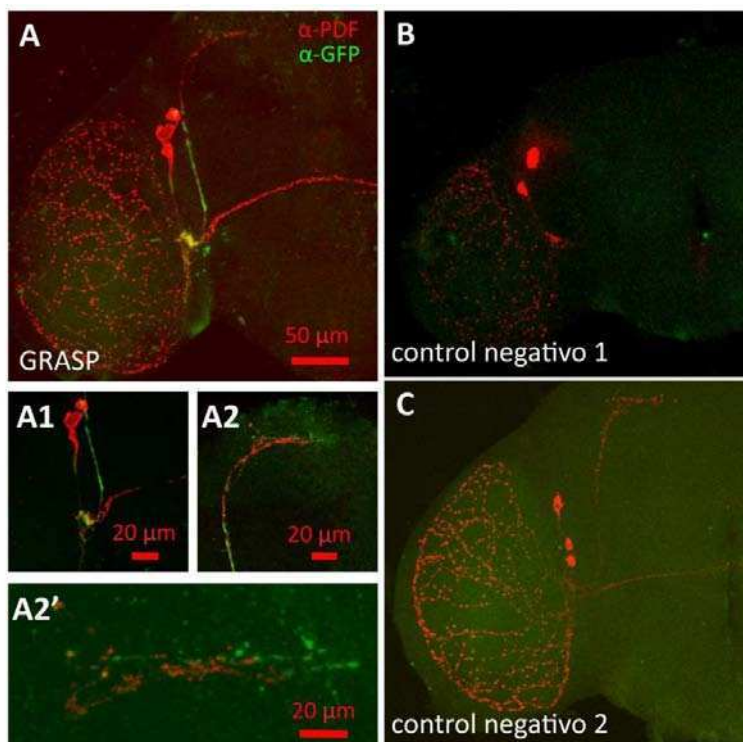
**Figura 2.4. Patrón de expresión de *pdfr* en moscas que expresan CD8GFP bajo la regulación de *pdfr-GAL4*.** A. Las neuronas que expresan el receptor presentan alta expresión en los cuerpos elipsoides (EB del inglés *Ellipsoid Bodies*) pero también arborizan sobre la médula accesoria cercano a los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* (B-C), y en un grupo neuronal que acompaña a las proyecciones dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* (D-E). B. Detalle de somas de *s-LN<sub>v</sub>s*. C. Detalle de somas de *l-LN<sub>v</sub>s* (arriba) y *s-LN<sub>v</sub>s* (abajo). D. Tracto ascendente de las proyecciones dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. E. Detalle de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Escala: 10 μm, salvo en el panel A que representa 50 μm (indicado en la figura).



En paralelo se probaron distintos anticuerpos anti-GFP en moscas controles negativos (aquellas que expresaban sólo el fragmento de GFP en las neuronas PDF, o el complementario en las neuronas PDFR) y en el control positivo de reconstitución (*pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*). Los resultados obtenidos para los distintos anticuerpos se detallan en la Tabla 2.1. Empleando el anticuerpo monoclonal de SIGMA pudo apreciarse una señal punteada y discreta en las cercanías de algunas somas, a lo largo de la proyección troncal hacia el protocerebro dorsal y con menor frecuencia en las terminales dorsales del circuito PDF de moscas *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* (Figura 2.5 A). Las líneas parentales (*pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* y *pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*) no mostraron señal asociada a GFP (Figura 2.5 B y C). Esta observación confirma los contactos sinápticos entre ambos circuitos y valida el uso de esta estrategia para la determinación de otros *targets* sinápticos del circuito PDF.

Anticuerpo	Especie	Genotipo	Dilución	¿Señal +?
Abcam	Conejo	<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup></i>	1:800	SÍ
		<i>pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		SÍ *
		<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		N.D.
Invitrogen	Conejo	<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup></i>	1:1000	SÍ
		<i>pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		SÍ *
		<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		N.D.
Upstate	Pollo	<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup></i>	1:500	NO
		<i>pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		SÍ
		<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		N.D.
Sigma	Hibridoma de ratón	<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup></i>	1:10	NO
		<i>pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		NO
		<i>pdf-LEXA&gt;lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4&gt;UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup></i>		SÍ

**Tabla 2.1. Puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica para obtener señal positiva de GRASP.** Se probaron 4 anticuerpos contra GFP en una condición de alta permeabilización (PT 0,6%) para asegurar la entrada del anticuerpo tanto en cerebros controles negativos (*pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* y *pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*) como en el positivo (*pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*). "Especie" se refiere a la especie en la que se generó el anticuerpo primario. El anticuerpo monoclonal de SIGMA (IgG1 de ratón) dio buena señal de reconstitución en el control positivo y nada de expresión detectable en los controles negativos. \*En esos casos se vio señal inespecífica en los lóbulos de los cuerpos pedunculados. N.D.: No determinado.



**Figura 2.5.** La técnica de GRASP permite evidenciar contactos sinápticos entre el circuito PDF y el que expresa su receptor. **A.** Imagen representativa de un cerebro *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* disectado por la mañana. La señal fluorescente de GFP se reconstituyó en los puntos de contacto entre ambos circuitos (cercano a los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* en la médula accesoria (**A1**) y sobre las proyecciones dorsales de las mismas (**A2** y **A2'**). **B.** Imagen representativa del control negativo *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>*. **C.** Imagen representativa del control negativo *pdfr-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*. Ambos controles negativos no presentaron señal de GFP.

Una vez puestas a punto las condiciones para analizar la señal de reconstitución de GRASP se seleccionaron las líneas GAL4 para realizar el *screen*. La colección del laboratorio de la Dra. Heberlein utilizada consiste en aproximadamente 500 líneas en donde un elemento transponible con la secuencia GAL4 se insertó al azar en el genoma de la mosca. Esta colección está depurada para líneas con expresión neuronal. El laboratorio de la Dra. Heberlein cuenta con una base de datos de imágenes obtenidas por microscopía confocal en donde se muestra el patrón de expresión de cada línea (por medio de la expresión de CD8GFP) en contexto de un marcador de neuropilos (Fasciclina 2). A través del análisis de dicha base de datos (que requirió una estadía corta en el laboratorio mencionado), se restringieron las líneas de interés a tan sólo 37 que presentaban expresión en regiones del cerebro próximas a las terminales dorsales de las neuronas PDF. Para confirmar que estas 37 líneas podrían constituir posibles postsinapsis de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* pero, a su vez, que dichos GAL4 no se expresaran en las neuronas PDF<sup>15</sup>, se repitió el análisis del patrón de expresión de cada línea pero esta vez realizando una tinción complementaria con anti-PDF. A continuación se

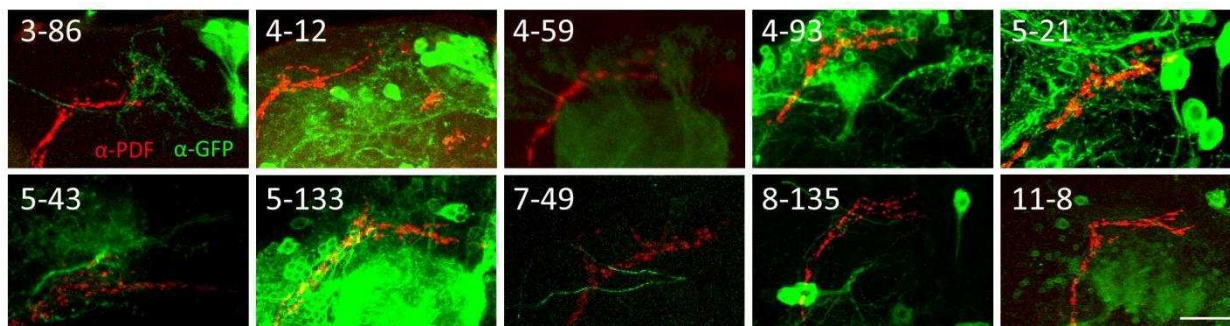
<sup>15</sup> Es muy importante confirmar que las líneas GAL4 a utilizar no se expresen en las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* dado que si así lo hicieran se obtendría reconstitución interna (por expresión de las dos porciones de GFP dentro de la misma célula) y daría entonces falsos positivos.

incluye un resumen del patrón de expresión de estas 37 líneas e imágenes representativas de las líneas que resultaron más interesantes (Tabla 2.2 y Figura 2.6). En líneas generales, líneas con expresión en el LH (*Lateral Horn* o asta lateral), cálices de los MB (*Mushroom Bodies* o cuerpos pedunculados) y PI (*Pars Intercerebralis*), donde se encuentran las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*, resultaron interesantes. La medula accesoria (M.Acc) es donde se encuentran los somas de las neuronas PDF por lo que líneas que se expresen ahí pueden llegar a constituir una presinapsis de las neuronas PDF. Para un esquema explicativo de las distintas regiones del cerebro de la mosca, ver ANEXO 2.

Línea	PDF	LO	MB	EB	AL	SOG	LM	LH	FSB	PI	CC	M.acc	DGIs
2-3		sí	sí										
2-14				sí	sí	sí	sí	sí					
2-16	sí		sí			sí	sí		sí	sí			
2-72	sí			sí		sí	sí	sí		sí		sí	
2-74		sí	sí		sí		sí			sí		sí	sí
3-15									sí	sí	sí		
3-22					sí	sí	sí			sí	sí		
3-60			sí		sí	sí			sí		sí		
3-69	sí		sí		sí	sí	sí	sí		sí			
3-86			sí					sí		sí	sí		
4-5			sí	sí	sí								
4-12			sí			sí	sí	sí		sí			
4-13				sí					sí				
4-29				sí	sí	sí	sí			sí			
4-59			sí	sí	sí	sí						sí	
4-67		sí		sí									
4-93		sí	sí		sí					sí		sí	
5-3		sí	sí		sí	sí	sí		sí	sí			
5-21				sí	sí	sí	sí			sí	sí	sí	
5-30				sí	sí		sí		sí	sí			
5-43					sí	sí		sí			sí	sí	
5-69			sí	sí	sí	sí	sí			sí			
5-115					sí	sí	sí			sí			
5-133		sí	sí	sí	sí	sí			sí	sí		sí	
5-138		sí							sí		sí		
6-32			sí		sí	sí	sí			sí			

6-46	sí			sí	sí			sí	
7-35			sí	sí	sí			sí	
7-49			sí	sí		sí	sí		sí
7-86	sí								
8-135				sí	sí	sí		sí	sí
8-166			sí	sí	sí			sí	sí
9-41	sí			sí					
9-105	sí	sí	sí	sí		sí		sí	
10-125	sí	sí	sí	sí	sí			sí	sí
11-8	sí	sí		sí	sí		sí	sí	sí
11-97	sí			sí					

**Tabla 2.2. Patrón de expresión de las líneas GAL4 utilizadas en el *screen* de GRASP.** PDF, implica expresión en las neuronas PDF<sup>+</sup>, MB, *Mushroom Bodies* (cuerpos pedunculados), EB, *Ellipsoil Bodies*, AL, *Antennal Lobes*, SOG, ganglio subesofágico, LM, línea media, LH, *lateral horn* (asta lateral), FSB, *Fan Shaped Bodies*, PI, *Pars Intercerebrallis*, CC, *Central Complex*, M.Acc, *Medula Accesoria* y DGI, *Dorsal Giant Neurons*.



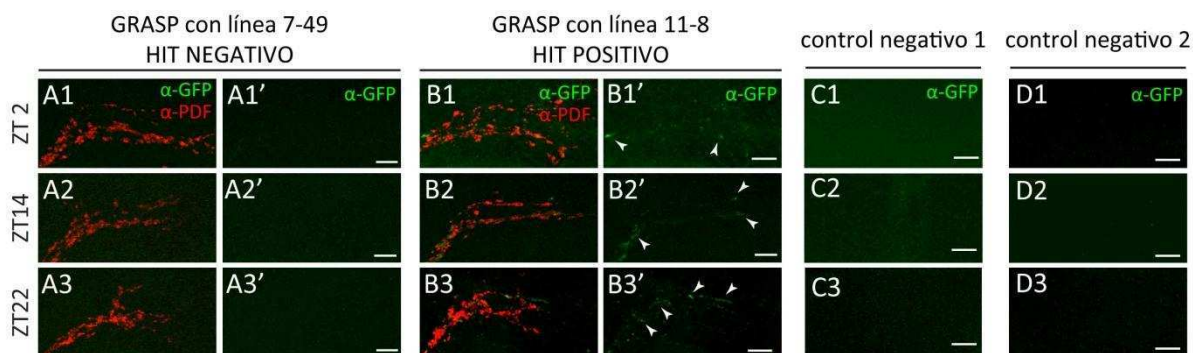
**Figura 2.6. Imágenes representativas del patrón de expresión en el protocerebro dorsal de las líneas GAL4 más interesantes.** Imágenes de cerebros *X-GAL4>CD8GFP* y teñidos contra PDF y contra GFP. Las líneas presentaron expresión en otras regiones (ver Tabla 2.2) pero sólo se muestra la señal a nivel de las terminales axonales de las *s-LN<sub>s</sub>* para simplificar. Escala: 10  $\mu$ m.

### 2.3 Las neuronas PDF contactan distintos grupos neuronales a lo largo del día.

Para simplificar el *screen*, se estudiaron los contactos sinápticos del circuito PDF en condiciones de sincronización por ciclos de LO durante los 3 momentos del día en donde la estructura del circuito presenta cambios más groseros, es decir, al inicio del día (ZT2) y al inicio y final de la noche (ZT14 y

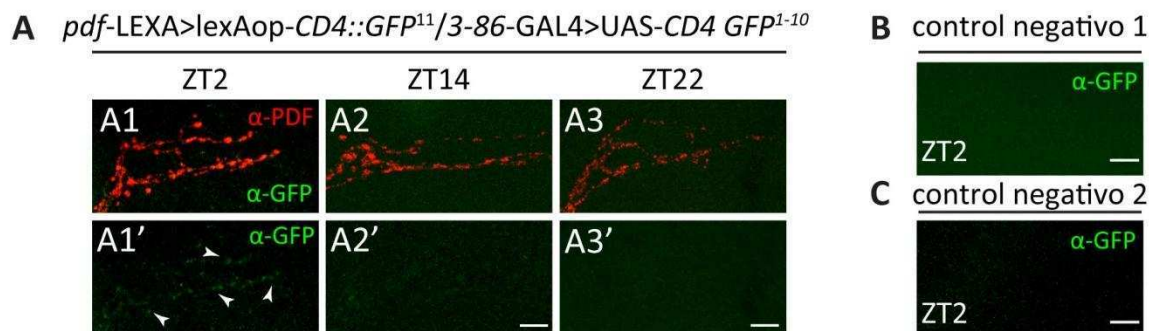
ZT22 respectivamente). A su vez, dada lo laborioso del *screen* en una primera tanda se restringió el análisis a las 10 líneas que presentaban un patrón de expresión más interesante (Figura 2.6).

En estas primeras 10 líneas analizadas el 20% no mostró señal de reconstitución en ninguno de los momentos del día analizados (Figura 2.7A y Tabla 2.3) mientras que un 50% presentó señal positiva tanto a ZT2, como a ZT14 y ZT22 (Figura 2.7B y Tabla 2.3). En los casos en dando se observó reconstitución a todos los ZT analizados, las líneas parentales que expresaban una sola de las partes de GFP no mostraron señal positiva en ninguno de los cerebros, sugiriendo que las membranas de ambas neuronas se encuentran efectivamente próximas constituyendo posiblemente un contacto sináptico estable (Figura 2.7 C y D).



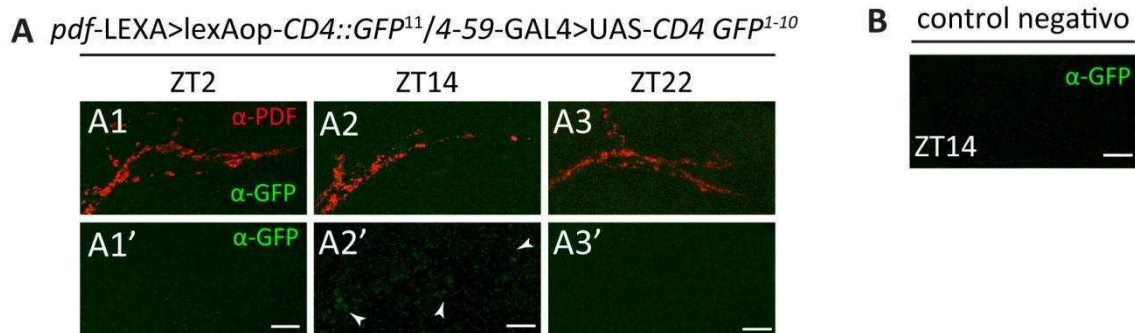
**Figura 2.7. Imágenes representativas de un hit negativo (7-49) y uno positivo (11-8) del *screen* de GRASP.** Para el análisis del GRASP se muestra la imagen de anti-PDF (rojo) y anti-GFP juntas en el panel de la izquierda y la señal de anti-GFP sola en el panel de la derecha, mientras que para los controles negativos sólo se muestra la señal anti-GFP para simplificar la figura. **A.** Imágenes representativas de cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/7-49-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* disectados a ZT2 (**A1**, **1'**), ZT14 (**A2**, **2'**) y ZT22 (**A3**, **3'**). Se destaca la ausencia de señal de reconstitución para todos los tiempos analizados. **B.** Ídem A pero para cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/11-8-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*. En este caso se observó señal de reconstitución (señalada con las puntas de flecha) a todos los ZT analizados. **C.** Imagen representativa del control negativo *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* disectados a ZT2 (**C1**), ZT14 (**C2**) y ZT22 (**C3**). **D.** Imagen representativa del control negativo *11-8-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* disectados a ZT2 (**D1**), ZT14 (**D2**) y ZT22 (**D3**). Ambos controles negativos no presentaron señal de GFP.

Del total analizado se destacan 3 líneas que presentaron señal positiva de GRASP restringida a un momento del día particular (Tabla 2.3). De estos casos, la línea 3-86 mostró señal positiva de GRASP a ZT2 (12 cerebros con señal positiva de 18 analizados) pero no durante la noche (0 cerebros con señal positiva de 17 analizados a ZT14, y 0 cerebros con señal positiva de 16 analizados a ZT22), mientras que los controles parentales no presentaron señal positiva (Figura 2.8). Asimismo, la línea 8-135 presentó señal de reconstitución a ZT2 (13 de 15) y ZT14 (9 de 10) pero no a ZT22 (2 de 15).



**Figura 2.8.** La línea 3.86 contacta a las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* durante el día pero no durante la noche. **A.** Imágenes representativas de cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/3-86-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* disectados a ZT2, ZT14 y ZT22 y teñidos contra PDF y contra GFP. Se observó señal de GFP a ZT2 en la mayoría de los cerebros analizados (señalado con las puntas de flecha) pero no a ZT14 ni ZT22. **B.** Imagen representativa del control negativo *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>* disectado a ZT2. **C.** Ídem B pero para el control negativo *3-86-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*. Mientras a ZT2 se observó señal de GFP en cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/3-86-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* las líneas parentales no mostraron señal positiva. Escala: 10  $\mu$ m.

Encontrar neuronas que presumiblemente contacten a las *s-LN<sub>v</sub>s* específicamente a la mañana resulta consistente con el hecho de que el número de contactos sinápticos (medidos con el marcador de zonas activas BRP) sea mayor durante el día y menor durante la noche. Sorprendentemente, la línea 4-59 mostró un perfil opuesto; mientras que a ZT2 y a ZT22 ningún cerebro mostró señal de reconstitución, al inicio de la noche (ZT14) un 70% presentó señal positiva de GRASP (11 de 16 cerebros analizados) (Figura 2.9). Estos resultados sugieren que a pesar del menor nivel de conectividad general que presentan las *s-LN<sub>v</sub>s* durante la noche, existirían algunas neuronas postsinápticas que se contactarían específicamente al inicio de la noche subjetiva.



