



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

**Contribución de la vía de BMP al funcionamiento de
la red circadiana en el adulto de *Drosophila
melanogaster***

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

Lic. Sofía Polcowñuk

Directora de tesis: María Fernanda Ceriani

Consejero de Estudios: Arturo Romano

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

Buenos Aires, Noviembre de 2018

Contribución de la vía de BMP al funcionamiento de la red circadiana en el adulto de *Drosophila melanogaster*

Los organismos muestran variaciones rítmicas de su fisiología, metabolismo y comportamiento. Estas oscilaciones, que ocurren cada 24hs, son controladas por un reloj circadiano endógeno y entrenadas por variables ambientales como la luz y la temperatura. En *Drosophila* este reloj está formado por neuronas que en conjunto conforman una red. La sincronización y comunicación entre los distintos grupos de neuronas circadianas tiene que ser precisa para generar un *output* coherente y también debe ser lo suficientemente flexible para poder responder a los cambios ambientales.

Se han estudiado muchos mecanismos que permiten la coordinación entre distintos grupos circadianos; todos ellos involucran neurotransmisores y neuropéptidos. A lo largo de este trabajo se describe otro tipo de comunicación a través de ligandos de la familia de *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*, una vía de señalización retrógrada involucrada en el desarrollo temprano, organogénesis y el crecimiento. Sabiendo que en la placa neuromuscular (NMJ) de la larva de *Drosophila* afecta la sinaptogénesis, la morfología sináptica y el control de la homeostasis se propuso que las LNvs (*large ventral neurons*), consideradas el marcapaso central del reloj, podrían utilizar esta vía para modular *outputs* circadianos como el comportamiento, la plasticidad estructural y niveles de PDF.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo muestran que la vía de BMP es activa en las LNvs. Algunos de sus ligandos son utilizados para comunicar información temporal pudiendo afectar en estadios adultos la actividad locomotora circadiana y generar cambios en la remodelación de las terminales axonales (plasticidad estructural) sugiriendo que es reclutada en diferentes momentos del día para modular *outputs* del reloj.

Palabras claves

Drosophila, comportamiento, actividad locomotora circadiana, plasticidad estructural, ligandos, *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*, P-MAD.

Contribution of the BMP pathway to the operation of the circadian network in adult *Drosophila melanogaster*

Physiology, metabolism and behavior of living organisms show rhythmic variations. These oscillations take place each 24 hours and are driven by a circadian endogenous clock and trained by environmental cues such as light and temperature. In *Drosophila* this clock resides in a group of neurons that together form a network. Synchronization among the different clusters of circadian neurons has to be very accurate to achieve a coherent output but it also has to be flexible to respond to environmental challenges.

A lot of effort has been done to study different mechanisms that ensure coordination among different circadian clusters, most significantly the contribution of neurotransmitters and neuropeptides. Along this work we explored other means of communication, particularly through ligands of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) family. They belong to a retrograde signaling pathway involved in early development, organogenesis and growth. Since this pathway affects synaptogenesis, synaptic morphology and homeostatic control at the neuromuscular junction of the *Drosophila* larva, we postulated that the LNvs (large ventral neurons), central pacemaker neurons, could use this pathway to modulate circadian outputs like behavior, structural plasticity and PDF levels.

Our work reveals that the BMP pathway is active in the LNvs. Some of the ligands are used to communicate temporal information affecting circadian locomotor activity and trigger changes in the remodeling of axonal terminals (structural plasticity) suggesting that this pathway is recruited at different times of the day to modulate clock outputs.

Key words

Drosophila, behavior, circadian locomotor activity, structural plasticity, ligands, *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*, P-MAD.

Agradecimientos

Pocas veces se es consciente de la capacidad de aprender, de los procesos que a lo largo de los años van decantando ese conocimiento y como de a poco uno lo convierte en propio, lo transforma; pero nada de esto ocurriría si no existieran mentores, maestrxs de la vida y de la academia que con su intelecto y claridad pusieran luz y sobre todo mucha paciencia para enseñarnos y guiarnos en el proceso, a veces difícil y frustrante, aunque igualmente grato, que es el desarrollo de un doctorado.

Esta tesis no sería lo que es sin esas personas...

Por ello agradezco en primera instancia a Fernanda mi directora, por creer en mi capacidad de aprender, por recibirme aun sabiendo que era un mundo totalmente desconocido para mí, por confiar en que iba a poder y darme las herramientas para conseguirlo ... por ayudarme y contenerme en momentos que fueron difíciles.