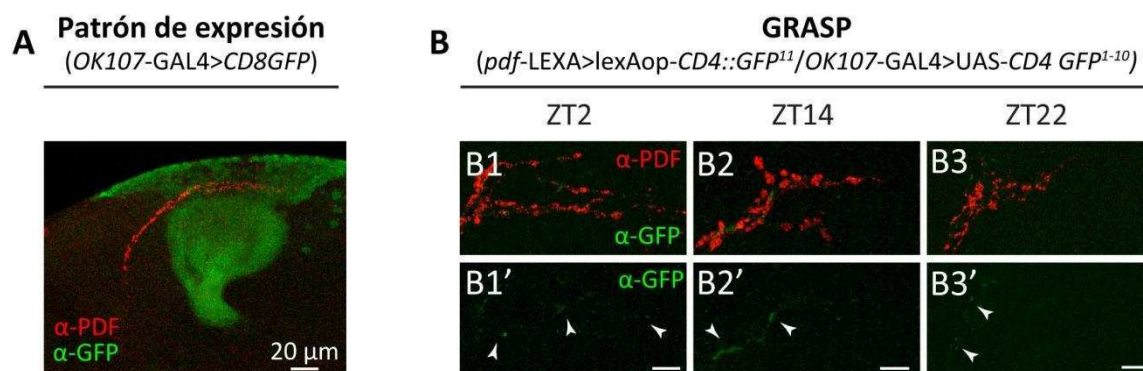
**Figura 2.9.** La línea 4-59 contacta a las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* específicamente durante el inicio de la noche. **A.** Imágenes representativas de cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/4-59-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* disectados a ZT2, ZT14 y ZT22 y teñidos contra PDF y contra GFP. Se observó señal de GFP a ZT14 en un 70% de los cerebros analizados (señalado con las puntas de flecha) pero no a ZT2 ni ZT22. **B.** Imágenes representativas del control negativo *4-59-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>*. Mientras a ZT14 se observó señal de GFP en cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/4-59-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* las líneas parentales no mostraron señal positiva. Escala: 10  $\mu$ m.

Línea	Frecuencias relativas (% de cerebro con señal positiva en GRASP)			Resultado
	ZT2	ZT14	ZT22	
3-86	67%	0%	0%	señal específica a ZT2
4-12	60%	70%	78%	señal a todos los ZT analizados
4-59	16%	69%	11%	señal específica a ZT14
4-93	90%	87%	90%	señal a todos los ZT analizados
5-21	100%	N.D.	100%	señal a todos los ZT analizados
5-43	0%	N.D.	20%	No hay señal en ninguno de los ZT analizados
5-133	94%	93%	94%	señal a todos los ZT analizados
7-49	6%	12%	6%	No hay señal en ninguno de los ZT analizados
8-135	87%	90%	13%	señal específica a ZT2 y ZT14
11-8	92%	93%	86%	señal a todos los ZT analizados

**Tabla 2.3.** Resumen de los resultados obtenidos en la primer tanda del *screen* de GRASP. Para cada ZT se analizó un promedio de 15 cerebros. Se consideró señal positiva en un momento del día si más de la mitad de los cerebros analizados presentaban señal de reconstitución. N.D.: no determinado.

La línea 4-59 presenta altos niveles de expresión en un subgrupo de neuronas de los cuerpos pedunculados, estructura de integración multimodal asociada con la formación de memoria. De modo interesante la formación de memoria a corto término es más eficiente a ZT13-17 (Lyons & Roman, 2009) coincidiendo con el tiempo en el que la línea 4-59 presentó señal positiva de reconstitución. Para confirmar si los cuerpos pedunculados se contactan con las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* se

utilizó una línea ampliamente caracterizada por su patrón de expresión en los cuerpos pedunculados (OK107 GAL4) y se analizó la presencia de señal positiva de GRASP en los momentos del día mencionados. Si bien la señal de reconstitución resultó más evidente a ZT14, moscas *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/OK107-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* mostraron señal positiva de GFP a todos los ZT analizados (Figura 2.10). Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos con la línea 4-59 sugieren que si bien en general los cuerpos pedunculados contactarían a las *s-LN<sub>s</sub>* a lo largo de todo el día existiría un subgrupo de neuronas dentro de dicho neuropilo que contactarían específicamente durante el inicio de la noche y éstas estarían incluidas dentro de las expresadas en la línea 4-59.



**Figura 2.10. La línea OK107 muestra señal de reconstitución en todos los tiempos analizados.** **A.** Patrón de expresión de la línea OK107 a la altura de las proyecciones axonales de las *s-LN<sub>s</sub>*. En esa zona la línea tiene expresión restringida a los cálices de los cuerpos pedunculados. **B.** Imágenes representativas de cerebros *pdf-LEXA>lexAop-CD4::GFP<sup>11</sup>/OK107-GAL4>UAS-CD4 GFP<sup>1-10</sup>* disectados a ZT2, ZT14 y ZT22 y teñidos contra PDF y contra GFP. La señal de reconstitución resultó más evidente a ZT14 (**B2'**) aunque se observó señal positiva (señalada con las puntas de flecha) a todos los ZT analizados. Escala: 10 μm, salvo en el panel A que representa 20 μm (indicado en la figura).

En conclusión los resultados del *screen* por GRASP sugieren fuertemente que las neuronas *s-LN<sub>s</sub>* serían capaces de cambiar sus compañeros sinápticos a lo largo del día, apoyando así nuestra hipótesis inicial. Estudios complementarios son necesarios para confirmar que las sinapsis entre las *s-LN<sub>s</sub>* y los grupos neuronales identificados en el *screen* sean funcionales.



## CAPITULO 3 Mecanismos moleculares subyacentes a la plasticidad estructural de las neuronas PDF

En este tercer capítulo nos propusimos analizar los mecanismos moleculares responsables de la plasticidad estructural de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Entender los fenómenos celulares que subyacen a dicho remodelamiento nos permitió interrumpir el fenómeno y así analizar su contribución real al control de la ritmicidad comportamental. Particularmente, estudiamos la contribución de las metaloproteasas de matriz (MMPs) y de moléculas implicadas en fasciculación axonal y extensión y retracción de neuritas que trabajan junto a las MMPs durante el desarrollo del sistema nervioso.

## 3.1 Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son reguladores claves de la plasticidad estructural

Las oscilaciones en el grado de ramificación de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* puede deberse a cambios en el grado de fasciculación/defasciculación de axones mediada por moléculas de adhesión o al remodelamiento de las terminales axonales por medio del crecimiento y remoción de neuritas (*sprouting/pruning*), o a una combinación de ambos procesos. De hecho, resultados preliminares en donde se realizó un seguimiento del remodelamiento en cultivos de cerebros *ex vivo* sugieren tanto cambios en la fasciculación axonal como en el número de neuritas a lo largo del día (observaciones del Lic. EA Gorostiza). En esta tesis, decidimos analizar la contribución de ambos procesos celulares así como estudiar el rol de moléculas específicas en el fenómeno de plasticidad estructural por medio de la desregulación de la expresión génica específicamente en las neuronas PDF, y luego analizar el grado de ramificación de los circuitos durante la mañana y la noche. Para simplificar el análisis nos enfocamos solamente en los cambios que ocurren entre el principio del día (CT2) y de la noche subjetiva (CT14). Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre durante el día, durante la noche los circuitos modifican la longitud máxima de las proyecciones axonales por lo que es esperable que diferentes procesos celulares sean reclutados en distintos momentos del día.

Tomando en consideración que el remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>v</sub>s* ocurre diariamente nos enfocamos en moléculas implicadas en plasticidad neuronal pero que a la vez estuvieran conectadas con el reloj circadiano. En ese sentido las metaloproteasas de matriz (MMPs) resultaron candidatos muy interesantes puesto que han sido asociadas a fenómenos de plasticidad neuronal en diversos sistemas (Dziembowska & Wlodarczyk, 2012; Kuo *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2008; Siller & Broadie, 2011; Yasunaga *et al.*, 2010) y, en *Drosophila*, su expresión está modulada circadianamente (Kadener *et al.*, 2007; Kula-Eversole *et al.*, 2010; Nagoshi *et al.*, 2010).

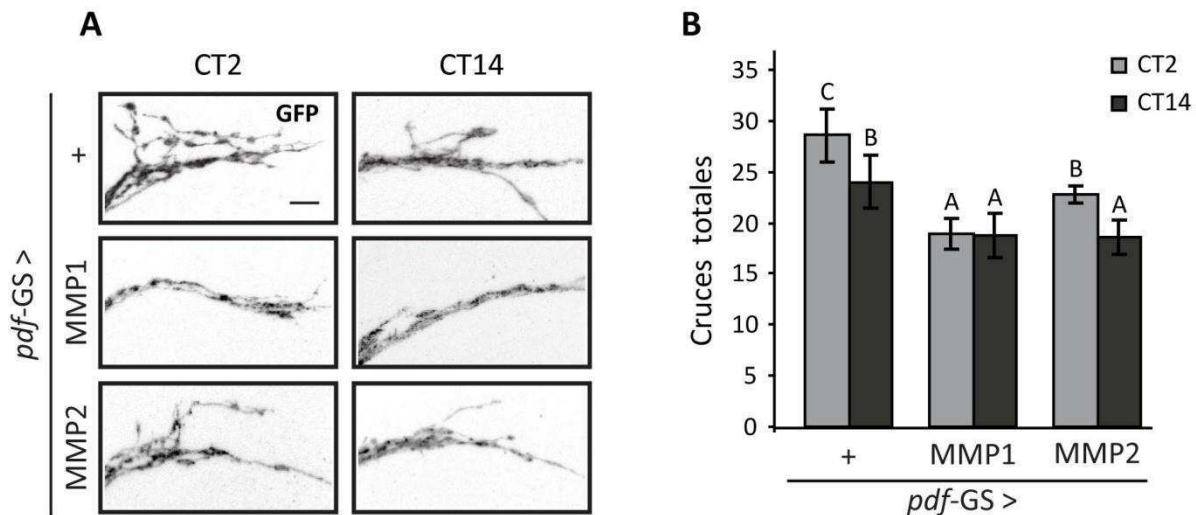
Mientras que en humanos las MMPs constituyen una extensa familia con 23 miembros, en *Drosophila* sólo existen dos, MMP1 y MMP2. Ambas MMPs están implicadas en diversos procesos que van desde el remodelamiento de tejidos durante el desarrollo (Page-McCaw *et al.*, 2003), capacidad invasiva de tumores (Beaucher *et al.*, 2007), guiado axonal (Miller *et al.*, 2011), fasciculación axonal (Miller *et al.*, 2008) y remodelamiento dendrítico (Kuo *et al.*, 2005). En cuanto a la conexión con el sistema circadiano, la expresión de MMP1 está regulada directamente por CLOCK (Kadener *et al.*, 2007). A su vez, MMP1, MMP2 y TIMP, el inhibidor común de ambas MMPs, se expresan en las *s-LN<sub>v</sub>s* y la expresión de MMP1 estaría enriquecida durante el inicio de la noche (Kula-Eversole *et al.*, 2010; Nagoshi *et al.*, 2010).

Por los motivos detallados en el párrafo anterior, decidimos analizar una posible contribución tanto de MMP1 como MMP2 al fenómeno de plasticidad estructural de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. La estrategia consistió en alterar la expresión génica de MMP1 o MMP2 (tanto por sobreexpresión como por silenciamiento de la expresión) específicamente en las neuronas PDF y luego analizar el efecto sobre el grado de ramificación a nivel de las proyecciones dorsales durante el cuarto día en ausencia de claves ambientales (OO4) en dos momentos del día, CT2 y CT14. A su vez, dado que ambas MMPs tienen funciones en el desarrollo de circuitos neuronales, se restringió la desregulación sólo al periodo adulto utilizando la línea *pdf-GS* para así evitar cualquier defecto estructural debido a su función en el desarrollo.

Para el análisis por sobreexpresión se utilizaron dos líneas que permitían la sobreexpresión de MMP1 (UAS-*MMP1* del cromosoma 2 y UAS-*MMP1* del cromosoma 3) y dos para MMP2 (UAS-*MMP2* del cromosoma 2 y UAS-*MMP2* del cromosoma 3) previamente caracterizadas (Page-McCaw *et al.*, 2003). Moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU durante la adultez) mostraron una mayor arborización durante el inicio del día subjetivo y un menor grado durante el inicio de la noche subjetiva. Por el contrario, la sobreexpresión tanto de MMP1 como MMP2 en las neuronas PDF abolió los cambios estructurales circadianos de las proyecciones dorsales, llevando a terminales axonales con una menor complejidad constante a lo largo del día. En el caso de la sobreexpresión de MMP1 para ambas líneas utilizadas se observó una drástica reducción de la complejidad de las ramificaciones axonales a niveles aun menores que los de la noche en el control, y dicha complejidad no osciló a lo largo del día. En el caso de MMP2 ambas líneas utilizadas dieron como resultado una reducción de la complejidad aunque la sobreexpresión con la línea del cromosoma 3 mostró circuitos

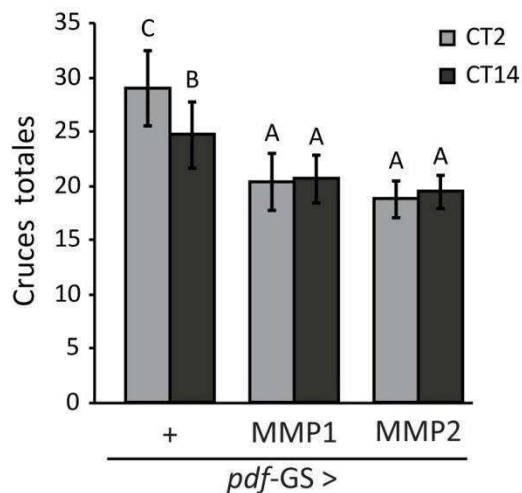
cuya complejidad cambiaba a lo largo del día, mientras que la sobreexpresión con la línea del cromosoma 2 llevó al detenimiento de las oscilaciones (Figuras 3.1 y 3.2).

### Sobreexpresión líneas cromosoma 3



**Figura 3.1.** La sobreexpresión de MMP1 o MMP2 con las líneas del cromosoma 3 conduce a una reducción de la complejidad aunque en el caso de MMP2 se sigue viendo oscilación circadiana. **A.** Imágenes de confocal representativas de cerebros controles (*pdf-GS>CD8GFP*) o que sobreexpresan MMP1 (*pdf-GS>CD8GFP;MMP1*) o MMP2 (*pdf-GS>CD8GFP;MMP2*) teñidos con anti-GFP durante OO4 a CT2 y CT14. Escala: 10  $\mu$ m. **B.** Cuantificación del número total de entrecruzamientos entre las proyecciones axonales y los círculos concéntricos. Los datos representan la media de entre 4-7 experimentos independientes y un mínimo de 33 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan).

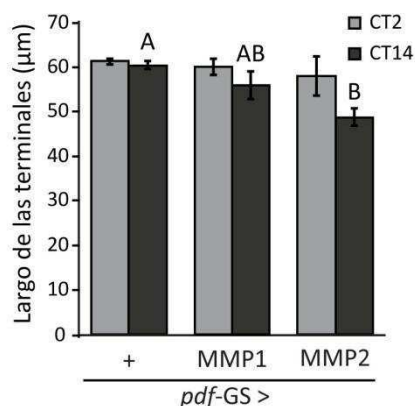
### Sobreexpresión líneas cromosoma 2



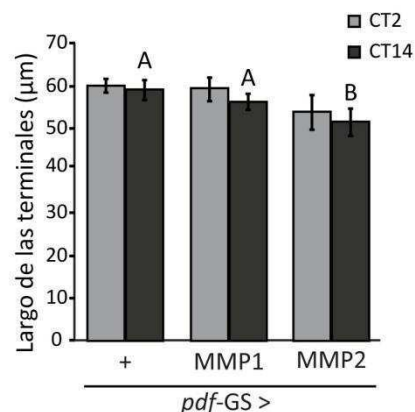
**Figura 3.2.** La sobreexpresión de MMP1 o MMP2 con las líneas del cromosoma 2 detiene las oscilaciones estructurales diarias y conduce a una reducción de la complejidad. Cuantificación del número total de entrecruzamientos entre las proyecciones axonales y los círculos concéntricos para cerebros controles (*pdf-GS>CD8GFP*) o provenientes de moscas que sobreexpresan MMP1 (*pdf-GS>CD8GFP/MMP1*) o MMP2 (*pdf-GS>CD8GFP/MMP2*). Los datos representan la media de entre 4-5 experimentos independientes y un mínimo de 33 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan).

Con el fin de analizar si esta menor complejidad en las terminales generadas por la sobreexpresión de MMPs se debe a una retracción general se midió el largo total de las proyecciones axonales en los mismos genotipos y condiciones anteriormente mencionadas. La sobreexpresión de MMP1 no afectó el largo total (Figura 3.3) mientras que redujo la complejidad de las arborizaciones a lo largo de toda la (Figura 3.4). Se observaron los mismos resultados con las dos líneas utilizadas. Por el contrario, la sobreexpresión de MMP2 redujo significativamente el largo axonal total de las terminales, sugiriendo que MMP2 podría promover la retracción de neuritas principales. (Figura 3.3).

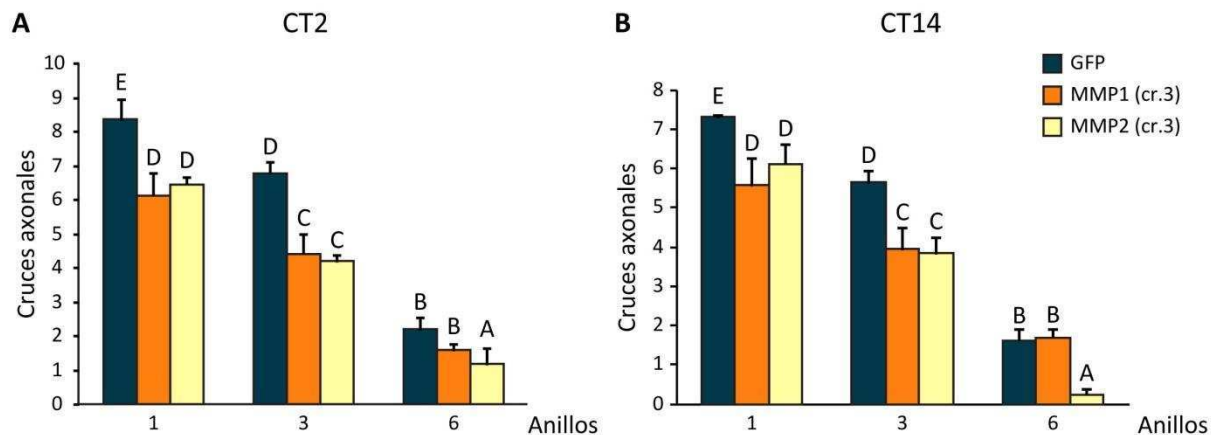
**A** Sobreexpresión líneas cromosoma 3



**B** Sobreexpresión líneas cromosoma 2



**Figura 3.3. La sobreexpresión de MMP2 pero no la de MMP1 altera el largo de neuritas principales. A.** Cuantificación del largo total de las terminales axonales utilizando las líneas del cromosoma 3 para la sobreexpresión. El efecto de MMP2 es más claro a CT14. **B.** Ídem A pero para las líneas del cromosoma 2. Los datos representan la media de entre 4-7 experimentos independientes y un mínimo de 33 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos en general ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan. La interacción Genotipo x CT resultó no significativa y el análisis de componentes principales arrojó diferencias significativas entre genotipos pero no entre CT).

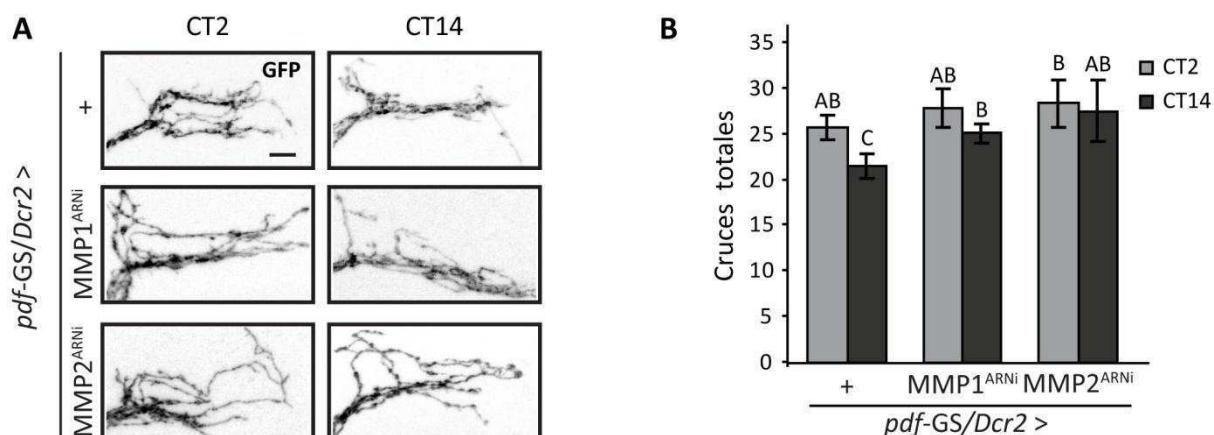


**Figura 3.4. La complejidad de las arborizaciones axonales es consistentemente menor en animales que sobreexpresan MMP1 o MMP2.** A. Número de entrecruzamientos para los anillos 1, 3 y 6 de moscas controles o que sobreexpresan MMP1 o MMP2 disectadas durante la mañana (CT2). B. Ídem A pero disectadas a CT14. Se consideraron sólo estos 3 anillos y se grafica por separado los datos a CT2 y CT14 para simplificar la figura. Los datos corresponden a la sobreexpresión con las líneas del cromosoma 3. Se encontraron diferencias significativas entre CT (no indicado en la figura). Dentro de cada gráfico, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  ANOVA con medidas repetidas y test *post-hoc* de Tukey. Los distintos anillos constituyen medidas repetidas en el espacio).

Los experimentos de sobreexpresión son útiles a la hora de analizar la capacidad de determinadas moléculas de alterar procesos biológicos específicos pero deben ser analizados con precaución puesto que la sobreexpresión en altos niveles y en un patrón potencialmente ectópico podría no reflejar el rol fisiológico de la molécula de interés. Por dicha razón, profundizamos el análisis disminuyendo los niveles de expresión de MMP1 o MMP2 en las neuronas PDF, exclusivamente en el periodo adulto, por medio de líneas de ARN de interferencia (ARNi) específicas. Se utilizaron líneas de ARNi contra MMP1 (MMP1<sup>ARNi</sup>) y contra (MMP2<sup>ARNi</sup>) del centro repositorio de stocks de Viena (VDRC). Estas líneas generalmente requieren de la sobreexpresión de uno de los componentes esenciales de la maquinaria de silenciamiento (particularmente DICER2) para producir un silenciamiento significativo de la expresión del gen, por lo que conjuntamente a las líneas de ARNi se sobreexpresó *dicer2* (nombrado a partir de ahora como *Dcr2*) en el circuito PDF<sup>16</sup>. La co-expresión de DICER2 aseguró la correcta reducción de los niveles de MMP1 y MMP2 respectivamente ya que la expresión de los ARNi en todo el animal (en contexto de la línea *actina-GAL4*) generó letalidad como se ha reportado previamente para los mutantes nulos de estos genes (datos no mostrados) (Page-McCaw *et al.*, 2003).

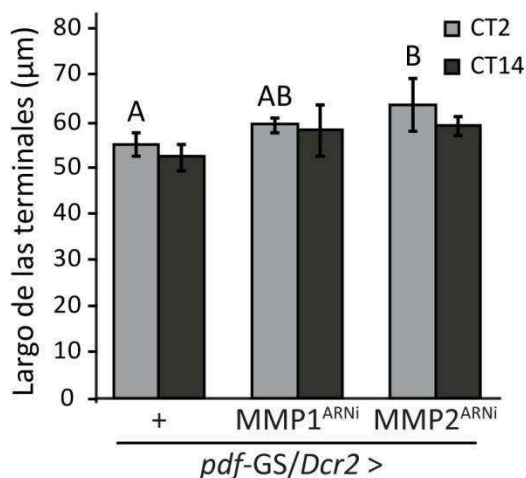
<sup>16</sup> Para una explicación detallada de la estrategia de silenciamiento por ARNi referirse al ANEXO 3.

Moscas controles (*pdf-GS>CD8GFP;Dcr2*) mostraron una oscilación normal de la complejidad estructural, demostrando que la sobreexpresión de la maquinaria de silenciamiento no genera un defecto *per se* en la plasticidad estructural de las neuronas PDF. Por el contrario, moscas que sobreexpresaban un ARNi contra MMP1 (*pdf-GS>CD8GFP/MMP1<sup>ARNi</sup>;Dcr2*) o contra MMP2 (*pdf-GS>CD8GFP/MMP2<sup>ARNi</sup>;Dcr2*) no presentaron plasticidad estructural circadiana, mostrando un grado de complejidad de las terminales axonales similares al de la configuración de mañana pero a lo largo de todo el día (Figura 3.5).



**Figura 3.5. La bajada de expresión de MMP1 o MMP2 en las neuronas PDF fija la complejidad en la configuración de la mañana.** **A.** Imágenes de confocal representativas de cerebros controles (*pdf-GS> +*) o que sobreexpresan un ARNi contra MMP1 (*pdf-GS> MMP1<sup>ARNi</sup>*) o contra MMP2 (*pdf-GS> MMP2<sup>ARNi</sup>*) teñidos con anti-GFP durante OO4 a CT2 y CT14. En todos los casos se sobreexpresó CD8GFP para poder evidenciar la estructura del circuito y DICER2 para asegurar el buen funcionamiento de la maquinaria de silenciamiento. Escala: 10  $\mu$ m. **B.** Cuantificación del número total de entrecruzamientos. Los datos representan la media de entre 4-5 experimentos independientes y un mínimo de 27 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan).

A su vez, el silenciamiento de MMP2 pero no el de MMP1 aumentó de manera significativa el largo de las neuritas principales (Figura 3.6). Las diferencias entre MMP1 y MMP2 respecto a los efectos sobre el largo del circuito, tanto para la sobreexpresión como para el silenciamiento, sugieren que, si bien ambas MMPs serían moduladoras del remodelamiento axonal diario de las neuronas PDF, los mecanismos reclutados no serían los mismos. En el caso de MMP1 no habría retracción de neuritas principales sino un cambio en la complejidad de la arborización a lo largo de toda la terminal, mientras que en el caso de MMP2 la retracción sería responsable de al menos una parte del fenotipo.



**Figura 3.6. La bajada de función de MMP2 pero no de MMP1 altera el largo de las neuritas principales.** Cuantificación del largo total de las terminales axonales en moscas controles y aquellas que sobreexpresan un ARNi contra MMP1 o contra MMP2. El efecto de MMP2 es más claro a CT2. Los datos representan la media de entre 4-5 experimentos independientes y un mínimo de 27 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos en general ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan. La interacción Genotipo x CT resultó no significativa y el análisis de componentes principales arrojó diferencias significativas entre genotipos pero no entre CT).

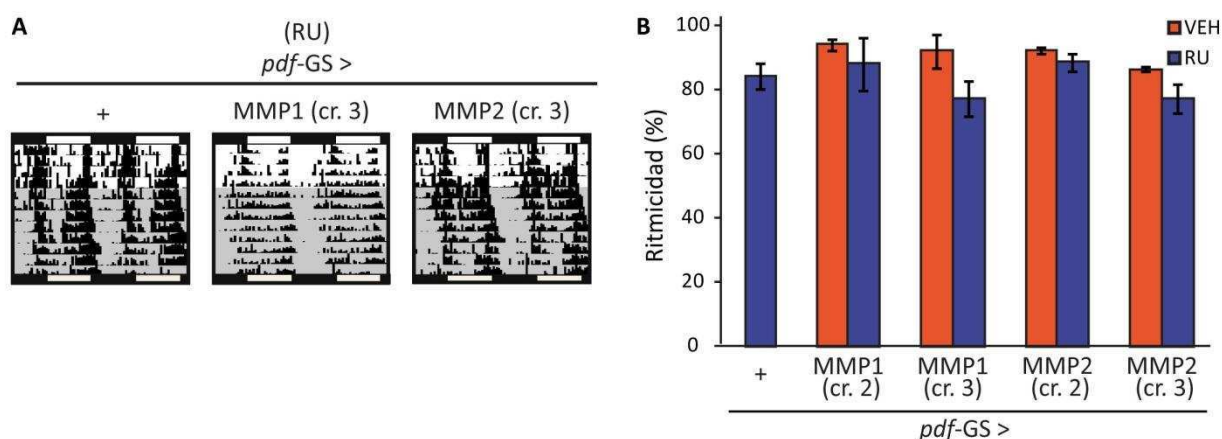
En conclusión, los experimentos de sobreexpresión y bajada de función demuestran que ambas metaloproteasas, MMP1 y MMP2, son actores claves en la determinación circadiana de la complejidad de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Los resultados obtenidos sugieren que altos niveles de MMPs promueven una arborización menos compleja, como la observada durante la noche subjetiva, mientras que bajos niveles de MMPs promueven una arborización más compleja.

### 3.2 MMP1 pero no MMP2 afecta la ritmicidad comportamental

El hecho de contar con manipulaciones genéticas que interrumpieran el remodelamiento axonal circadiano de las *s-LN<sub>v</sub>s* (como la sobreexpresión o bajada de función de MMP1 o MMP2 en el circuito PDF), nos permitió analizar la relevancia de dicha plasticidad en el control del comportamiento locomotor rítmico. Para ello se registró el patrón de actividad locomotora de moscas controles, moscas que sobreexpresaban MMP1 o MMP2, o moscas que sobreexpresaban un ARNi dirigido contra MMP1 o contra MMP2, durante 3 días en ciclos de luz-oscuridad y luego 10 días más en oscuridad constante. Para todos los casos, la inducción con RU se realizó en machos de entre 2 y 5 días de edad. Se presentan primero los resultados obtenidos con la sobreexpresión y luego para la interferencia.

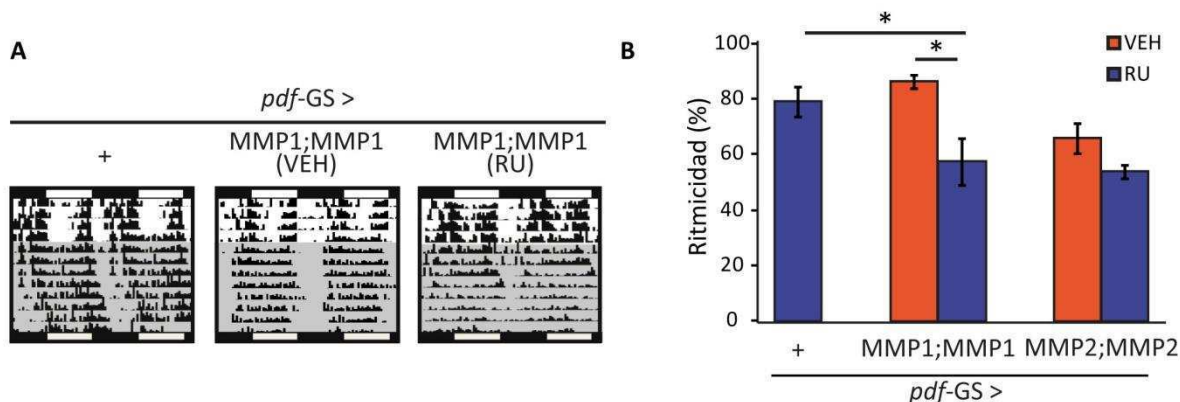
Tanto los controles genéticos (*pdf-GS>CD8GFP*, *UAS-MMP1/+* y *UAS-MMP2/+*) como los controles sin inducir (*pdf-GS>MMP1* y *pdf-GS>MMP2* mantenidos en vehículo) presentaron un patrón locomotor claramente rítmico en la fase de oscuridad constante, con una ritmicidad poblacional de

alrededor del 90% y un periodo endógeno cercano a las 24 horas en todos los casos. Llamativamente, la sobreexpresión con una sola copia de MMP1 o MMP2 no alteró la ritmicidad comportamental, si bien fue suficiente para afectar la plasticidad estructural. La sobreexpresión de MMP1 tanto con la línea del cromosoma 3 como la del 2 resultó en moscas con alta ritmicidad poblacional y un periodo endógeno similar a los controles. Lo mismo ocurrió con la sobreexpresión de MMP2 utilizando cualquiera de las 2 líneas UAS disponibles (Figura 3.7 y Tabla 3.1). Sin embargo, al aumentar la cantidad de MMP1 sobreexpresado, combinando las 2 líneas UAS disponibles, se produjo una pequeña pero significativa reducción de la ritmicidad poblacional. En el caso de MMP2 aumentar la dosis de UAS generó también una desconsolidación de la actividad locomotora pero, por un motivo desconocido (probablemente asociado a expresión basal por los sitios de inserción de los transposones), los controles sin inducir también presentaron fenotipos de desconsolidación (Figura 3.8 y Tabla 3.2).



**Figura 3.7. La sobreexpresión con una sola copia de MMP1 o MMP2 no genera defectos a nivel de la actividad locomotora. A.** Actogramas representativos de los controles genéticos (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU) y moscas que sobreexpresan MMP1 o MMP2. Se muestra sólo los actogramas para las líneas del cromosoma 3 para simplificar la figura. **B.** Porcentaje de ritmicidad poblacional. Se incluyen también los datos de los controles sin inducir (*pdf-GS>MMP1* y *pdf-GS>MMP2* para ambos cromosomas mantenidas en vehículo) y de la sobreexpresión con las líneas del cromosoma 2. Los datos representan el promedio de entre 3 y 4 experimentos independientes con un mínimo de 32 moscas analizadas. No se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de 2 factores).





**Figura 3.8.** La sobreexpresión con 2 copias de MMP1 conlleva a una pérdida de la consolidación de la actividad locomotora. **A.** Actogramas representativos de moscas controles genéticos (*pdf-GS>CD8GFP* mantenidas en RU), controles sin inducir (*pdf-GS>MMP1;MMP1* mantenidas en vehículo) y moscas que sobreexpresan MMP1 en doble copia. Las moscas que sobreexpresan MMP1 en doble copia no son capaces de consolidar correctamente su actividad durante el día, observándose mucha actividad durante la noche. **B.** Porcentaje de ritmicidad poblacional. Se incluyen también los datos de porcentaje de ritmicidad para la sobreexpresión de MMP2 en doble copia. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes con un mínimo de 55 moscas analizadas. Se observaron diferencias significativas entre la sobreexpresión de MMP1 y sus respectivos controles pero no así para MMP2. \* indica diferencias significativas con un  $p < 0,05$  (ANOVA de 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan). Se aplicó la transformación de  $\arcseno(\sqrt{x})$  para cumplir con los supuestos del ANOVA.

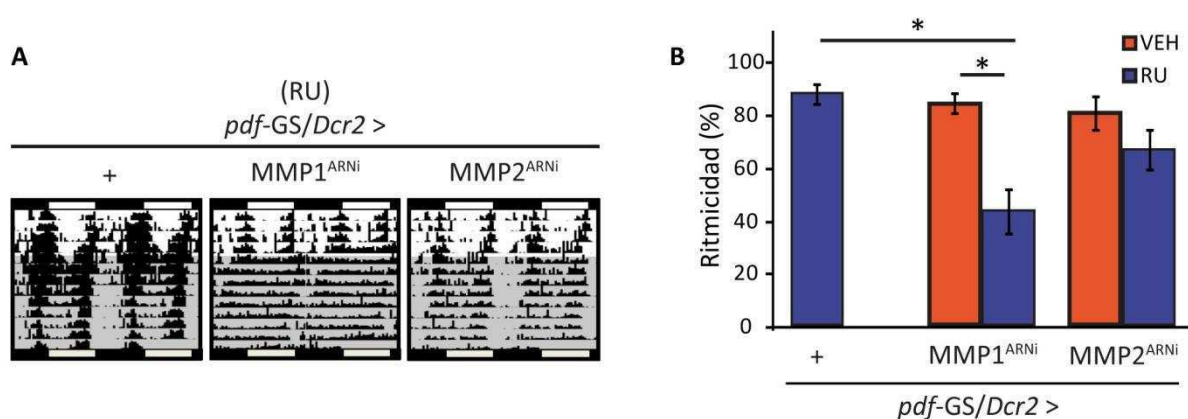
UAS (1X)		Ritmicidad (%)		Periodo (h)		N (exp.)	n (moscas)
Genotipo (cromosoma)	Condición	Media	Error	Media	Error		
<i>pdf-GS &gt; +</i>	RU	84,3	4,1	24,4	0,2	4	92
<i>pdf-GS &gt;MMP1 (cr.2)</i>	VEH	94,2	1,8	23,9	0,1	3	88
<i>pdf-GS &gt;MMP1 (cr.3)</i>	VEH	92,1	5,4	24,0	0,1	4	97
<i>pdf-GS &gt;MMP2 (cr.2)</i>	VEH	92,4	1,2	24,1	0,1	4	94
<i>pdf-GS &gt;MMP2 (cr.3)</i>	VEH	86,4	0,7	24,1	0,2	4	91
<i>pdf-GS &gt;MMP1 (cr.2)</i>	RU	88,2	8,3	24,4	0,2	4	97
<i>pdf-GS &gt;MMP1 (cr.3)</i>	RU	77,4	5,4	24,5	0,3	4	80
<i>pdf-GS &gt;MMP2 (cr.2)</i>	RU	88,8	2,8	24,4	0,3	4	94
<i>pdf-GS &gt;MMP2 (cr.3)</i>	RU	77,3	4,7	24,4	0,4	4	83
<i>MMP1 (cr.2)/+</i>	RU	90,5	9,5	23,8	0,2	2	32
<i>MMP1 (cr.3)/+</i>	RU	100,0	0,0	24,0	0,1	4	79
<i>MMP2 (cr.2)/+</i>	RU	96,0	2,0	23,9	0,2	4	75
<i>MMP2 (cr.3)/+</i>	RU	93,3	3,5	24,0	0,1	4	57

**Tabla 3.1.** Resumen de los resultados de porcentaje de ritmicidad y periodo promedio de los experimentos de sobreexpresión con un UAS. Todos los genotipos con *pdf-GS* incluyen la sobreexpresión de CD8GFP. N (exp.) indica el número de experimentos independientes realizados mientras que n (moscas) indica el número total de moscas analizadas por Genotipo/Condición.

UAS (2X)		Ritmicidad (%)		Periodo (h)		N (exp.)	n (moscas)
Genotipo (cromosoma)	Condición	Media	Error	Media	Error		
<i>pdf-GS &gt; +</i>	RU	79,1	5,4	24,7	0,2	4	104
<i>pdf-GS &gt;MMP1;MMP1</i>	VEH	86,4	2,6	24,1	0,1	4	113
<i>pdf-GS &gt;MMP2;MMP2</i>	VEH	66,0	5,4	24,2	0,1	4	81
<i>pdf-GS &gt;MMP1;MMP1</i>	RU	57,6	8,6	24,4	0,1	4	101
<i>pdf-GS &gt;MMP2;MMP2</i>	RU	53,9	2,3	24,8	0,2	4	92
<i>MMP1;MMP1/+</i>	RU	95,6	2,6	24,3	0,2	4	86
<i>MMP2;MMP2/+</i>	RU	96,4	1,9	23,9	0,1	3	55

**Tabla 3.2.** Resumen de los resultados de porcentaje de ritmicidad y periodo promedio de los experimentos de sobreexpresión con dos copias de los transgenes. Todos los genotipos con *pdf-GS* incluyen la sobreexpresión de CD8GFP. N (exp.) indica el número de experimentos independientes realizados mientras que n (moscas) indica el número total de moscas analizadas por Genotipo/Condición.

En el análisis complementario, el silenciamiento de MMP1 pero no de MMP2 condujo a una severa desconsolidación de la actividad locomotora lo cual se tradujo en una gran reducción de la ritmicidad poblacional. La sobreexpresión de DICER2 *per se* no generó defectos comportamentales, demostrando nuevamente que la sobreexpresión de la maquinaria de silenciamiento no afecta, al menos groseramente, la funcionalidad de las neuronas PDF. Moscas *pdf-GS>CD8GFP/MMP1<sup>ARNi</sup>;Dcr2* mantenidas en RU presentaron una ritmicidad de tan sólo el 43% y las moscas que eran rítmicas tenían un periodo endógeno que no difería del control (Figura 3.9 y Tabla 3.3).



**Figura 3.9.** Reducir los niveles de MMP1 en las neuronas PDF conduce a arritmicidad comportamental. **A.** Actogramas representativos de moscas controles genéticos y moscas que sobreexpresan un ARNi contra MMP1 y contra MMP2. **B.** Porcentaje de ritmicidad poblacional. Se incluyen también los datos de los controles sin inducir para cada uno de las metaloproteasas. Los datos representan el promedio de 5 experimentos independientes con un mínimo de 65 moscas analizadas. \* indica diferencias significativas con un  $p < 0,05$  (ANOVA de 2 Factores con test *post-hoc* de Tukey).