También agradezco a mis compañerxs de laboratorio, a Anas, Lia, Magui, Gio, Toto, Jose y Juan, por las horas compartidas por hacer los momentos en el laboratorio más divertidos y agradables, por hacerse querer y hacerme sentir parte...

En especial a Lía, por la amistad, la contención y el consejo, por ser la mujer que es y acompañarme cuando más lo necesité, y por prestarse como conejito de indias para ser mi alumna (Namaste!).

Agradezco a los chicxs del Flyroom con quien compartimos muchos momentos y que también hacen que todo sea más ameno.

A Andres, parte fundamental de nuestro laboratorio, gracias por la dedicación y por la ayuda y por molestarme casi todos los días...

A mis amigos que me acompañan desde ya hace varios años y los nuevos que conocí en este lugar:

Gracias a Julio por las charlas y por el entendimiento, por estar siempre a pesar de la distancia, a Gise, Lu, a Eze y Joha. A Sole por bancarme y entender mis ausencias y por ser un ejemplo de mujer; a morita por comprender a su madrina y quererla igual a pesar de la ausencia!

A Marce y Kari dos personas hermosas que conocí cuando vine a vivir a este lugar y que se convirtieron en amistades muy preciadas...

Agradecimientos

A Ivi, Marie, Sole y la gente del Leloir con quienes compartimos after labs y unos cuantos caminantes (Juli, Andres, Maxi)

No puedo dejar de agradecer a las instituciones que financiaron mi beca para poder realizar este trabajo, a CONICET; a la Fundación Instituto Leloir por darme el espacio para realizarlo y a la Universidad pública por su formación, a la UBA y en especial a la Universidad Nacional del Comahue y al Centro Regional Bariloche (CRUB), mi pequeña universidad allá por el sur, que supo darme muchas herramientas, gracias a sus profesores y a su gente.

Y Finalmente a mi familia, a mi papá, mi mamá por la contención y el apoyo más allá de la distancia, por el cariño... especialmente a mi hermanita Ludmila, por estar siempre ahí, por entenderme y aceptarme, por mostrarme otra visión, por ser una amiga y compañera de la vida. A mi tía Moira por todas las charlas y el cariño, por enseñarme tanto y a mi madrina Adriana, por ser parte fundamental del inicio de este doctorado, por acompañarme en este viaje, por el consejo y las brujerías...A mi tía Andrea y mi abuela Irma por estar siempre acompañando , por el cariño infinito. A todos ellos y a mis primxs por formar parte de mi vida...

Gracias al Yoga y a la meditación parte fundamental de mi vida, por darme otra perspectiva....

“There is no end to education. It is not that you read a book, pass an examination and finish with education. The whole of life, from the moment you are born to the moment you die, is a process of learning”

Jiddu Krishnamurti

“The Only Thing That Is Constant Is Change –”

Heraclitus

A Baba, mi babushka, por el ímpetu

1	Introducción.....	18
1.1	Los ritmos circadianos.....	18
1.2	El reloj circadiano y sus propiedades	18
1.3	Drosophila melanogaster modelo para el estudio del funcionamiento del reloj	19
1.3.1	Características y componentes moleculares del reloj circadiano en Drosophila	21
1.3.2	El reloj molecular en Drosophila.....	22
1.3.3	El cerebro de Drosophila.....	24
1.4	Plasticidad estructural circadiana	26
1.4.1	La placa neuromuscular (NMJ) en Drosophila: un ejemplo de plasticidad estructural	28
1.5	La vía de señalización BMP	29
1.5.1	Elementos reguladores de la actividad de la vía de BMP	32
1.5.2	Contribución de la vía en la plasticidad sináptica de la placa neuromuscular	33
1.5.3	La vía de BMP y el reloj circadiano en Drosophila.....	34
2	Materiales y Métodos.....	37
2.1	Drosophila, sujeto de estudio	37
2.1.1	Mantenimiento de Stocks.....	37
2.1.2	Nomenclatura de Drosophila	37
2.1.3	Líneas de Drosophila empleadas	38
2.1.4	El sistema GAL4/UAS	40
2.1.5	Cromosomas balanceadores	41
2.1.6	Líneas recombinantes.....	42
2.2	Análisis del comportamiento circadiano	42
2.2.1	Análisis automatizado de la actividad locomotora	42
2.2.2	Cálculo del período de la actividad locomotora	45