ARNi		Ritmicidad (%)		Periodo (h)		N (exp.)	n (moscas)
Genotipo (cromosoma)	Condición	Media	Error	Media	Error		
<i>pdf-GS</i> > +	RU	88,1	3,8	24,4	0,2	6	149
<i>pdf-GS</i> > <i>MMP1</i> <sup>RNAi</sup>	VEH	84,5	3,9	23,8	0,1	5	132
<i>pdf-GS</i> > <i>MMP2</i> <sup>RNAi</sup>	VEH	80,8	6,6	23,8	0,1	5	116
<i>pdf-GS</i> > <i>MMP1</i> <sup>RNAi</sup>	RU	43,3	8,6	24,4	0,1	6	140
<i>pdf-GS</i> > <i>MMP2</i> <sup>RNAi</sup>	RU	66,8	7,7	24,5	0,3	5	119
<i>MMP1</i> <sup>RNAi</sup> /+	RU	94,2	2,5	23,7	0,1	6	142
<i>MMP2</i> <sup>RNAi</sup> /+	RU	90,7	3,7	23,7	0,1	5	104

**Tabla 3.3. Resumen de los resultados de porcentaje de ritmicidad y periodo promedio de los experimentos de silenciamiento por ARNi.** Todos los genotipos con *pdf-GS* incluyen la sobreexpresión de CD8GFP y DICER2. N (exp.) indica el número de experimentos independientes realizados mientras que n (moscas) indica el número total de moscas analizadas por Genotipo/Condición.

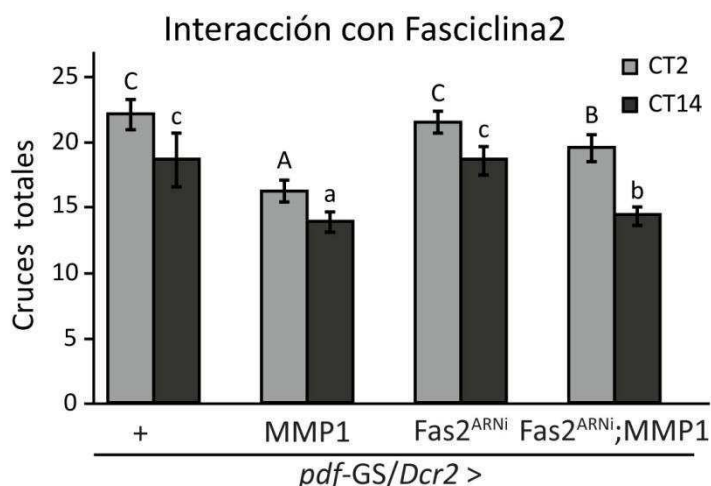
En resumen, a pesar de que ambas metaloproteasas son relevantes para el fenómeno de plasticidad estructural, sólo MMP1 presentó un efecto claro sobre la ritmicidad comportamental. Más aun, MMP1 tendría un efecto específico sobre la consolidación de la actividad locomotora en contraposición con cumplir un rol en la determinación del periodo.

### 3.3 MMP1 actúa en conjunto con Fasciclina 2 y la vía del Receptor de Ecdisona

A continuación nos preguntamos de que manera las metaloproteasas de matriz modifican la estructura del circuito PDF. Como se comentó en el inicio de este capítulo resultados preliminares de cultivo de cerebros sugieren que las proyecciones axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s* sufren cambios diarios de retracción y extensión de neuritas así como del grado de fasciculación axonal. Por otra parte, en el embrión de *Drosophila* las metaloproteasas de matriz promueven la fasciculación axonal de motoneuronas actuando en conjunto con Fasciclina 2 (Miller *et al.*, 2008). A su vez, durante el intenso remodelamiento de circuitos neuronales que ocurre en la pupariación las metaloproteasas de matriz interactúan con la vía de Ecdisona asistiendo durante la poda del árbol dendrítico (*pruning* dendrítico) de neuronas sensoriales (Kuo *et al.*, 2005). En este sentido, las MMPs han sido asociadas con procesos tanto de fasciculación como retracción de neuritas durante el desarrollo por lo que decidimos estudiar la implicancia de ambos tipos de programas de remodelado axonal por medio de experimentos de interacción génica.

Particularmente, se analizó si a través de la modulación de los niveles de expresión de Fasciclina2 o del receptor de Ecdisona se podía rescatar los fenotipos estructurales causados por la sobreexpresión de MMP1 en el circuito PDF. Nuestro razonamiento fue el siguiente: si la sobreexpresión de MMP1 conduce a circuitos menos complejos porque promueve fasciculación axonal, entonces, reducir los niveles de expresión de Fasciclina2 debería restaurar los niveles normales de fasciculación axonal y, en última instancia, restaurar la plasticidad estructural normal. Por otra parte, si altos niveles de MMP1 generan circuitos menos complejos porque promueven el podado de neuritas secundarias y si dicho podado depende también del receptor de Ecdisona en el circuito PDF, entonces se esperaría que reducir los niveles de expresión del receptor de Ecdisona restaure los niveles normales de retracción y en última instancia, restaure la complejidad normal de las arborizaciones dorsales.

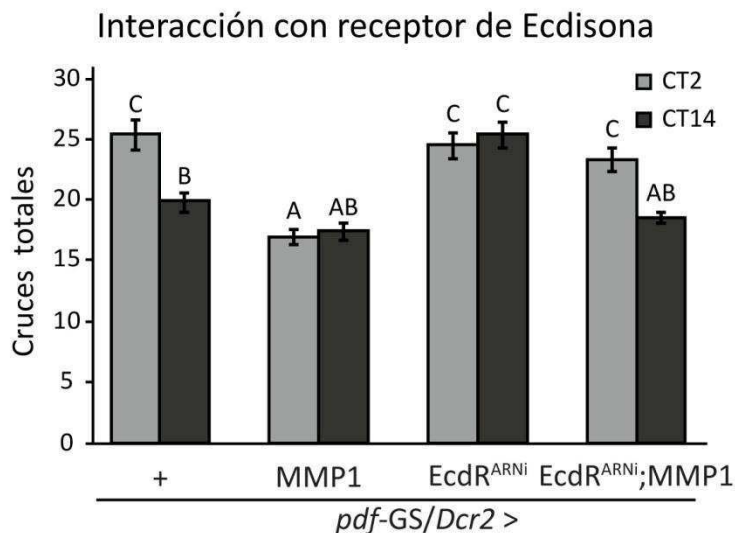
La expresión de un ARNi contra Fasciclina2 (Fas2) dentro del circuito PDF y específicamente en el adulto no generó *per se* ningún defecto a nivel de la plasticidad estructural de las terminales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Sin embargo, al expresarlo en contexto de la sobreexpresión de MMP1 rescató parcialmente el defecto a nivel de la complejidad de las arborizaciones axonales (Figura 3.10).



**Figura 3.10. MMP1 altera la estructura de las terminales axonales a través de la acción de Fasciclina 2.** Cuantificación del número total de entrecruzamientos para moscas de los genotipos indicados en la figura. Se utilizó la línea de MMP1 (cr.3). Los datos representan la media de 4 experimentos independientes y un mínimo de 27 moscas fueron analizadas por punto. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas a CT2, y las minúsculas, diferencias a CT14 ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan. La interacción Genotipo x CT resultó no significativa y el análisis arrojó diferencias significativas tanto para los distintos CT como entre genotipos).

En cuanto al receptor de Ecdisona (EcdR), la expresión de un ARNi que permite silenciar la expresión de todas las variantes del mismo dentro del circuito PDF y restringido al periodo adulto, condujo a terminales axonales que no oscilan circadianamente y con un nivel de complejidad alto, reminiscente al de la mañana de un control. A su vez, la expresión del ARNi contra EcdR en contexto

de la sobreexpresión de MMP1 rescató la plasticidad estructural normal de las terminales de las *s-LN<sub>v</sub>s* (Figura 3.11).



**Figura 3.11. El remodelamiento axonal circadiano depende de la activación de la vía del receptor de Ecdisona.** Cuantificación de los cruces totales para moscas controles (*pdf-GS>+*), moscas que sobreexpresan MMP1 (*pdf-GS>MMP1*), moscas que sobreexpresan un ARNi contra EcdR (*pdf-GS>EcdR<sup>ARNi</sup>*) y moscas que sobreexpresan ambos transgenes (*pdf-GS>EcdR<sup>ARNi</sup>;MMP1*). Los datos representan la media de 4 experimentos independientes y un mínimo de 29 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan).

Estos resultados indican que la acción diaria de MMP1 sobre la estructura de las terminales dorsales de las neuronas PDF depende, al menos en parte, de la actividad de Fasciclina2 y del receptor de Ecdisona. La implicancia de estas moléculas sugiere que el remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>v</sub>s* es un complejo caso de plasticidad estructural que involucra cambios en la fasciculación axonal y cambios en la extensión y retracción o podado de neuritas.

## CAPITULO 4 MMP1, un nuevo modulador del neuropéptido PDF

En este cuarto y último capítulo nos propusimos entender las razones subyacentes a las diferencias entre MMP1 y MMP2 a nivel de su efecto sobre la actividad locomotora. Mientras ambas metaloproteasas son importantes para el control de la plasticidad estructural, sólo la alteración de MMP1 conduce a alteraciones comportamentales en el paradigma de actividad locomotora. En particular, analizamos si estas diferencias se basan en efectos diferenciales sobre la señal del neuropéptido PDF en los distintos mutantes.

### 4.1 MMP1 reduce los niveles de PDF en las proyecciones dorsales

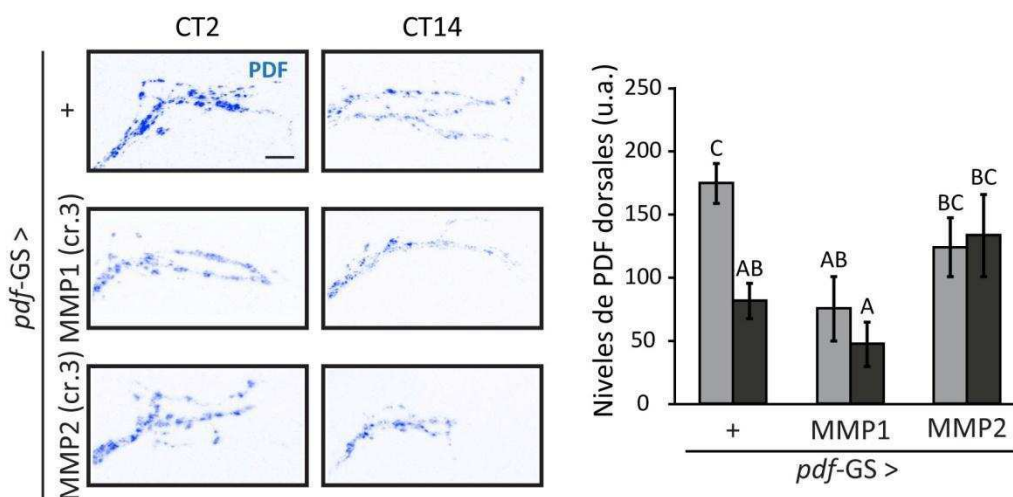
Uno de los resultados que más nos llamó la atención fue el efecto diferencial de ambas metaloproteasas a nivel del control locomotor rítmico. Estas diferencias podrían deberse a que si bien ambas metaloproteasas afectan la remodelación axonal diaria no lo hacen exactamente de la misma manera (Figura 3.3). Dicha explicación, aunque posible, no nos pareció muy probable puesto que mientras que los mutantes de MMP2 presentaban fenotipos estructurales más severos que MMP1 (afectando no sólo el grado de ramificación general sino también el largo de neuritas principales), fueron los mutantes de MMP1 los que mostraron alteraciones en el patrón de actividad locomotora. En ese sentido, hipotetizamos que MMP1 estaría afectando alguna otra vía presente en las neuronas PDF que fuera relevante para el control del comportamiento rítmico.

Como se mencionó en la introducción, la señal del neuropéptido PDF es crucial para el correcto control del comportamiento locomotor rítmico. Por esa razón, decidimos analizar si los fenotipos comportamentales de animales con los niveles de MMP1 alterados reflejaban una modificación en la señal del neuropéptido. Para ello, se midió los niveles de PDF en las arborizaciones de las proyecciones de las *s-LN<sub>v</sub>s* por inmunohistoquímica a CT2 y CT14, durante el cuarto día de oscuridad constante (OO4) en animales controles y animales que sobreexpresaban MMP1, MMP2 o un ARNi específico contra cada una de las metaloproteasas.

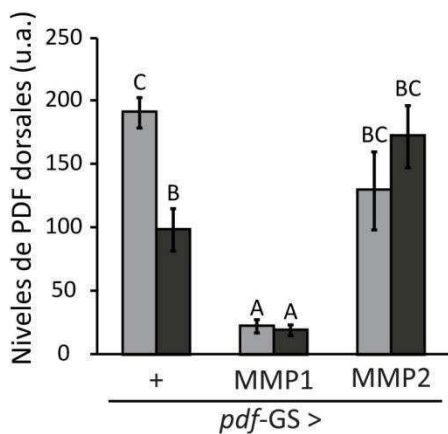
Para los experimentos de sobreexpresión, se analizó el efecto de la sobreexpresión con un solo UAS (líneas del cromosoma 2 o del 3) o con dos UAS (combinando ambas líneas). Moscas controles presentaron cambios circadianos de los niveles de PDF en las terminales, mostrando mayor inmunoreactividad a CT2 con respecto a CT14. Llamativamente, la sobreexpresión de MMP1 o MMP2

redujo los niveles de PDF en las terminales y detuvo las oscilaciones circadianas. El efecto con MMP1 fue mucho más severo, provocando la reducción significativa del neuropéptido a los niveles de la noche del control (Figura 4.1 A y C) o aun menores (Figura 4.1 B). En cambio, la sobreexpresión de MMP2 con cualquiera de las líneas utilizadas afectó los niveles de PDF en menor medida, llevando los niveles a un punto intermedio entre el día y la noche del control, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 4.1). En cuanto a los experimentos complementarios, el silenciamiento de la expresión de MMP1 y no así el de MMP2 detuvo las oscilaciones en la inmunoreactividad de PDF en las terminales axonales y fijó los niveles altos comparables al día de un control (Figura 4.2).

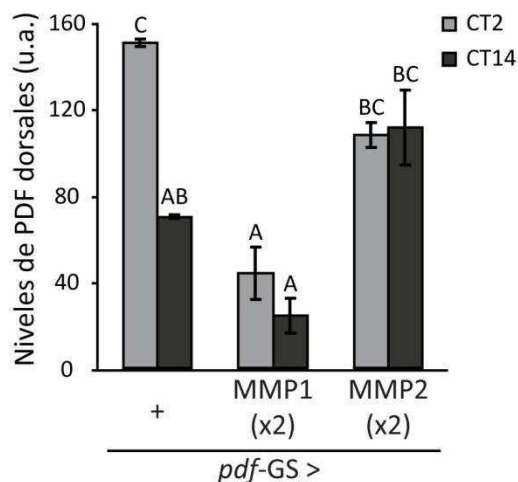
**A** Sobreexpresión líneas cr.3



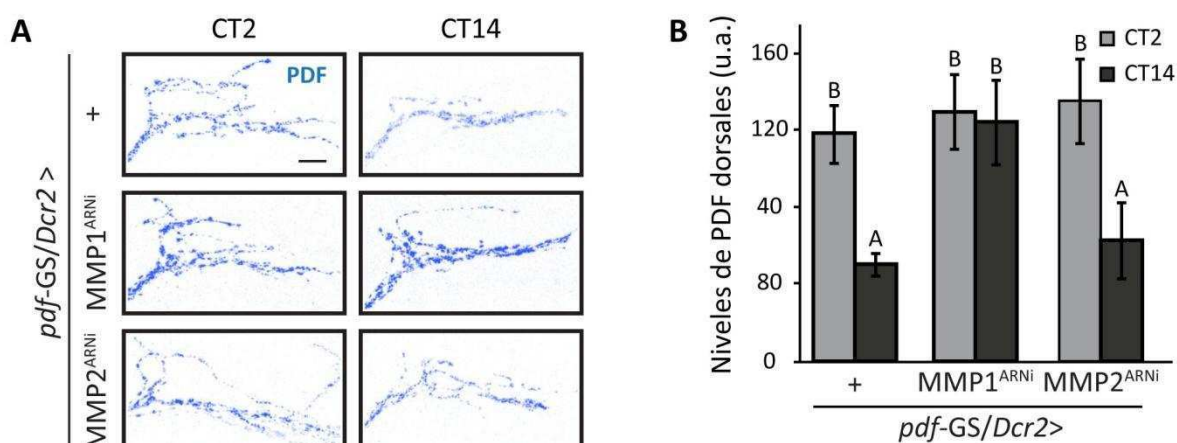
**B** Sobreexpresión líneas cr.2



**C** Sobreexpresión con 2 UAS



**Figura 4.1. Los niveles de PDF en las terminales dorsales se encuentran bajos y constantes como consecuencia de la sobreexpresión de MMP1.** **A.** Imágenes representativas de la señal de PDF en las proyecciones axonales dorsales de las *s-LN<sub>s</sub>* de moscas controles (**arriba**), que sobreexpresaban MMP1 (**medio**) o MMP2 (**abajo**) a CT2 y CT14 (**izquierda**); cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en la misma región (**derecha**). Se muestran imágenes representativas y la cuantificación para las líneas del cromosoma 3. Escala: 10  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en las terminales axonales para las líneas del cromosoma 2. **C.** Ídem pero la sobreexpresión con 2 UAS. En todos los casos, los datos representan la media de al menos 3 experimentos y un mínimo de 30 cerebros fueron analizados por punto. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$  (ANOVA de 2 factores con un test *post-hoc* de Duncan. En el caso de las líneas del cromosoma 2 se aplicó la transformación  $\ln(x)$  para cumplir con los supuestos del ANOVA). U.a.: unidades arbitrarias.



**Figura 4.2. El silenciamiento de MMP1 pero no de MMP2 fija los niveles de PDF en las terminales al nivel de la mañana.** **A.** Imágenes de microscopía confocal representativas de la señal de PDF en las proyecciones axonales dorsales de las *s-LN<sub>s</sub>* de moscas controles (**arriba**), que sobreexpresan un ARNi contra MMP1 (**medio**) o contra MMP2 (**abajo**) a CT2 y CT14. Escala: 10  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la intensidad promedio del neuropéptido en las terminales axonales. En todos los genotipos, se sobreexpresó CD8GFP y DICER2. Los datos representan la media de entre 3 y 4 experimentos y un mínimo de 23 cerebros fueron analizados por punto. Las letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$  (ANOVA de 2 factores con un test *post-hoc* de Duncan). U.a.: unidades arbitrarias.

4.2 Ahondando en el mecanismo. ¿Cómo modula MMP1 los niveles de PDF en las terminales axonales?

En principio, MMP1 podría modular los niveles de PDF en las terminales afectando cualquiera de los pasos intermedios desde la transcripción hasta el procesamiento y liberación del propio neuropéptido. Por otra parte, siendo que MMP1 es una proteasa otra posibilidad es que lo degrade directamente. Esta degradación podría ocurrir en el espacio extracelular, donde fue propuesto que



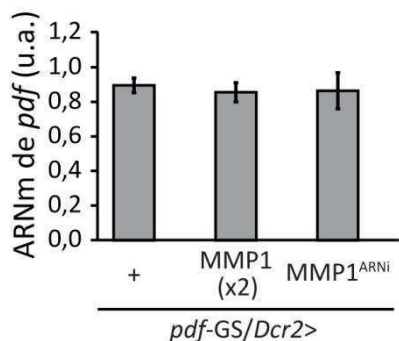
actúa MMP1 (Page-McCaw *et al.*, 2003), o aun dentro de las vesículas que transportan PDF<sup>17</sup>. En nuestros experimentos se midieron los niveles del neuropéptido dentro de la terminal por lo que si MMP1 degradara PDF en el espacio extracelular la reducción observada intracelularmente debería ser resultante de un efecto indirecto, dependiente de alguna vía que señalizase hacia las neuronas PDF. Por otra parte, MMP1 podría modular los niveles de PDF indirectamente y la reducción observada resultar de una menor transcripción o estabilidad del ARN mensajero. Por otra parte, PDF se traduce como un propéptido que luego es procesado por una enzima y ante estímulos aun no descriptos (Renn *et al.*, 1999). En ese sentido, otra posibilidad sería que MMP1 promueva una menor tasa de procesamiento del propéptido PDF. Y, por último, en mamíferos se ha demostrado proteólisis dependiente de actividad por parte de metaloproteasas sobre proteínas sinápticas que altera la transmisión sináptica (Restituto *et al.*, 2011) por lo que existe la posibilidad de que MMP1 esté afectando la liberación de PDF desde las terminales (Figura 4.3). Nos propusimos entonces analizar cuál de estos pasos estaría realmente afectado en el circuito PDF.

- ✓ Transcripción y estabilidad de ARN mensajero de *pdf*.
- ✓ Producción del propéptido o su procesamiento
- ✓ Degradación directa de PDF dentro de las vesículas
- ✓ Liberación del neuropéptido
- ✓ Degradación directa de PDF fuera de las terminales

**Figura 4.3. Puntos en donde podría estar actuando MMP1 para modular los niveles de PDF en las terminales dorsales.**

Con el fin de analizar si MMP1 es capaz de reducir los niveles de ARN mensajero estables de *pdf* se realizó una RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) durante el principio de la mañana (ZT2) sobre ARNm de moscas que estuvieron en presencia del inductor RU durante 7 días en condiciones de luz-oscuridad (LO7). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de *pdf* entre moscas controles (*pdf-GS>Dcr2*), moscas que sobreexpresan MMP1 con 2 UAS (*pdf-GS>Dcr2/MMP1;MMP1*) y moscas que sobreexpresaban un ARNi contra MMP1 (*pdf-GS>Dcr2;MMP1<sup>ARNi</sup>*) (Figura 4.4).

<sup>17</sup> En mamíferos se demostró que algunas metaloproteasas que se secretan también pueden activarse intracelularmente por la acción de furinas.



**Figura 4.4. Los niveles de ARN mensajero de *pdf* no se ven afectados como consecuencia de la desregulación de la expresión de MMP1.** Se midieron los niveles del ARNm de *pdf* y *Rpl29* (usado como normalizador) en muestras de cabezas de moscas de los genotipos indicados en la figura por qRT-PCR a ZT2 en LO7. Los datos corresponden a la media de al menos 3 muestras independientes. No se observaron diferencias significativas entre los distintos genotipos (ANOVA de 1 Factor. Se aplicó la transformación log(x) para cumplir con los supuestos del ANOVA). U.a. indica unidades arbitrarias.

A continuación se analizó si MMP1 afecta los niveles de propéptido, ya sea disminuyendo su producción o porque reduce, de alguna manera, el procesamiento de propéptido a PDF maduro. Nos propusimos entonces medir los niveles de propéptido por inmunohistoquímica en las terminales dorsales. Sin embargo, descubrimos mientras hacíamos estos experimentos que el anticuerpo disponible que reconoce el “epítoto no PDF” en el propéptido en realidad lo reconoce sólo una vez que el propéptido ha sido clivado (Paul Taghert, comunicación personal). Por lo tanto, el uso de dicho anticuerpo no resultó informativo para analizar si MMP1 reduce el procesamiento o la producción del propéptido y, en consecuencia, no pudimos estudiar esa opción.

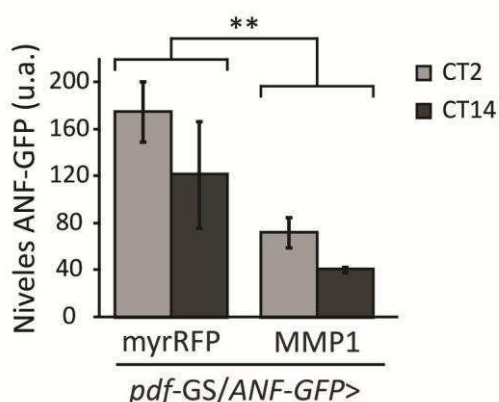
A su vez, MMP1 podría degradar directamente a PDF y, de esta manera, reducir los niveles del neuropéptido en las terminales. Para analizar dicha posibilidad se estableció una colaboración con el Dr. Eduardo Castaño y actualmente estamos estudiando si MMP1 es capaz de degradar PDF *in vitro*. En principio, la degradación podría ocurrir dentro de las terminales, presumiblemente en las mismas vesículas que contienen PDF, o fuera de las terminales. Si la degradación fuera intracelular entonces tanto MMP1 como PDF deberían encontrarse en las mismas vesículas. Se intentó identificar la expresión endógena de MMP1 dentro del circuito PDF por medio de inmunohistoquímica pero los anticuerpos contra MMP1 con los que contábamos no nos permitieron obtener señal clara en el cerebro del adulto (datos no mostrados).

Por otra parte, se analizó si MMP1 es capaz de degradar a PDF en el espacio extracelular. Si la acción de MMP1 sobre PDF fuera, de hecho, en el espacio extracelular entonces sería de esperar que la liberación de MMP1 por parte de otras neuronas vecinas pudiese también modular los niveles de PDF. Entonces, se sobreexpresó MMP1 en todas las neuronas del cerebro adulto con excepción de las neuronas PDF (combinando la línea *elav*-GAL4 de expresión panneural con *pdf*-GAL80 que inhibe la acción de GAL4 en las neuronas PDF) con el fin de analizar los niveles del neuropéptido y ver si

también están reducidos respecto de los controles. A pesar de haber restringido groseramente la sobreexpresión de MMP1 al periodo adulto (utilizando el sistema TARGET que permite reducir o abolir la actividad de GAL4 modulando la temperatura de cría), las moscas murieron a los pocos días de eclosión por lo que fue posible analizar el efecto sobre los niveles de PDF.

Por último, se evaluó si la sobreexpresión de MMP1 afecta la liberación del neuropéptido. El transgen ANF-GFP (péptido natriurético atrial de rata fusionado a GFP) expresado en células secretoras de *Drosophila* es procesado, localizado y liberado de la misma manera que un neuropéptido endógeno (Rao *et al.*, 2001) y se ha demostrado que el análisis de la señal de GFP es un buen indicativo de la liberación de neuropéptidos frente a estímulos fisiológicos (Husain & Ewer, 2004). Menores niveles de ANF-GFP en las terminales podrían ser indicativos de una gran liberación de neuropéptido y altos niveles, de lo contrario. Se expresó ANF-GFP en las neuronas PDF específicamente en el adulto en moscas controles y en moscas que, a su vez, sobreexpresaban MMP1 y se analizó la señal de GFP en las terminales axonales a CT2 y CT14 en OO4.

Moscas controles presentaron niveles de ANF-GFP detectables en las terminales y éstos no mostraron oscilación circadiana significativa de acuerdo con lo previamente publicado (Kula *et al.*, 2006). Sin embargo, a diferencia de lo reportado con la expresión constitutiva de ANF-GFP (Kula *et al.*, 2006), la expresión restringida al periodo adulto no afectó la oscilación diaria en los niveles de PDF en la terminal, validando la utilización de esta herramienta (dato no mostrado). De manera interesante, la sobreexpresión de MMP1 redujo notablemente los niveles de ANF-GFP detectados en las terminales dorsales (Figura 4.5).



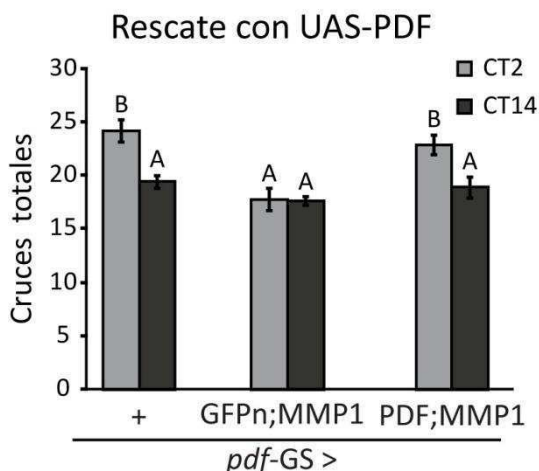
**Figura 4.5. La sobreexpresión de MMP1 en el circuito PDF reduce notablemente los niveles de ANF-GFP.** Se sobreexpresó ANF-GFP en moscas controles y en aquellas que sobreexpresan MMP1 (cr.3) durante la adultez en el circuito PDF. Se analizó los niveles de GFP a CT2 y CT14 de moscas disectadas durante OO4. Las moscas controles expresan myrRFP para balancear el número de construcciones UAS entre controles y tratados. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de GFP expresados en unidades arbitrarias (u.a.). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes y un mínimo de 21 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. No se observaron diferencias significativas entre CT pero sí entre genotipos con un  $p < 0,01$  (ANOVA de 2 Factores).

En conclusión, los experimentos con ANF-GFP sugieren que altos niveles de MMP1 expresados en el circuito PDF afectarían positivamente la liberación del neuropéptido. En ese sentido, el efecto sobre la liberación constituiría al menos una de las causas de la reducción de PDF detectado en las terminales.

#### 4.3 Los niveles del neuropéptido son esenciales para el control de la plasticidad estructural

Un trabajo reciente de nuestro laboratorio demostró que la acción de PDF durante el desarrollo determina la estructura fina de las proyecciones axonales dorsales del propio circuito que expresa el neuropéptido (Gorostiza & Ceriani, 2013). A su vez, en esta tesis demostramos que la acción de MMP1 en el periodo adulto afecta la plasticidad estructural circadiana de las neuronas PDF a la vez que altera los niveles del neuropéptido en las terminales. Cabe entonces la posibilidad de que los fenotipos estructurales en los mutantes de MMP1 se deban a una acción del neuropéptido sobre la remodelación de su propio circuito. En ese sentido, hipotetizamos que si PDF fuera responsable de la plasticidad estructural entonces, rescatando los niveles del neuropéptido en el contexto de la sobreexpresión de MMP1 se debería restablecer el remodelamiento axonal circadiano.

Como habíamos previsto, la sobreexpresión de PDF en el contexto de la sobreexpresión de MMP1 restauró la plasticidad estructural circadiana de las terminales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Este rescate no se debió a una dilución de la fuerza del GAL4 puesto que incluir un UAS extra que no afecta la estructura (UAS GFP dirigido al núcleo, GFPn) en el contexto de la sobreexpresión de MMP1 no previno que el fenotipo se evidenciara (Figura 4.6). Más aun, el silenciamiento de la expresión de PDF *per se* generó fenotipos similares a la sobreexpresión de MMP1 (datos no mostrados, Lic. Axel Gorostiza).



**Figura 4.6. La expresión de UAS-PDF en contexto de la sobreexpresión de MMP1 rescata la plasticidad estructural.**

Cuantificación de los cruces totales para cerebros controles (*pdf-GS>CD8GFP*) o provenientes de moscas que sobreexpresan MMP1 (*pdf-GS>GFPn;MMP1*) o MMP1 y PDF (*pdf-GS>PDF;MMP1*). Se utilizó la línea de UAS-MMP1 del cromosoma 3 para simplificar la combinación de los transgenes. Los datos representan la media de entre 3-5 experimentos independientes y un mínimo de 21 moscas fueron analizadas por CT/Genotipo. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  ANOVA 2 Factores con test *post-hoc* de Duncan).

En conclusión podemos decir que, al igual que durante el desarrollo, el neuropéptido PDF afecta el remodelamiento de las proyecciones axonales de su propio circuito.

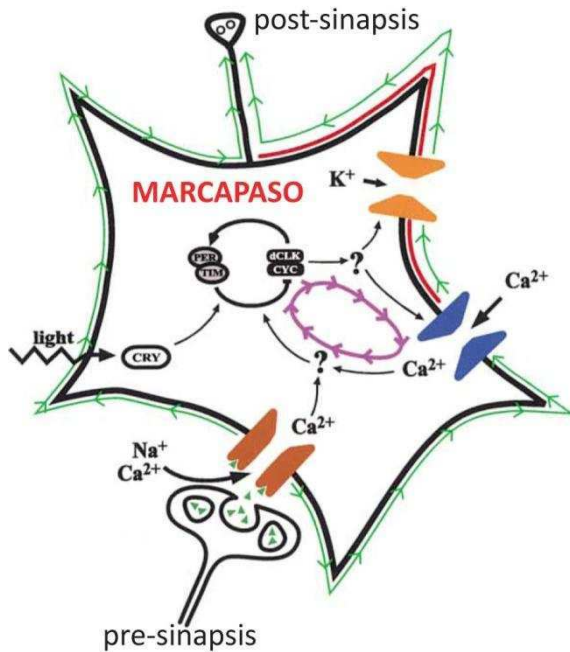
*Discusión y conclusiones*

A lo largo de esta tesis se estudió el rol de la actividad eléctrica y la plasticidad estructural de las neuronas marcapasos de *Drosophila* en el control de los ritmos circadianos. En general, ambos procesos son claves para la actividad de cualquier neurona puesto que le permiten modular la comunicación entre neuronas de una misma red. En ese sentido, varios trabajos habían demostrado previamente la relevancia de la actividad eléctrica de las neuronas PDF sobre los ritmos circadianos (Nitabach *et al.*, 2002; Nitabach *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008a) pero aun así existía una gran controversia respecto a qué aspectos de la modulación circadiana ésta impactaba. En cambio, no existía ninguna información precedente respecto a los mecanismos y la relevancia funcional del remodelamiento axonal diario de las neuronas PDF. Los resultados de esta tesis apoyan un rol funcional de la actividad eléctrica sobre la modulación de las vías de salida de las neuronas *s-LN<sub>s</sub>* (comportamiento locomotor rítmico, niveles de neuropéptido PDF, plasticidad estructural y nivel de conectividad) a la vez que descartan un papel imprescindible en la generación de las oscilaciones circadianas en su nivel más fundamental. En cuanto a la plasticidad estructural circadiana, nuestros resultados sugieren que no sería fundamental para el control del comportamiento locomotor rítmico aunque presumiblemente resulte relevante para la modulación de otros fenómenos circadianos. Por último, los resultados del *screen* de neuronas postsinápticas utilizando la técnica de GRASP sostienen nuestra hipótesis inicial de cambios diarios en la conectividad de las neuronas *s-LN<sub>s</sub>*. La relevancia de cada uno de estos descubrimientos en contexto de los datos de la literatura así como las perspectivas a futuro serán discutidas a continuación.

#### La actividad eléctrica como un reforzador de las oscilaciones circadianas

El silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF mediante la expresión del canal de potasio KIR2.1 en forma continua desde el inicio del desarrollo detiene las oscilaciones moleculares de proteínas claves en el funcionamiento del reloj adulto (Nitabach *et al.*, 2002), y aun en la larva (Nitabach *et al.*, 2005). A su vez, alterar groseramente los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares en las neuronas PDF, por medio de la sobreexpresión constitutiva del quelante de  $Ca^{2+}$  parvalbumina, conduce a alteraciones en el periodo de la actividad locomotora y retrasa las oscilaciones moleculares en el marcapasos central (Harrisingh *et al.*, 2007). Estos resultados llevaron a Nitabach y colaboradores a proponer que la modulación en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular es un componente funcional fundamental del reloj molecular en las neuronas marcapasos de la mosca. En ese sentido, los autores proponen que las oscilaciones en la actividad eléctrica de la membrana generan oscilaciones en los niveles de  $Ca^{2+}$

intracelular en las células marcapasos y, por medio de la vía de calmodulinas y CaMKII, altera el paso del reloj molecular (Figura D1). Este ciclo de retroalimentación positiva que aporta la actividad cíclica de la membrana sería, según los autores, esencial para mantener las oscilaciones moleculares y, por lo tanto, constituiría un mecanismo clave para la generación de los ritmos circadianos.



**Figura D1: Modelo propuesto del rol del calcio intracelular como un elemento esencial del reloj molecular.** Las oscilaciones a nivel molecular influyen en la actividad eléctrica del marcapasos modulando los canales de potasio ( $K^+$ , en naranja en el esquema) y calcio ( $Ca^{2+}$  en azul) activados por voltaje. La actividad eléctrica oscilatoria del marcapasos influye sobre las oscilaciones moleculares a través de vías de señalización  $Ca^{2+}$  dependientes (en violeta en el esquema), cerrando un ciclo de retroalimentación positiva que es esencial para las oscilaciones moleculares en ausencia de claves ambientales. **Tomado de Nitabach *et al.*, 2002.**

En mamíferos también existe esta idea de la actividad eléctrica y la conectividad de la red como reforzadora de las oscilaciones moleculares. En particular, la depolarización de membrana, el calcio intracelular y el  $AMP_c$  serían reguladores importantes del reloj transcripcional de mamíferos y, dado que también presentan modulación circadiana en el SCN, son tanto entradas como salidas del oscilador circadiano, y por tanto conforman un ciclo de realimentación positiva (Welsh *et al.*, 2010). Sin embargo, a diferencia de lo propuesto por Nitabach, en mamíferos está claro que la actividad de la red no es necesaria para generar las oscilaciones moleculares dentro de cada neurona del SCN aunque sí refuerza dicha oscilación aumentando los niveles de expresión de PER2 y ayudando a la sincronización de osciladores celulares (Webb *et al.*, 2009). Por otra parte, tanto en mamíferos como en *Drosophila* se ha identificado la vía de CREB como mecanismo que conecta la actividad eléctrica con la expresión circadiana de genes (Mizrak *et al.*, 2012; Travnickova-Bendova *et al.*, 2002).



A diferencia de lo observado con el tratamiento constitutivo de los experimentos de Nitabach y colaboradores y a favor de lo propuesto en mamíferos, en esta tesis se demostró que el silenciamiento eléctrico restringido al periodo adulto no detiene las oscilaciones moleculares (Figura 1.5). Sin embargo, la expresión de KIR2.1 más prolongada en el tiempo eventualmente alteró el paso de las oscilaciones moleculares (Figura 1.7), corroborando la existencia de un acoplamiento entre la actividad de la membrana y las oscilaciones en el núcleo. Por lo tanto, al igual que en mamíferos, las oscilaciones circadianas en *Drosophila* se basan en la oscilación transcripcional/traducciona de genes específicos y la actividad eléctrica es un mecanismo reforzador de las mismas, resaltando el grado de conservación entre organismos muy distanciados evolutivamente (Depetris-Chauvin *et al.*, 2011).

#### La actividad eléctrica como modulador de las vías de salida

El silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF restringido a la fase adulta afectó diversas vías de salidas del marcapasos central. Por un lado, la expresión de KIR2.1 durante la adultez condujo a una pérdida completa de la ritmicidad comportamental y dicho efecto presentó la misma magnitud que el silenciamiento eléctrico extendido desde el inicio del desarrollo del circuito PDF (Figura 1.2). Además de los resultados generados en esta tesis, un trabajo previo había demostrado la relevancia de la actividad eléctrica de las neuronas PDF específicamente en el periodo adulto. En dicho trabajo la aplicación de una toxina de araña que inhibe los canales de calcio mediante un sistema que permite su acción sólo en las neuronas PDF y específicamente en el periodo adulto altera drásticamente la ritmicidad comportamental (Wu *et al.*, 2008b).

Por otra parte, el silenciamiento eléctrico de las neuronas PDF restringido a la adultez alteró la señal del neuropéptido en las terminales axonales. En principio, es de esperar que la hiperpolarización de las neuronas impida la liberación del neuropéptido y por lo tanto cause su acumulación en las terminales. Sin embargo, la expresión de KIR2.1 que silenció la actividad eléctrica de la membrana condujo a una reducción de los niveles del neuropéptido en las terminales (Figura 1.10). Este efecto paradójico también se observó cuando se expresó un canal de Na<sup>+</sup> que genera la depolarización de las neuronas PDF; este tratamiento condujo a una acumulación del neuropéptido en las terminales (Nitabach *et al.*, 2006). En esta tesis se determinó que la expresión de KIR2.1 genera una reducción sutil sobre la transcripción de *pdf* a la vez que aumenta los niveles del neuropéptido en la soma y reduce los niveles en las terminales, sugiriendo una alteración sobre el transporte de las

vesículas que contienen a PDF (Figuras 1.11 y 1.12). Tanto las alteraciones sobre la ritmicidad comportamental como sobre los niveles de PDF en las terminales se recuperaron una vez apagado la expresión de KIR2.1 en las neuronas PDF (Figuras 1.3 y 1.13), indicando un efecto modulador directo de la actividad eléctrica sobre ambas vías de salidas del marcapasos.