2.2.3	Análisis del Índice de anticipación de la tarde (EI).....	45
2.2.4	Análisis estadísticos.....	46
2.3	Análisis inmunohistológicos.....	46
2.3.1	Inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas	46
2.4	Microscopía y procesamiento de imágenes.....	47
2.4.1	Cuantificación de partículas BRP positivas	48
2.4.2	Análisis de los niveles de PDF en las proyecciones dorsales de las sLNvs	48
2.4.3	Análisis de la morfología de las proyecciones de las sLNvs	49
3	Resultados	52
4	Capítulo I: Caracterización de la actividad de la vía de BMP en las neuronas circadianas del adulto de Drosophila	52
4.1	La vía de BMP está activa en las LNvs y en otros grupos de neuronas no circadianas.....	52
4.1.1	La vía puede activarse potencialmente en otros grupos de neuronas circadianas	54
4.2	La vía de BMP podría estar controlada por SGG en la LNvs.....	55
4.3	Las neuronas circadianas expresan una variedad de ligandos de la vía BMP	57
5	Capítulo II: Comunicación a través de la vía de BMP entre neuronas circadianas y su rol en la actividad locomotora	61
5.1	La desregulación específica de los ligandos en grupos de neuronas circadianas genera desconsolidación de la actividad locomotora.....	61
5.1.1	Desregulación de los ligandos de la vía con expresión en las LNvs ...	61
5.1.2	Desregulación de Act β	64
5.1.3	Act β no es necesario para permitir un ajuste de fase de la actividad locomotora.....	65
5.1.4	La desregulación de Act β reduce la anticipación de la tarde	67
5.2	Rol de DPP y GBB en las LNvs.....	69

5.2.1	Las sLNvs y ILNvs utilizan a DPP y GBB cómo parte de la comunicación que permite la consolidación de la actividad locomotora	72
5.2.2	Desregulación adulto-específica de DPP y GBB en las ILNvs	73
5.2.3	Desregulación de DPP y GBB en las sLNvs.....	76
5.3	La activación de la vía por DPP y GBB afecta el periodo de la actividad locomotora	79
6	Capitulo III: La vía de BMP modula propiedades intrínsecas de las neuronas reloj	86
6.1	La sobreexpresión de SHN afecta el número de contactos sinápticos y los niveles de PDF	86
6.2	DPP puede activar la vía de BMP en las sLNvs y modificar sus proyecciones.....	89
6.2.1	La sobreexpresión crónica de DPP afecta la morfología de las proyecciones de las sLNvs	89
6.2.2	La sobreexpresión aguda de DPP es suficiente para afectar la morfología de las proyecciones de las sLNvs	91
6.3	La activación aguda de la vía de BMP afecta los niveles de una proteína del reloj molecular	92
6.4	La sobreexpresión de DPP genera pérdida de la plasticidad circadiana sin cambios en la oscilación en los niveles de PDF	93
6.5	La liberación de DPP desde las sLNvs o las ILNvs tiene efectos diferentes sobre la complejidad de las proyecciones, la plasticidad estructural y los niveles de PDF	95
7	Discusión y conclusiones.....	100
7.1	Las neuronas circadianas expresan distintos ligandos de la vía de BMP y todos son relevantes para la consolidación de la actividad locomotora	101
7.2	La activación crónica de la vía afecta los niveles de PDF	105
7.3	La vía de BMP afecta los contactos sinápticos de las sLNvs.....	106
7.4	La activación de la vía de BMP afecta la plasticidad estructural.....	107
8	Conclusiones.....	112
9	ANEXOS	115