Además del efecto sobre las vías de salida más estudiadas de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s*, el silenciamiento eléctrico afectó propiedades estructurales de las terminales axonales recientemente descritas en nuestro laboratorio a (Fernandez *et al.*, 2008) y Gorostiza, Depetris-Chauvin *et al.*, en preparación). La expresión de KIR2.1 redujo el grado de arborización de las terminales axonales así como también el número de zonas sinápticas activas (determinadas según la cantidad de partículas BRP<sup>+</sup>) (Figuras 1.14 y 1.15). Durante el desarrollo, la actividad eléctrica presináptica es fundamental para el desarrollo de las proyecciones axonales. En la placa neuromuscular de la larva, mutantes de canales de potasio que generan un aumento de la excitabilidad específicamente en las motoneuronas presentan un mayor desarrollo del árbol axonal y más botones presinápticos (Mosca *et al.*, 2005). En las neuronas de proyección presinápticas a los cuerpos pedunculados (MB) el efecto del silenciamiento eléctrico es el contrario al observado en el circuito PDF. La expresión de un canal de potasio que hiperpolariza las neuronas de proyección aumenta el tamaño de la terminal presináptica así como el número de zonas activas marcadas con BRP, sugiriendo un mecanismo compensatorio frente a la disminución de la actividad (Kremer *et al.*, 2010). Las diferencias entre los resultados del circuito PDF y los de las neuronas de proyección pueden deberse a que en el circuito PDF el silenciamiento eléctrico aplicado fue más acotado en el tiempo y se evitó el silenciamiento en el desarrollo; en ese sentido, el silenciamiento eléctrico restringido al adulto puede dar idea de efectos más directos de la actividad eléctrica sobre la estructura mientras que el efecto desde el desarrollo podría conducir a mecanismos compensatorios. Alternativamente, las diferencias puedan dar cuenta de mecanismos diferentes desencadenados por la actividad eléctrica en distintos grupos neuronales.

Si bien el silenciamiento eléctrico redujo tanto el grado de arborización de las terminales como el número de zonas activas, el efecto sobre la modulación circadiana fue distinto. En el caso de los cambios en el nivel de ramificación, la expresión de KIR2.1 no afectó las oscilaciones circadianas mientras que sí lo hizo para el número de zonas activas presinápticas. Estas diferencias nos sorprendieron porque pensábamos que los cambios diarios en la señal de BRP eran una consecuencia directa de los cambios en el grado de arborización de las terminales. En ese sentido, si individuos con el circuito PDF silenciado siguen presentando plasticidad estructural a nivel de las terminales era de

esperar que también mostraran cambios en el número de zonas activas. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis sugieren que, si bien ambos dependen en alguna medida de la actividad eléctrica de las neuronas PDF, el origen de las oscilaciones circadianas de ambos procesos plásticos sería diferente. En el caso del grado de arborización, los cambios diarios dependerían de un oscilador molecular funcional sin precisar de oscilaciones en la actividad de la membrana. Por el contrario, los cambios diarios en el número de zonas activas requerirían de oscilaciones circadianas en el potencial de membrana o en la frecuencia de disparo de potenciales de acción.

Finalmente, sería interesante a futuro estudiar el rol de la actividad eléctrica de las neuronas PDF realizando alteraciones más fisiológicas, como ser afectar la expresión de canales y/o moduladores de expresión endógena en las neuronas marcapasos, y ver si conducen a los mismos defectos que la expresión de KIR2.1. En ese sentido, los análisis de perfiles transcripcionales específicos de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* y *l-LN<sub>v</sub>s* sugieren la expresión de determinados canales iónicos que podrían ser responsables de las oscilaciones circadianas en la actividad de membrana (Kula-Eversole *et al.*, 2010; Nagoshi *et al.*, 2010). Actualmente en el laboratorio se está realizando un *screen* con ARNi dirigidos contra estos canales iónicos para confirmar su función en regular la actividad de las neuronas PDF. Una vez identificados los canales iónicos responsables de las oscilaciones diarias en la membrana resultará sumamente interesante definir si afectan a la plasticidad circadiana tanto a nivel del grado de ramificación como de las zonas activas, así como también si alteran los cambios diarios del neuropéptido en las terminales.

Las metaloproteasas de matriz, la vía de Ecdisona y el neuropéptido PDF coordinan la plasticidad estructural circadiana.

Uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral fue ahondar en los mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de plasticidad estructural circadiana. Con ese fin y teniendo en cuenta que el fenómeno plástico de interés ocurre circadianamente en el adulto, se estudió la contribución de moléculas específicas al control del remodelamiento axonal por medio de la desregulación de la expresión génica poniendo especial énfasis en no alterar el correcto desarrollo del circuito PDF. En ese sentido, el uso de una herramienta inducible resultó fundamental para el análisis de los mecanismos moleculares subyacentes.

El remodelamiento de las terminales axonales puede ocurrir por la acción de moléculas expresadas por las propias neuronas que se remodelan, o bien por la liberación de factores por parte de otras neuronas o la glía. En esta tesis se analizó la contribución de moléculas expresadas en el propio circuito PDF sobre el remodelamiento de sus axones y se demostró que efectivamente la actividad de dichas neuronas regula su plasticidad estructural. Sin embargo, no podemos descartar la contribución de factores liberados por otras células vecinas. De hecho, las interacciones neurona-glía son fundamentales para la fasciculación de axones y determinar la conectividad general durante el desarrollo (Hidalgo, 2003). Por otra parte, cualquier célula (neurona o glía) que tenga un reloj circadiano podría expresar cíclicamente los factores responsables del remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>v</sub>s* y determinar así la periodicidad del fenómeno plástico. En ese sentido, en el cerebro adulto de *Drosophila*, el reloj molecular está presente en cada una de las 150 neuronas que conforman la red circadiana, pero también la glía expresa los genes canónicos del reloj. Más aun, recientemente se demostró que la actividad eléctrica de la glía es necesaria para el control de la ritmicidad comportamental y para la señal del neuropéptido PDF (Ng *et al.*, 2011). En experimentos futuros sería interesante, entonces, analizar la contribución de la actividad de otras neuronas de la red circadiana así como de la glía en la plasticidad estructural de las *s-LN<sub>v</sub>s*.

La desregulación de la expresión génica en las neuronas PDF y específicamente durante la adultez demostró la relevancia de las metaloproteasas de matriz (MMPs) en el fenómeno de plasticidad estructural. La sobreexpresión de cualquiera de las 2 metaloproteasas, MMP1 y MMP2, determinó terminales axonales con menor complejidad y que no presentan oscilaciones diarias. Por el contrario, el silenciamiento de la expresión de ambas MMPs condujo a proyecciones más desplegadas pero que tampoco presentan cambios circadianos (Figuras 3.1, 3.2 y 3.5). Estos resultados indican, por un lado, que la acción de las MMPs promueve una menor complejidad axonal, y, por otro lado, que la acción de MMPs expresadas en el propio circuito PDF resulta relevante para el control del remodelamiento estructural circadiano, aunque no podemos descartar un rol modulador de metaloproteasas expresadas por otras células.

Si bien tanto la modulación de la expresión de MMP1 y MMP2 generó fenotipos a nivel de la plasticidad estructural, los fenómenos celulares afectados por cada metaloproteasa parecen ser diferentes. En el caso de MMP2 además de una reducción de la complejidad consistente a lo largo de toda la proyección, se observó retracción de neuritas principales lo cual determinó terminales axonales más cortas (Figuras 3.3, 3.4 y 3.6). De hecho, si bien existe un grado de redundancia

funcional entre ambas metaloproteasas, se ha observado en varios tejidos que MMP1 y MMP2 conducen a diferentes fenotipos (Miller *et al.*, 2008; Page-McCaw *et al.*, 2003). Estas diferencias son esperables puesto que, a nivel de secuencia nucleotídica, MMP1 y MMP2 de *Drosophila* están más relacionadas con distintas metaloproteasas de humanos que entre sí, sugiriendo que divergieron hace mucho en la evolución de la familia de MMPs. Por otra parte, MMP1 es una proteína de secreción mientras que MMP2 se encuentra inserta en la membrana plasmática y estas diferencias en la localización subcelular podrían implicar distintos sustratos sobre los que actúa cada MMP (Page-McCaw *et al.*, 2003).

Si bien los resultados presentados en esta tesis son los primeros en los que se determina un rol de las metaloproteasas específico en el adulto respecto a la plasticidad neuronal, varios trabajos previos habían asociado la acción de MMPs con fenómenos de remodelamiento estructural. Durante el desarrollo embrionario, MMP2 y en menor medida MMP1 modulan el guiado axonal de motoneuronas (Miller *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2008). Durante la metamorfosis, ambas metaloproteasas ayudarían al podado del árbol dendrítico de neuronas sensoriales C4da (Kuo *et al.*, 2005). Las mismas neuronas C4da remodelan su árbol dendrítico rápidamente en las primeras horas post-eclosión y dicho proceso depende de MMP2. En ese caso, la acción de MMP2 en células epiteliales degrada la membrana basal, permitiendo la redirección de neuritas y elongación de neuritas terminales (Yasunaga *et al.*, 2010). Por último, cabe recalcar que el uso de minociclina, una droga que inhibe la acción de metaloproteasas en mamíferos, rescata fenotipos estructurales en las terminales dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* de moscas *dfmr1* (Siller & Broadie, 2011).

Además del rol de las metaloproteasas, los experimentos de interacción génica realizados en esta tesis demuestran que Fasciclina 2 (Fas2) y el receptor de Ecdisona (EcdR) son necesarios para los cambios estructurales de las terminales axonales de las *s-LN<sub>v</sub>s*. En el caso de Fas2 el ARNi utilizado no generó un defecto estructural *per se* pero sensibilizó al sistema permitiendo un rescate parcial del defecto estructural generado por la sobreexpresión de MMP1 (Figura 3.10). Esta falta de fenotipo con la línea de ARNi por si sola sugeriría que con esa línea no se logró una reducción grosera de los niveles de Fas2. En ese caso, sería interesante utilizar otras líneas de ARNi contra Fas2 y analizar si generan defectos sobre la plasticidad estructural por si solas. En cuanto al receptor de Ecdisona, la reducción conjunta de la expresión de todas las variantes del receptor (EcdR-A, B1, B2 y C) condujo a un detenimiento de las oscilaciones estructurales y fijó la estructura en su grado de mayor complejidad (Figura 3.11). Durante la metamorfosis, la activación del receptor B1 de Ecdisona en las neuronas

Cada desencadena el remodelamiento del árbol dendrítico a través de un complejo mecanismo que implica el corte de las dendritas por la maquinaria de degradación proteica por ubiquitinación (UPS) y la degradación de los restos de neuritas por metaloproteasas actuando desde el espacio extracelular (Kuo *et al.*, 2005). Sería interesante analizar si la acción sobre el remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>v</sub>s* depende de algún subtipo de receptor de Ecdisona en particular así como también analizar si existe una modulación circadiana sobre la actividad de la vía río abajo del receptor. A favor de esta hipótesis, varias proteínas inducidas por Ecdisona están más representadas a nivel de ARNm al principio de la noche respecto del inicio del día en los somas de las *s-LN<sub>v</sub>s* (Kula-Eversole *et al.*, 2010).

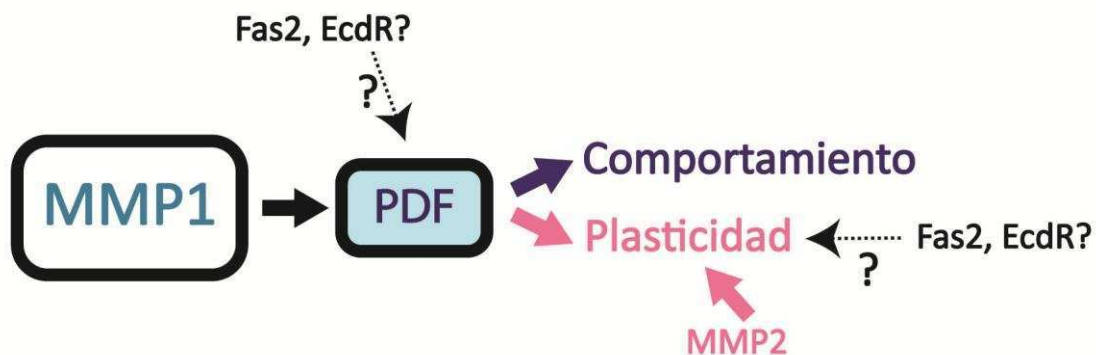
Además de las diferencias a nivel de estructura entre moscas con alteraciones en la expresión génica de MMP1 y MMP2, los niveles de PDF en las terminales fueron también diferencialmente afectados. En el caso de MMP1, la sobreexpresión condujo a una reducción grosera de los niveles del neuropéptido mientras que el silenciamiento de MMP1 fijó los niveles altos comparables a los niveles de la mañana de moscas controles. En cambio, la sobreexpresión de MMP2 afectó solo levemente los niveles del neuropéptido en las terminales mientras que el silenciamiento no produjo ninguna alteración evidente (Figuras 4.1 y 4.2). Varias cuestiones interesantes surgen de estos experimentos. Por un lado, nuestros resultados obtenidos con la expresión de ANF-GFP sugieren que uno de los mecanismos detrás del efecto sobre el neuropéptido sería un aumento de la liberación del neuropéptido promovido por la sobreexpresión de MMP1 (Figura 4.5). Una acción más directa como ser la degradación de PDF por parte de MMP1 está siendo actualmente analizada a través de ensayos *in-vitro*.

Otra cuestión interesante es que, a pesar de la gran reducción de los niveles de PDF en moscas que sobreexpresan MMP1, los animales son mayoritariamente rítmicos en el paradigma de actividad locomotora. La relevancia del neuropéptido en la ritmicidad comportamental proviene del análisis de moscas completamente nulas para PDF o del silenciamiento con ARNi que reduce casi a cero la expresión de PDF (Renn *et al.*, 1999; Shafer & Taghert, 2009). La situación que genera la sobreexpresión de MMP1 es menos drástica puesto que hay una reducción grande en las terminales pero se siguen expresando bajos niveles del neuropéptido. En ese sentido, nuestros resultados corroboran que niveles muy bajos del neuropéptido son suficientes para determinar un patrón locomotor rítmico.

Finalmente, el fenotipo abrogado de la sobreexpresión de MMP1 pudo ser completamente rescatado por la expresión de PDF (Figura 4.6). Sumado a eso, la expresión de un ARNi contra PDF

expresado específicamente en el adulto genera fenotipos de reducción de complejidad y pérdida de oscilaciones diarias similares a los generados por la sobreexpresión de MMPs (dato no mostrado. Lic. EA Gorostiza). Estos dos resultados demuestran que el neuropéptido PDF modula el remodelamiento de sus propias terminales axonales.

Nuestros resultados sugieren entonces que MMP1 modularía los niveles del neuropéptido en las terminales dorsales. Un nivel mínimo de PDF en las terminales es requerido para controlar el comportamiento locomotor mientras que niveles mayores serían requeridos para el control de la plasticidad estructural circadiana. A su vez, río abajo de la acción del neuropéptido, MMP2 también asistiría al remodelamiento axonal diario promoviendo una reducción general de la complejidad a lo largo de toda la terminal así como también afectando el largo de neuritas principales. La acción de Fas2 y EcdR también es requerida aunque los experimentos realizados en esta tesis no permiten determinar si su acción es río arriba o abajo del neuropéptido PDF (Figura D2).



**Figura D2:** Resumen gráfico de los resultados obtenidos respecto a los mecanismos moleculares de la plasticidad estructural circadiana. MMP1 modula los niveles de PDF en las proyecciones axonales y el neuropéptido es relevante para el comportamiento y para la plasticidad. “Comportamiento” se refiere a la ritmicidad de la actividad locomotora y “Plasticidad” se refiere al remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>v</sub>s*. Fas2 y EcdR actúan en conjunto con MMP1 para modular la plasticidad estructural aunque no se analizó si la acción es río arriba o abajo de la modulación de los niveles de PDF en las terminales. La acción de MMP2 sobre la plasticidad estructural ocurriría sin afectar groseramente los niveles del neuropéptido.

#### Coordinación de señales eléctricas y moleculares en el control del remodelamiento axonal diario

Sumado al rol de las metaloproteasas, Fas2, EcdR y el neuropéptido PDF, en el primer capítulo de esta tesis se probó que el silenciamiento eléctrico altera el grado de complejidad de las terminales axonales aun sin afectar las oscilaciones circadianas de la estructura. En ese sentido, claves eléctricas y moleculares deben integrarse para determinar el grado de arborización de las *s-LN<sub>v</sub>s* a lo largo del

día. A continuación se presenta una tabla resumiendo los efectos a nivel de plasticidad estructural y niveles de PDF en las terminales en los experimentos realizados en esta tesis junto a datos de bibliografía y datos generados en el laboratorio (Tabla D1).

Alteración en el circuito PDF	PDF en la proyección	Complejidad de terminales axonales
<b>Actividad eléctrica</b>		
BAJA (KIR2.1)	Baja y cte.	Menor pero oscila
ALTA (NachBac)	Alta y cte <sup>1</sup> .	N.D.
<b>MMP1</b>		
BAJO	Alto y cte.	Alta y cte.
ALTO	Bajo y cte.	Baja y cte.
<b>MMP2</b>		
BAJO	Normal	Alta y cte.
ALTO	Medio y cte.	Baja y cte.
<b>PDF</b>		
BAJO	Casi nulo	Baja y cte <sup>2</sup> .
ALTO	N.D.	N.D.
<b>EcdR</b>		
BAJO	N.D.	Alta y cte.
ALTO	N.D.	N.D.
<b>Fas2</b>		
BAJO	N.D.	Normal (pero sensibiliza)
ALTO	N.D.	N.D.

**Tabla D1: Resumen del efecto sobre la plasticidad estructural y los niveles de PDF en las proyecciones de alteraciones a nivel de actividad eléctrica y de expresión de moléculas en el circuito PDF.** La actividad eléctrica baja se refiere al silenciamiento por expresión de KIR2.1 específicamente en el periodo adulto, mientras que la actividad eléctrica alta corresponde a la expresión de NachBac desde el inicio del desarrollo (Nitabach *et al.*, 2006). Para las moléculas MMP1, MMP2, PDF, EcdR y Fas2, “alto” se refiere a la sobreexpresión y “bajo” al silenciamiento por ARNi, ambas alteraciones restringidas al periodo adulto. <sup>2</sup>Dato generado por el Licenciado E. Axel Gorostiza. N.D.: No Determinado. Cte.: constante.

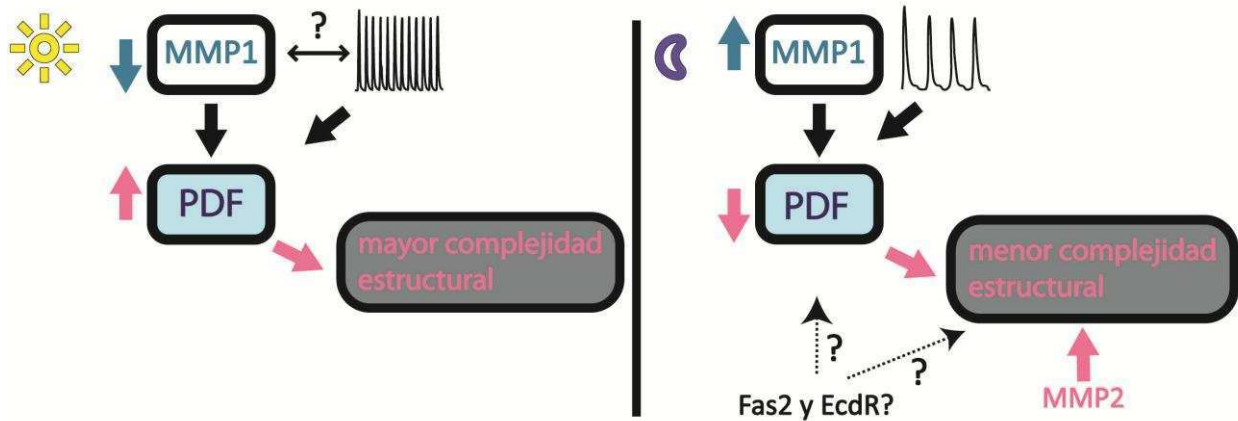
Como se observa en la Tabla D1 la actividad eléctrica determina los niveles y oscilación del neuropéptido PDF. Cuando la actividad eléctrica es alta los niveles de PDF también lo son, mientras que cuando la actividad eléctrica es baja los niveles están también reducidos. Además existe una correlación entre el grado de actividad eléctrica, los niveles de MMP1, los niveles de PDF en la terminal y la complejidad de las arborizaciones. Cuando se reduce la expresión de MMP1 o se hiperexcita la membrana (por medio de la expresión de NachBac) se observan niveles altos y constantes de PDF en las terminales y una complejidad axonal mayor (aunque con NachBac no haya



sido analizado hay otros indicios que actividad eléctrica incrementada lleva a terminales dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>s* más complejas). Por el contrario, cuando se aumenta los niveles de MMP1 o se silencia eléctricamente la membrana (por medio de la expresión de KIR2.1) se observan niveles bajos y constantes de PDF y una complejidad axonal menor. Como se comentó anteriormente, las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* se encuentran más despolarizadas al inicio del día (Cao & Nitabach, 2008) y los niveles de MMP1 estarían enriquecidos al inicio de la noche (Kula-Eversole *et al.*, 2010). Por otra parte, en mamíferos la acción de algunas metaloproteasas es modulada por la actividad eléctrica y, a su vez, la actividad de dichas metaloproteasas modula la liberación sináptica (Restituto *et al.*, 2011). Sería interesante evaluar si alteraciones en la actividad eléctrica de las neuronas PDF altera los niveles de expresión de MMP1.