9.1 ANEXO I	115
9.2 ANEXO II	119
9.3 ANEXO III	122
10 Bibliografía	124

1 Introducción

1.1 Los ritmos circadianos

La rotación de la Tierra sobre su propio eje determina cambios en las variables ambientales como la luz y la temperatura que se suceden con un periodo de 24 horas. Los organismos que hoy habitan la Tierra han evolucionado adaptándose a estos ciclos, organizando su comportamiento y fisiología de manera tal de poder anticiparse a estos cambios. Hoy en día las especies ocupan diferentes nichos alrededor de estos ciclos constantes de luz y oscuridad adaptándose también a estas variaciones por ejemplo existen especies diurnas, nocturnas y crepusculares. A estos ritmos que comprenden todos los cambios que se suceden cada 24 horas se los denomina “ritmos circadianos” (del latín, *circa*=alrededor, *diano*=día) y pertenecen al conjunto de los ritmos biológicos. La capacidad de los organismos para entrenarse a estos ciclos se debe a la presencia de un “reloj circadiano” endógeno, capaz de sincronizarse con claves ambientales externas llamadas *zeitgebers* (del alemán, “dador de tiempo”) y que persiste en ausencia de ellas. Este reloj circadiano está presente desde los organismos más simples como las cianobacterias y hongos unicelulares, hasta organismos más complejos como aves, ratones y los seres humanos. A pesar de que actualmente los seres humanos utilizamos relojes externos y claves artificiales para organizar nuestro comportamiento y actividades, nuestra fisiología sigue siendo regulada por un reloj endógeno que se encuentra codificado en nuestro genoma. Con el advenimiento de nuevas tecnologías y los cambios en el estilo de vida, con frecuencia las exigencias sociales generan un constante conflicto con nuestro reloj interno, generando enfermedades asociadas a estos desordenes circadianos. Dado que los principios generales de funcionamiento que subyacen al reloj están conservados evolutivamente, entender los principios que los gobiernan ha estimulado el estudio de éstos en diferentes modelos.

1.2 El reloj circadiano y sus propiedades

Las primeras evidencias de la existencia de un reloj circadiano endógeno fueron el resultado de registros realizados por el francés Jean de Mairan quien observó que la apertura y cierre de las hojas de una planta del género *Heliotropium* ocurría diariamente. Jean de Mairan demostró encerrando a esta planta en un armario que los cambios seguían ocurriendo aún en ausencia de la principal clave ambiental, la luz. A partir de este experimento propuso que las oscilaciones biológicas diarias se sustentan en un proceso endógeno capaz de persistir en condiciones ambientales constantes (De Mairan, 1729).

Otros experimentos han demostrado también en distintos modelos en condiciones más controladas la presencia de estos ritmos y cómo estos son producidos por oscilaciones endógenas (Ferraro et al., 1989; Fuller et al., 1989; Sulzman et al., 1984) siendo esta una de las propiedades principales de los relojes circadianos.

Otra de las características que definen a un reloj circadiano es la capacidad de ser entrenados. Los relojes pueden ser reseteados al exponerlos a estímulos externos como la luz y el calor.

Por último para poder considerar a un reloj como circadiano debe ser capaz de compensar cambios de temperatura dentro de un rango fisiológico, de manera de permanecer "inalterados".

La sumatoria de estas propiedades permite al reloj endógeno no sólo mantener la coherencia en sus oscilaciones, sincronizado con el ambiente, sino también tener la flexibilidad necesaria para adaptarse a los cambios de estaciones donde la duración de las horas de luz y oscuridad así como la temperatura, varían.

1.3 Drosophila melanogaster modelo para el estudio del funcionamiento del reloj

Drosophila melanogaster se utiliza como modelo de herencia genética desde 1910, con el trabajo pionero de Thomas Hunt Morgan, quien recibió un premio Nobel en el año 1933 por dichos estudios. Estos trabajos y otros han alentado la utilización de *Drosophila* como modelo de estudio genético. Seymour Benzer fue quien realizó experimentos que revolucionaron el campo de la genética del comportamiento, estableciendo simultáneamente avances sustanciales en el estudio del comportamiento sexual, de los sistemas sensoriales, el aprendizaje y la memoria, y los ritmos circadianos, entre otros (Benzer, 1971; Vosshall, 2007). Uno de los motivos por los cuales resulta muy atractiva la utilización de *Drosophila* como modelo es que es capaz de desarrollar comportamientos complejos, entre ellos la actividad locomotora circadiana.

Drosophila es un díptero crepuscular perteneciente a la familia Drosophilidae, presenta picos de actividad alrededor de las transiciones entre la noche y el día, denominado el pico de la mañana y entre el día y la noche, denominado el pico del atardecer, y luego una disminución de la actividad durante el mediodía y la noche coincidente con las horas de sueño (Figura 1).

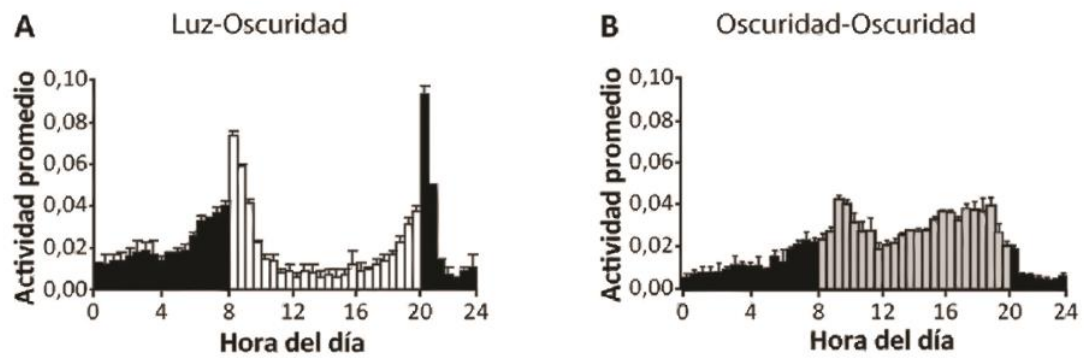


Figura 1. **Perfiles de actividad locomotora de machos silvestres de *Drosophila*.** Las barras negras indican actividad durante la noche (A) o noche subjetiva (B) y las barras blancas y grises actividad durante el día o día subjetivo, respectivamente. Se muestra la actividad promedio en diferentes momentos del día en condiciones de luz y oscuridad, A; en condiciones de oscuridad constante, B, se observa que el patrón de actividad se mantiene aún en ausencia de las claves externas, lo que evidencia la existencia de un reloj endógeno. En el perfil de actividad A se observa un incremento de la actividad en los puntos de las transiciones luz-oscuridad, esto es una respuesta a los cambios en la iluminación que no se observa en condiciones constantes B. Día subjetivo: momento del día donde debería haber luz si es que hubiera claves ambientales. Modificado de (Dubowy y Sehgal, 2017).

Este comportamiento es comandado por el reloj circadiano y es posible observar este patrón de actividad aún en ausencia de claves ambientales, lo que lo convierte en un paradigma muy eficiente para estudiar y evaluar el estado del reloj. En particular, Ron Konopka en el laboratorio de Benzer fue quien utilizó *Drosophila* para identificar genes involucrados en los ritmos circadianos. En el primer trabajo Konopka y Benzer describen tres alelos de un mismo gen, que abarcan los tres fenotipos básicos esperables como resultado de alterar un reloj: período largo, corto y arritmicidad (Figura 2)(Konopka and Benzer, 1971).

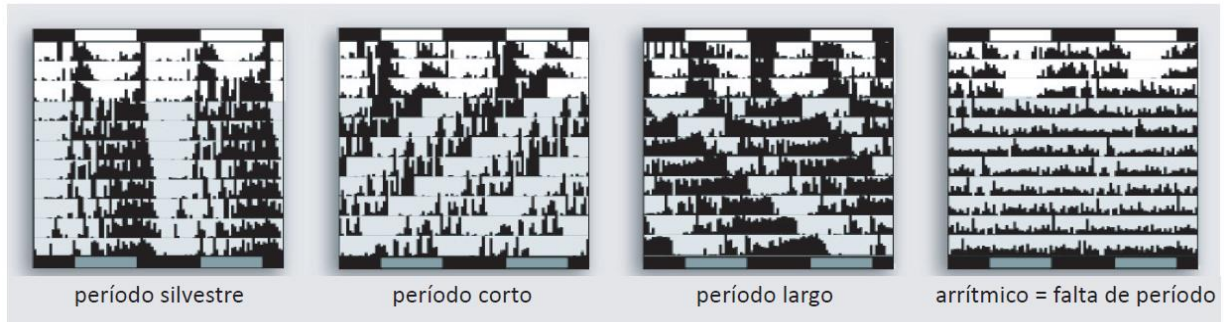


Figura 2. Perfiles de actividad locomotora graficados como actogramas; de izquierda a derecha: ejemplo de individuos con periodo silvestre, período corto, período largo y con falta de período, arrítmicos. Luego de 3 días de entrenamiento bajo ciclos de luz y oscuridad, las moscas se mantienen en condiciones constantes de oscuridad, representadas como un sombreado. Modificado de Muraro y Ceriani (2014).

1.3.1 Características y componentes moleculares del reloj circadiano en *Drosophila*

El reloj circadiano a grandes rasgos puede ser visualizado como un sistema formado por tres dominios; uno de ellos comprende los elementos de entrada al sistema, los *inputs* (componentes exógenos, *zeitgebers*), que permiten la sincronización y entrenamiento del reloj, como la luz, temperatura e interacción social entre otros. Otro de ellos, conformado por un reloj molecular capaz de mantener un ritmo y determinar el periodo endógeno. Este marcapaso central controla los elementos de salida, *outputs* (ritmos circadianos) que reciben la información proveniente del oscilador y regulan distintas funciones biológicas desde la fisiología hasta el comportamiento, comandando el ritmo endógeno del individuo y sincronizando la actividad de osciladores periféricos subordinados en distintos tejidos (Reppert and Weaver, 2001). Actualmente se sabe que los elementos de entrada son capaces de regular y afectar las vías de salida sin afectar el oscilador central modulando los órganos efectores en un proceso denominado enmascaramiento. Por otro lado el oscilador central puede modular los elementos de entrada modificando la sensibilidad de los órganos sensoriales que los reciben (Figura 3).