En ese contexto, proponemos un modelo en donde durante el día alta excitabilidad neuronal acompañada de bajos niveles de expresión de MMP1 determinan altos niveles de PDF en las terminales y mayor complejidad del árbol axonal. En cambio, durante la noche, altos niveles de MMP1 junto con menor excitabilidad determinan bajos niveles de PDF y en consecuencia, menor complejidad axonal. Sin embargo, como se discutió anteriormente, no toda la plasticidad estructural dependería de los niveles de PDF. La acción de Fas2 y EcdR podrían estar río arriba o río abajo de la modulación de los niveles del neuropéptido. Más aun, MMP2 muestra un efecto independiente de los niveles de PDF puesto que la expresión del ARNi determinó una complejidad axonal mayor y constante en el tiempo sin afectar los niveles u oscilación del neuropéptido en las terminales. En ese sentido, MMP2 actuaría río abajo de las modulaciones sobre los niveles del neuropéptido en las terminales (Figura D3).

Finalmente, la actividad eléctrica constituye un factor modulador del grado general de complejidad de las terminales pero, como se discutió antes, las oscilaciones estructurales no dependerían de oscilaciones en la actividad de membrana. En ese sentido, los cambios circadianos en los niveles de expresión de MMP1, sumado a otros factores, podrían ser responsables de las oscilaciones diarias en la complejidad axonal.



**Figura D3: Modelo propuesto para la regulación circadiana del remodelamiento axonal de las *s-LN<sub>v</sub>*.** La flecha bidireccional entre la actividad eléctrica y MMP1 indica una posible coordinación de ambos procesos. Los efectos de MMP1 sobre la plasticidad estructural son dependientes de la modulación de los niveles de PDF en la terminal mientras que el efecto de MMP2 está río abajo del neuropéptido. La actividad eléctrica regula el nivel general de complejidad axonal aunque no es necesaria para determinar las oscilaciones circadianas de la estructura. La acción de Fas2 y EcdR podría estar río arriba o debajo de la modulación del neuropéptido aunque dado la función de Fas2 se esperaría una acción más directa sobre la determinación de la estructura.

#### Relevancia funcional de la plasticidad estructural.

Una de las hipótesis de trabajo de esta tesis era que la plasticidad estructural circadiana determina cambios diarios en los contactos sinápticos de las neuronas marcapaso. Utilizando la aproximación con la técnica de GRASP se determinaron contactos sinápticos en la larva entre 2 pares de neuronas del ganglio subesofágico y las proyecciones dorsales de las *s-LN<sub>v</sub>* (Gong *et al.*, 2010). Por otra parte, en el cerebro adulto se utilizó la técnica de GRASP para estudiar los contactos sinápticos entre neuronas octopaminérgicas y las *l-LN<sub>v</sub>* (Shang *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta el momento no se conoce ninguno de las neuronas postsinápticas a las neuronas *s-LN<sub>v</sub>* en el adulto.

La reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de un cerebro adulto de *Drosophila* indica la presencia de vesículas claras pequeñas asociadas a sitios de liberación presináptica a lo largo de la proyección dorsal. Llamativamente, el neuropéptido PDF se encuentra completamente excluido de estas vesículas asociadas a sitios presinápticos indicando, por un lado, que el neuropéptido no se libera en las sinapsis y, por el otro, la existencia de un neurotransmisor clásico aun no descrito liberado por las neuronas *s-LN<sub>v</sub>* (Yasuyama & Meinertzhagen, 2010). Por otra parte, la expresión de marcadores fluorescentes pre y postsinápticos en el circuito PDF sugieren que los sitios presinápticos

de las *s-LN<sub>v</sub>s* se encuentran mayoritariamente en las proyecciones dorsales mientras que los postsinápticos se localizan en protusiones tipo espinas dendríticas en neuritas cercanas al núcleo en la médula accesoria (Helfrich-Forster *et al.*, 2007; Nicolai *et al.*, 2010). Más allá de estos estudios, la identidad del neurotransmisor que expresa las neuronas PDF<sup>18</sup> así como la de las neuronas postsinápticas aun no ha sido revelada. En ese sentido, al iniciar este trabajo de tesis nos enfrentamos con el desafío de evaluar la validez de nuestra hipótesis de cambios circadianos en la conectividad sin conocer plenamente la naturaleza neuroquímica de las neuronas pre y postsinápticas.

A lo largo de esta tesis se realizó un *screen* de neuronas postsinápticas a las *s-LN<sub>v</sub>s* por medio de la técnica de GRASP y, apoyando la hipótesis inicial, encontramos circuitos neuronales que presentan oscilación circadiana en la señal de reconstitución de GFP (Figuras 2.8 y 2.9). Cabe destacar que esta técnica permite estudiar si dos grupos de neuronas están conectadas sinápticamente por el análisis de la cercanía de sus membranas pero no permite identificar la direccionalidad del contacto, es decir qué neurona es pre y cuál es postsináptica, así como tampoco garantiza la funcionalidad de la sinapsis evidenciada. Como se explicó anteriormente, el análisis de ultraestructura y la expresión de marcadores fluorescentes de compartimentos neuronales indican que los sitios presinápticos de las *s-LN<sub>v</sub>s* se encuentran en la proyección dorsal por lo que se analizaron circuitos postsinápticos a las *s-LN<sub>v</sub>s* centrándonos en las líneas que dieron señal de reconstitución en dicha proyección. La validación funcional de las sinapsis identificadas con la técnica de GRASP es un asunto aun pendiente que estamos tratando de abordar utilizando una estrategia recientemente publicada. Utilizando los mismos 2 sistemas binarios de expresión heterólogo usados en el GRASP, se puede expresar un receptor de ATP en las neuronas PDF y un sensor de calcio en las supuestas neuronas postsinápticas. La aplicación de ATP en un baño donde se encuentra el explanto del cerebro activará el receptor en las neuronas PDF depolarizándolas y, si los dos grupos neuronales están efectivamente conectados a través de una sinapsis funcional, se esperaría obtener un cambio en la señal de calcio en la neurona postsináptica (Yao *et al.*, 2012). Actualmente se está poniendo a punto dicha estrategia en nuestro laboratorio para validar alguno de los hits obtenidos en el *screen*.

Uno de los resultados que más nos llamó la atención fue el de una línea del *screen* que dio señal positiva de reconstitución específicamente al principio de la noche (Figura 2.9). En líneas generales, la

---

<sup>18</sup> La Dra. Lía Frenkel en nuestro laboratorio se encuentra actualmente trabajando en la identificación del neurotransmisor que liberan las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* así como analizando su relevancia funcional.

conectividad de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* es mayor al inicio de la mañana que al inicio o final de la noche, lo cual va acompañado de un despliegue mayor del árbol axonal a la mañana y menor a la noche. Por este motivo, nosotros esperábamos que aquellas neuronas que contactaran a las *s-LN<sub>v</sub>s* específicamente en un momento del día lo hicieran particularmente a la mañana. El hecho de haber encontrado un ejemplo de neuronas que contactan solamente al inicio de la noche nos resultó sumamente interesante.

Por otra parte, dada la cantidad de transgenes y la necesidad de usar dos sistemas de expresión heterólogo independientes para analizar los contactos por GRASP, resultó imposible estudiar si la conectividad se alteraba en mutantes que no muestran plasticidad estructural circadiana (como ser, sobreexpresión o silenciamiento de MMPs en el circuito PDF). En ese sentido, si bien en esta tesis se demostró la existencia de cambios circadianos de la conectividad de las neuronas *s-LN<sub>v</sub>s* no se pudo analizar si estos cambios eran una consecuencia del remodelamiento axonal diario. En experimentos futuros se podría evaluar dicha hipótesis de manera indirecta estudiando si las oscilaciones de la señal de BRP se ven afectadas en mutantes que no despliegan cambios estructurales diarios.

Otra de las hipótesis principales de esta tesis era que la plasticidad estructural circadiana constituye un mecanismo clave para el control del comportamiento locomotor. En contra de esta hipótesis, alteraciones en la expresión génica de metaloproteasas que afectan radicalmente el remodelamiento axonal diario de las *s-LN<sub>v</sub>s* presentan un patrón locomotor claramente rítmico (Figuras 3.7, 3.8 y 3.9). Cabe aun la posibilidad que los cambios en el grado de ramificación del árbol axonal sean relevantes para el control del comportamiento locomotor en otras condiciones ambientales o distintos contextos genéticos. Un análisis más detallado de la actividad locomotora en diferentes condiciones permitirá refrendar o no la relevancia funcional de la plasticidad estructural en dicho comportamiento. Por otra parte, el silenciamiento de la expresión de MMP1 en el circuito PDF redujo significativamente la ritmicidad poblacional, sugiriendo un rol particular de MMP1 en el control del comportamiento, independiente de su acción sobre la plasticidad estructural y, presumiblemente, dependiente de su acción sobre los niveles del neuropéptido (Figura 3.9).

Además de la actividad locomotora existen varios comportamientos que presentan modulación circadiana. Estos comportamientos dependen del mismo reloj molecular pero en muchos casos no se conoce los circuitos neuronales que actúan de marcapasos. En ese sentido, es posible que las neuronas PDF sean también determinantes para el control de otros comportamientos y que, en esos casos, la plasticidad estructural sí sea relevante. De ser así, el circuito PDF enviaría información

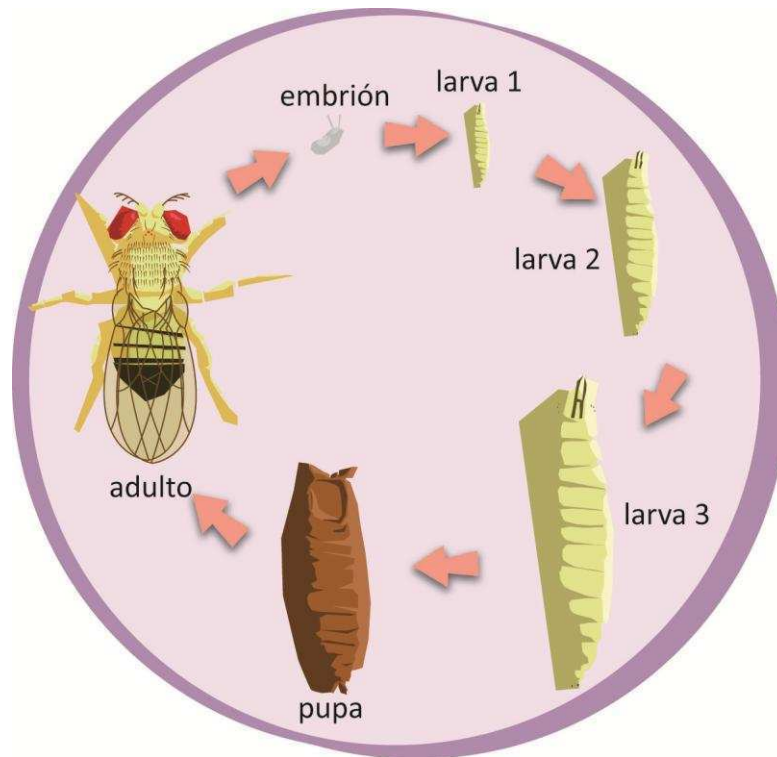
circadiana por medio de la liberación del neuropéptido PDF y modulando de esta manera la actividad locomotora pero también aportaría información temporal a través de sus cambios en la complejidad axonal y esto sería relevante para modular otros procesos circadianos. En el sistema circadiano de mamíferos algunos procesos dependen de vías humorales mientras que otros requieren de conexión sináptica directa y, en consecuencia, se alteran cuando hay cambios morfológicos neuronales. Por un lado, la ritmicidad de la actividad locomotora depende al menos en parte de señales humorales (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 1996) mientras que la regulación circadiana del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal depende de conexiones sinápticas entre neuronas del SCN y de las productoras de GnRH (de la Iglesia & Schwartz, 2006).

Un comportamiento circadiano que podría depender de los cambios morfológicos de las terminales de las *s-LN<sub>v</sub>s* es la formación de memoria a corto término. Aunque las neuronas marcapasos que controlan el ritmo de la formación de memoria a corto término aun no se conocen, existen evidencias de que osciladores centrales en el cerebro de *Drosophila* serían responsables de la modulación circadiana de dicho comportamiento (Lyons & Roman, 2009). Por otra parte, los resultados de esta tesis demuestran las conexiones sinápticas entre las *s-LN<sub>v</sub>s* y los cálices de los cuerpos pedunculados o MB (Figura 2.10). Más aun, una línea que se expresa en un subgrupo de las neuronas de los cálices presentó señal de reconstitución específicamente a ZT14 (Figura 2.9), coincidiendo con el momento del día en el que la formación de memoria a corto término es máxima. En experimentos futuros sería relevante estudiar si la modulación circadiana de la memoria a corto término requiere de la actividad en las neuronas PDF y, más específicamente, si depende de la plasticidad estructural circadiana de las *s-LN<sub>v</sub>s*.

En conclusión, el presente trabajo de tesis pone en evidencia la complejidad de las vías de salidas desde las neuronas marcapasos centrales. Diversos mecanismos, como por ejemplo, cambios en la actividad eléctrica, modulación de expresión de metaloproteasas, regulación de los niveles del neuropéptido y cambios morfológicos de las terminales axonales, se ponen en juego para la transmisión de la información temporal. La coordinación de estas señales, sumado a la actividad conjunta de toda la red neuronal circadiana, es fundamental para el control circadiano de la fisiología. Un sistema circadiano con varios elementos modulables es lo que determina la enorme plasticidad que necesitan los seres vivos para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio ambiente. En ese sentido, una vez más, el estudio en un organismo modelo “sencillo” como es la mosca *Drosophila* demuestra la enorme complejidad detrás de los procesos biológicos.

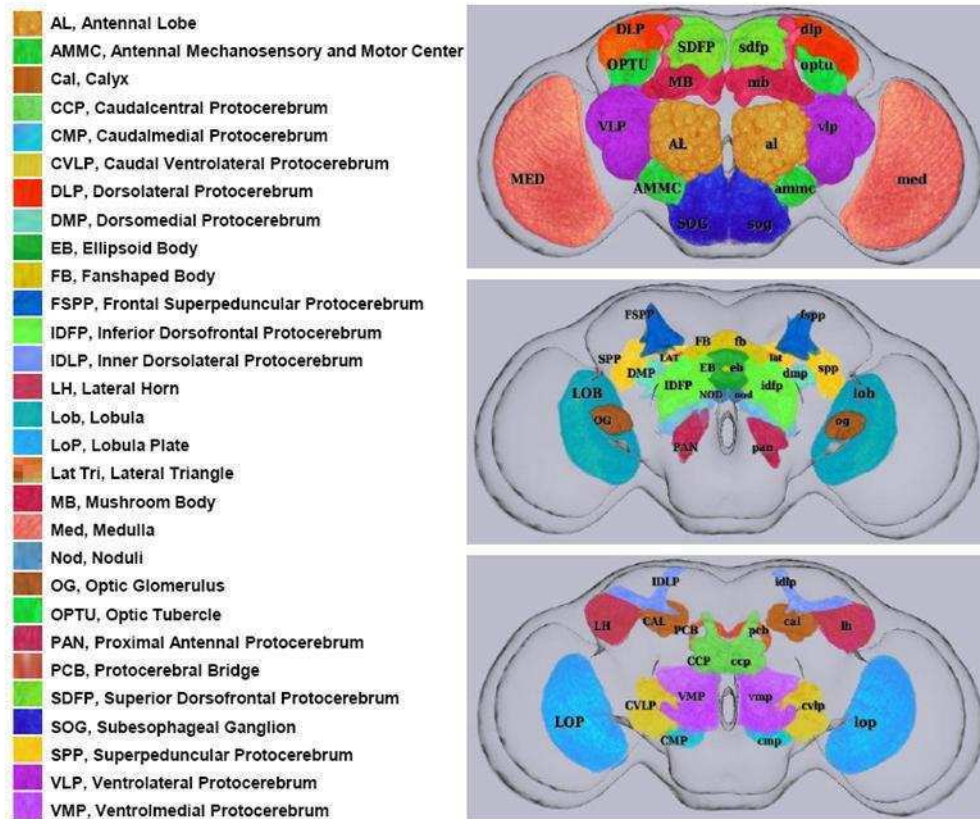
*Anexos*

## ANEXO I



**Anexo 1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Como todo insecto holometábolo, *Drosophila* sufre metamorfosis completa pasando por varios estadios fácilmente diferenciables. La duración de su ciclo de vida depende de la temperatura externa, siendo de 11 días a 25 °C mientras que a 18 °C el tiempo de desarrollo se duplica. Brevemente, a partir de los huevos fecundados se desarrolla un embrión que al día pasa a un estadio de larva 1, que 24 horas después pasa a larva 2 y al día siguiente larva 3. Luego, la larva 3 comienza a pupar y el estadio de pupa dura 4 días más hasta completarse el desarrollo dando lugar al adulto farado. Finalmente, el adulto farado emerge, la mosca despliega sus alas y puede vivir unos 60 días más. En el esquema el adulto mostrado corresponde a un macho.

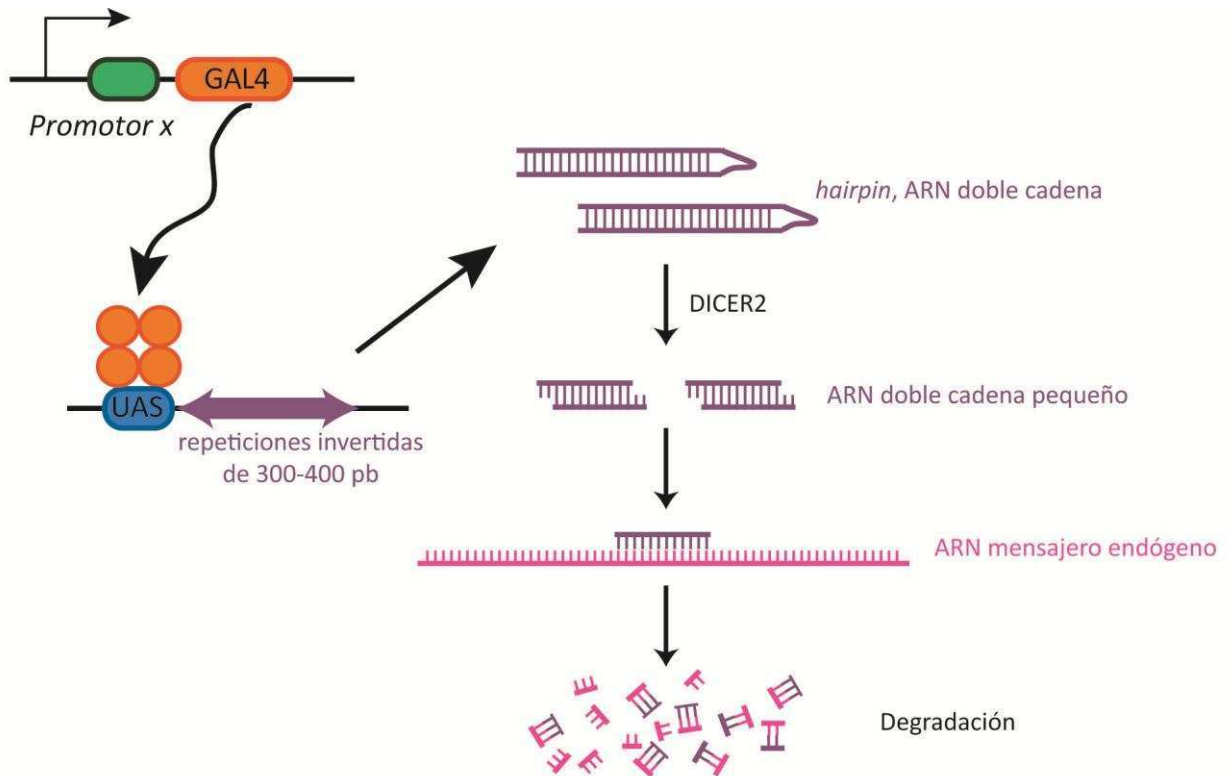
## ANEXO 2



**Anexo 2: Esquema de los neuropilos de *Drosophila*.** Las imágenes representan cortes frontales a distintas alturas del cerebro de la mosca y se esquematizan los distintos neuropilos en código de colores. Figura tomada de (Chiang *et al.*, 2011). Para un esquema interactivo de las distintas regiones del cerebro de *Drosophila* visite la página web de Virtual Fly Brain (<http://www.virtualflybrain.org/site/stacks/index.htm>).



### ANEXO 3



**Anexo 3: Esquema de la estrategia de silenciamiento de las líneas de ARNi de la colección de VDRC.** Brevemente, la librería de VDRC fue construida por medio del clonado de secuencias génicas cortas (300-400 pares de bases) como repeticiones invertidas en la orientación sentido-antisentido bajo el control de la secuencia reguladora UAS (vector pUAST PMF3, que tiene 10 copias del sitio UAS). Una vez aportada la fuente de GAL4 (en el esquema bajo la regulación del *Promotor X*) el UAS dirige la expresión de estas repeticiones invertidas, se genera un ARN doble cadena el cual es procesado por DICER2 en *siRNA* (ARN doble cadena pequeño); estos *siRNA* separan sus dos hebras y la maquinaria de silenciamiento los dirige contra la secuencia específica del ARN mensajero endógeno finalizando con la degradación del mensajero (Dietzl *et al.*, 2007). El centro repositor VDRC generó 2 colecciones, GD y KK, entre las que tienen representado el 97% del genoma de *Drosophila*. Las líneas empleadas en esta tesis corresponden a la colección GD.

# *Bibliografía*

Appelbaum, L., Wang, G., Yokogawa, T., Skariah, G.M., Smith, S.J., Mourrain, P., and Mignot, E. (2010). Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron* 68, 87-98.

Arikkath, J., and Reichardt, L.F. (2008). Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31, 487-494.

Ashmore, L.J., and Sehgal, A. (2003). A fly's eye view of circadian entrainment. *J Biol Rhythms* 18, 206-216.

Barth, M., Schultze, M., Schuster, C.M., and Strauss, R. (2010). Circadian plasticity in photoreceptor cells controls visual coding efficiency in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 5, e9217.

Beaucher, M., Hersperger, E., Page-McCaw, A., and Shearn, A. (2007). Metastatic ability of *Drosophila* tumors depends on MMP activity. *Developmental biology* 303, 625-634.

Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., Francois-Bellan, A.M., and Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56, 294-305.

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.

Butz, M., Worgotter, F., and van Ooyen, A. (2009). Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res Rev* 60, 287-305.

Cao, G., and Nitabach, M.N. (2008). Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons. *J Neurosci* 28, 6493-6501.

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.

Chen, D.M., Christianson, J.S., Sapp, R.J., and Stark, W.S. (1992). Visual receptor cycle in normal and period mutant *Drosophila*: microspectrophotometry, electrophysiology, and ultrastructural morphometry. *Visual neuroscience* 9, 125-135.

Chiang, A.S., Lin, C.Y., Chuang, C.C., Chang, H.M., Hsieh, C.H., Yeh, C.W., Shih, C.T., Wu, J.J., Wang, G.T., Chen, Y.C., *et al.* (2011). Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution. *Curr Biol* 21, 1-11.

Claridge-Chang, A., Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Rajewsky, N., and Young, M.W. (2001). Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32, 657-671.

Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* *81*, 621-629.

Colwell, C.S. (2000). Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* *12*, 571-576.

Colwell, C.S. (2001). NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system. *Eur J Neurosci* *13*, 1420-1428.

de la Iglesia, H.O., and Schwartz, W.J. (2006). Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* *147*, 1148-1153.

De Paola, V., Holtmaat, A., Knott, G., Song, S., Wilbrecht, L., Caroni, P., and Svoboda, K. (2006). Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron* *49*, 861-875.

DeCoursey, P.J., and Krulas, J.R. (1998). Behavior of SCN-lesioned chipmunks in natural habitat: a pilot study. *J Biol Rhythms* *13*, 229-244.

Depetris-Chauvin, A., Berni, J., Aranovich, E.J., Muraro, N.I., Beckwith, E.J., and Ceriani, M.F. (2011). Adult-specific electrical silencing of pacemaker neurons uncouples molecular clock from circadian outputs. *Curr Biol* *21*, 1783-1793.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., *et al.* (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* *448*, 151-156.

Duvall, L.B., and Taghert, P.H. (2012). The circadian neuropeptide PDF signals preferentially through a specific adenylate cyclase isoform AC3 in M pacemakers of *Drosophila*. *PLoS Biol* *10*, e1001337.

Dziembowska, M., and Wlodarczyk, J. (2012). MMP9: a novel function in synaptic plasticity. *The international journal of biochemistry & cell biology* *44*, 709-713.

Eban-Rothschild, A., and Bloch, G. (2012). Social influences on circadian rhythms and sleep in insects. *Adv Genet* *77*, 1-32.

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.

Ewer, J., Frisch, B., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1992). Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J Neurosci* *12*, 3321-3349.

Feinberg, E.H., Vanhove, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., and Bargmann, C.I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* 57, 353-363.

Fernandez, M.P., Berni, J., and Ceriani, M.F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biol* 6, e69.

Fernandez, M.P., Chu, J., Vilella, A., Atkinson, N., Kay, S.A., and Ceriani, M.F. (2007). Impaired clock output by altered connectivity in the circadian network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5650-5655.

Frenkel, L., and Ceriani, M.F. (2011). Circadian plasticity: from structure to behavior. *International review of neurobiology* 99, 107-138.

Frisch, B., Hardin, P.E., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1994). A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 12, 555-570.

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.

Gallarda, B.W., Bonanomi, D., Muller, D., Brown, A., Alaynick, W.A., Andrews, S.E., Lemke, G., Pfaff, S.L., and Marquardt, T. (2008). Segregation of axial motor and sensory pathways via heterotypic trans-axonal signaling. *Science* 320, 233-236.

Giachello, C.N., Montarolo, P.G., and Ghirardi, M. (2012). Synaptic functions of invertebrate varicosities: what molecular mechanisms lie beneath. *Neural plasticity* 2012, 670821.

Glaser, F.T., and Stanewsky, R. (2007). Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 72, 233-242.

Gogolla, N., Galimberti, I., and Caroni, P. (2007). Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr Opin Neurobiol* 17, 516-524.

Goldman, B.D. (2001). Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16, 283-301.

Gong, Z., Liu, J., Guo, C., Zhou, Y., Teng, Y., and Liu, L. (2010). Two pairs of neurons in the central brain control *Drosophila* innate light preference. *Science* 330, 499-502.

Gordon, M.D., and Scott, K. (2009). Motor control in a *Drosophila* taste circuit. *Neuron* 61, 373-384.

Gorostiza, E.A., and Ceriani, M.F. (2013). Retrograde bone morphogenetic protein signaling shapes a key circadian pacemaker circuit. *J Neurosci* 33, 687-696.

Gorska-Andrzejak, J., Makuch, R., Stefan, J., Gorlich, A., Semik, D., and Pyza, E. (2013). Circadian expression of the presynaptic active zone protein Bruchpilot in the lamina of *Drosophila melanogaster*. *Dev Neurobiol* 73, 14-26.

Green, D.J., and Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245, 198-200.

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.

Hall, J.C. (2005). Systems approaches to biological rhythms in *Drosophila*. *Methods in enzymology* 393, 61-185.

Hardin, P.E. (2005). The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr Biol* 15, R714-722.

Harrisingh, M.C., Wu, Y., Lnenicka, G.A., and Nitabach, M.N. (2007). Intracellular Ca<sup>2+</sup> regulates free-running circadian clock oscillation in vivo. *J Neurosci* 27, 12489-12499.

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4, 61-85.

Helfrich-Forster, C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *J Comp Physiol A* 182, 435-453.

Helfrich-Forster, C. (2003). The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech* 62, 94-102.

Helfrich-Forster, C., Shafer, O.T., Wulbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., and Taghert, P. (2007). Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 500, 47-70.

Helfrich, C. (1986). Role of the optic lobes in the regulation of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster*: behavioral analysis of neural mutants. *Journal of neurogenetics* 3, 321-343.

Hermann, C., Yoshii, T., Dusik, V., and Helfrich-Forster, C. (2012). Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 520, 970-987.

Hidalgo, A. (2003). Neuron-glia interactions during axon guidance in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans* 31, 50-55.

Hodge, J.J., and Stanewsky, R. (2008). Function of the Shaw potassium channel within the *Drosophila* circadian clock. *PLoS One* 3, e2274.

Howlader, G., and Sharma, V.K. (2006). Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 52, 779-785.

Husain, Q.M., and Ewer, J. (2004). Use of targetable gfp-tagged neuropeptide for visualizing neuropeptide release following execution of a behavior. *J Neurobiol* 59, 181-191.

Hut, R.A., and Beersma, D.G. (2011). Evolution of time-keeping mechanisms: early emergence and adaptation to photoperiod. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366, 2141-2154.

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., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P., and Rosbash, M. (2007). Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev* 21, 1675-1686.

Kaneko, M., and Hall, J.C. (2000). Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J Comp Neurol* 422, 66-94.

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.

Kaneko, M., Park, J.H., Cheng, Y., Hardin, P.E., and Hall, J.C. (2000). Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioral rhythms. *J Neurobiol* 43, 207-233.

Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005.

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, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release. *Science* 312, 1051-1054.

Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2112-2116.

Kremer, M.C., Christiansen, F., Leiss, F., Paehler, M., Knapek, S., Andlauer, T.F., Forstner, F., Kloppenburg, P., Sigrist, S.J., and Tavosanis, G. (2010). Structural long-term changes at mushroom body input synapses. *Curr Biol* 20, 1938-1944.

Krishnan, B., Dryer, S.E., and Hardin, P.E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400, 375-378.

Kuhlman, S.J., and McMahon, D.G. (2004). Rhythmic regulation of membrane potential and potassium current persists in SCN neurons in the absence of environmental input. *Eur J Neurosci* 20, 1113-1117.

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.

Kula, E., Levitan, E.S., Pyza, E., and Rosbash, M. (2006). PDF cycling in the dorsal protocerebrum of the *Drosophila* brain is not necessary for circadian clock function. *J Biol Rhythms* 21, 104-117.

Kuo, C.T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2005). Dendrite-specific remodeling of *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteases, ubiquitin-proteasome, and ecdysone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15230-15235.

Lear, B.C., Lin, J.M., Keath, J.R., McGill, J.J., Raman, I.M., and Allada, R. (2005a). The ion channel narrow abdomen is critical for neural output of the *Drosophila* circadian pacemaker. *Neuron* 48, 965-976.

Lear, B.C., Merrill, C.E., Lin, J.M., Schroeder, A., Zhang, L., and Allada, R. (2005b). A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron* 48, 221-227.

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.

Lyons, L.C., and Roman, G. (2009). Circadian modulation of short-term memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 16, 19-27.



McKerracher, L., Chamoux, M., and Arregui, C.O. (1996). Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Molecular neurobiology* *12*, 95-116.

Mehnert, K.I., Beramendi, A., Elghazali, F., Negro, P., Kyriacou, C.P., and Cantera, R. (2007). Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. *Dev Neurobiol* *67*, 415-421.

Mehnert, K.I., and Cantera, R. (2008). A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. *Cell Tissue Res* *334*, 103-109.

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.

Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S.I., Markuns, J.F., Lehman, M.N., and Bittman, E.L. (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* *140*, 207-218.

Meyer, M.P., and Smith, S.J. (2006). Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms. *J Neurosci* *26*, 3604-3614.

Miller, C.M., Liu, N., Page-McCaw, A., and Broihier, H.T. (2011). *Drosophila* MMP2 regulates the matrix molecule faulty attraction (Frac) to promote motor axon targeting in *Drosophila*. *J Neurosci* *31*, 5335-5347.

Miller, C.M., Page-McCaw, A., and Broihier, H.T. (2008). Matrix metalloproteinases promote motor axon fasciculation in the *Drosophila* embryo. *Development* *135*, 95-109.

Miyasako, Y., Umezaki, Y., and Tomioka, K. (2007). Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J Biol Rhythms* *22*, 115-126.

Mizrak, D., Ruben, M., Myers, G.N., Rhrissorrakrai, K., Gunsalus, K.C., and Blau, J. (2012). Electrical activity can impose time of day on the circadian transcriptome of pacemaker neurons. *Curr Biol* *22*, 1871-1880.

Mosca, T.J., Carrillo, R.A., White, B.H., and Keshishian, H. (2005). Dissection of synaptic excitability phenotypes by using a dominant-negative Shaker K<sup>+</sup> channel subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3477-3482.

Myers, M.P., Wager-Smith, K., Wesley, C.S., Young, M.W., and Sehgal, A. (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* *270*, 805-808.

Nagoshi, E., Sugino, K., Kula, E., Okazaki, E., Tachibana, T., Nelson, S., and Rosbash, M. (2010). Dissecting differential gene expression within the circadian neuronal circuit of *Drosophila*. *Nat Neurosci* 13, 60-68.

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.

Nicolai, L.J., Ramaekers, A., Raemaekers, T., Drozdzecki, A., Mauss, A.S., Yan, J., Landgraf, M., Annaert, W., and Hassan, B.A. (2010). Genetically encoded dendritic marker sheds light on neuronal connectivity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20553-20558.

Nitabach, M.N., Blau, J., and Holmes, T.C. (2002). Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell* 109, 485-495.

Nitabach, M.N., Sheeba, V., Vera, D.A., Blau, J., and Holmes, T.C. (2005). Membrane electrical excitability is necessary for the free-running larval *Drosophila* circadian clock. *J Neurobiol* 62, 1-13.

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.

Njus, D., Gooch, V.D., Mergenhagen, D., Sulzman, F., and Hastings, J.W. (1976). Membranes and molecules in circadian systems. *Federation proceedings* 35, 2353-2357.

Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., and Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12596-12601.

Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S., and Johnson, C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8660-8664.

Ozkaya, O., and Rosato, E. (2012). The circadian clock of the fly: a neurogenetics journey through time. *Adv Genet* 77, 79-123.

Page-McCaw, A., Serano, J., Sante, J.M., and Rubin, G.M. (2003). *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev Cell* 4, 95-106.

Park, D., and Griffith, L.C. (2006). Electrophysiological and anatomical characterization of PDF-positive clock neurons in the intact adult *Drosophila* brain. *J Neurophysiol* 95, 3955-3960.

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.

Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., and Rouyer, F. (2007). Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS Biol* *5*, e315.

Pittendrigh, C.S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* *55*, 16-54.

Portera-Cailliau, C., Weimer, R.M., De Paola, V., Caroni, P., and Svoboda, K. (2005). Diverse modes of axon elaboration in the developing neocortex. *PLoS Biol* *3*, e272.

Pyza, E., and Meinertzhagen, I.A. (1999). Daily rhythmic changes of cell size and shape in the first optic neuropil in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* *40*, 77-88.

Rao, S., Lang, C., Levitan, E.S., and Deitcher, D.L. (2001). Visualization of neuropeptide expression, transport, and exocytosis in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* *49*, 159-172.

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.

Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* *63*, 647-676.

Restituto, S., Khatri, L., Ninan, I., Mathews, P.M., Liu, X., Weinberg, R.J., and Ziff, E.B. (2011). Synaptic autoregulation by metalloproteases and gamma-secretase. *J Neurosci* *31*, 12083-12093.

Rieger, D., Wulbeck, C., Rouyer, F., and Helfrich-Forster, C. (2009). Period gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila melanogaster* under dim light conditions. *J Biol Rhythms* *24*, 271-282.

Ruthazer, E.S., Li, J., and Cline, H.T. (2006). Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *J Neurosci* *26*, 3594-3603.

Schwartz, W.J., Gross, R.A., and Morton, M.T. (1987). The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1694-1698.

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.

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., 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.

Shang, Y., Haynes, P., Pirez, N., Harrington, K.I., Guo, F., Pollack, J., Hong, P., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2011). Imaging analysis of clock neurons reveals light buffers the wake-promoting effect of dopamine. *Nat Neurosci* 14, 889-895.

Sheeba, V., Gu, H., Sharma, V.K., O'Dowd, D.K., and Holmes, T.C. (2008). Circadian- and light-dependent regulation of resting membrane potential and spontaneous action potential firing of *Drosophila* circadian pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 99, 976-988.

Siller, S.S., and Broadie, K. (2011). Neural circuit architecture defects in a *Drosophila* model of Fragile X syndrome are alleviated by minocycline treatment and genetic removal of matrix metalloproteinase. *Dis Model Mech*.

Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A., and Lehman, M.N. (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810-813.

Siwicki, K.K., Eastman, C., Petersen, G., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1988). Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* 1, 141-150.

Sokolove, P.G., and Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of theoretical biology* 72, 131-160.

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.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.

Stettler, D.D., Yamahachi, H., Li, W., Denk, W., and Gilbert, C.D. (2006). Axons and synaptic boutons are highly dynamic in adult visual cortex. *Neuron* 49, 877-887.

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.

Suter, D.M., and Forscher, P. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 44, 97-113.

Taghert, P.H., and Shafer, O.T. (2006). Mechanisms of clock output in the *Drosophila* circadian pacemaker system. *J Biol Rhythms* 21, 445-457.

Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7728-7733.

Vosshall, L.B., and Young, M.W. (1995). Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron* 15, 345-360.

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.

Webb, A.B., Angelo, N., Huettner, J.E., and Herzog, E.D. (2009). Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16493-16498.

Weber, P., Kula-Eversole, E., and Pyza, E. (2009). Circadian control of dendrite morphology in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 4, e4290.

Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.

Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72, 551-577.

Wheeler, D.A., Hamblen-Coyle, M.J., Dushay, M.S., and Hall, J.C. (1993). Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J Biol Rhythms* 8, 67-94.

Wu, Y., Cao, G., and Nitabach, M.N. (2008a). Electrical silencing of PDF neurons advances the phase of non-PDF clock neurons in *Drosophila*. *J Biol Rhythms* 23, 117-128.

Wu, Y., Cao, G., Pavlicek, B., Luo, X., and Nitabach, M.N. (2008b). Phase coupling of a circadian neuropeptide with rest/activity rhythms detected using a membrane-tethered spider toxin. *PLoS Biol* 6, e273.

Yao, Z., Macara, A.M., Lelito, K.R., Minosyan, T.Y., and Shafer, O.T. (2012). Analysis of functional neuronal connectivity in the *Drosophila* brain. *J Neurophysiol* 108, 684-696.

Yasunaga, K., Kanamori, T., Morikawa, R., Suzuki, E., and Emoto, K. (2010). Dendrite reshaping of adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Dev Cell* 18, 621-632.

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., Wulbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., and Helfrich-Forster, C. (2009). The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *J Neurosci* 29, 2597-2610.

Young, M.W., and Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* 2, 702-715.

Yu, H.H., Huang, A.S., and Kolodkin, A.L. (2000). Semaphorin-1a acts in concert with the cell adhesion molecules fasciclin II and connectin to regulate axon fasciculation in *Drosophila*. *Genetics* 156, 723-731.

Zhang, Y., Liu, Y., Bilodeau-Wentworth, D., Hardin, P.E., and Emery, P. (2010). Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Curr Biol* 20, 600-605.