En *Drosophila* el reloj comprende 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 son las responsables de generar y mantener el periodo endógeno.

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 por parte de componentes canónicos del reloj, hasta la modulación de señales eléctricas, endócrinas y metabólicas que impactan en la fisiología de los tejidos periféricos. Por medio de estas vías de salida, el reloj circadiano modula procesos como los ciclos de actividad y reposo, la temperatura corporal, la síntesis y liberación de hormonas, la habilidad cognitiva, entre otros.

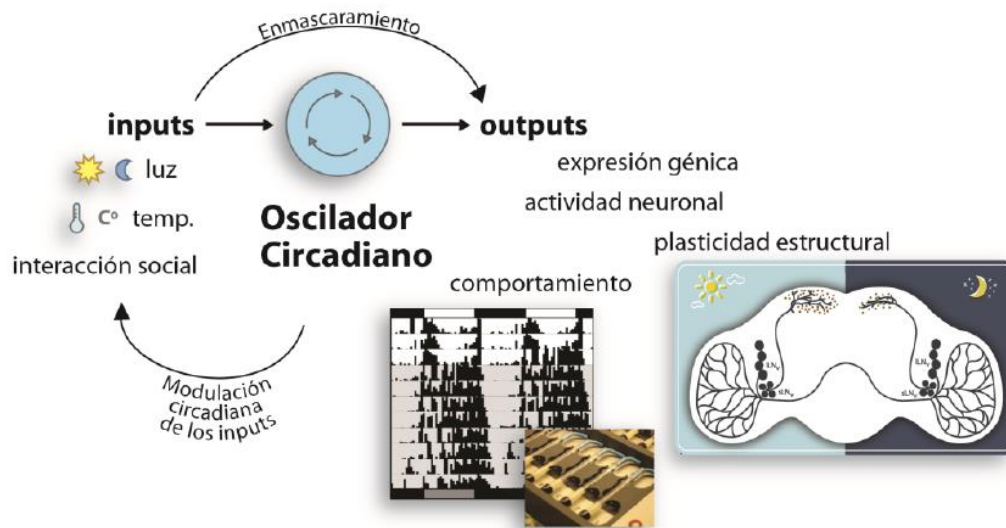


Figura 3. **Esquema sobre el funcionamiento general del reloj circadiano.** Se ilustran los elementos de entrada (“*inputs*”) los que son recibidos por un oscilador central que es capaz de entrenarse y controlar elementos de salida (“*outputs*”). A su vez existen mecanismos por los cuales los elementos de entrada pueden afectar directamente a los de salida, fenómeno que recibe el nombre de enmascaramiento y ser regulados también por el oscilador central.

1.3.2 El reloj molecular en *Drosophila*

El estudio de los procesos regulados por el reloj circadiano en *Drosophila*, y en especial el análisis del comportamiento, ha permitido modelar la existencia de dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa en los que se sustenta el reloj circadiano de *Drosophila* (Allada et al., 1998; Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003; Glossop et al., 1999; Rutila et al., 1998).

Actualmente se propone un primer ciclo donde dos proteínas de unión a ADN estimulan la transcripción de sus propios represores, y retrasos temporales entre la activación y la represión genera las oscilaciones de 24 horas sobre las que se sustenta el reloj. Estas dos proteínas conforman el heterodímero CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) que reconocen las secuencias E-box (por lo general CACGTG) en los promotores de sus genes

blanco para activar la expresión génica. En este primer ciclo de retroalimentación, el heterodímero CLK/CYC activa la transcripción de *timeless (tim)* y *period (per)*, los cuales tienen su pico máximo al inicio de la noche. Las proteínas TIM y PER se acumulan y dimerizan en el citoplasma a lo largo de la noche y translocan al núcleo hacia la medianoche, en un proceso regulado por la proteína quinasa SHAGGY (SGG) (Martinek et al., 2001)). Una vez en el núcleo PER y TIM se unen a CLK/CYC, inhibiendo su unión al ADN y la activación de la transcripción. Esta retroalimentación transcripcional determina el mecanismo por el cual se genera el periodo circadiano (Kadener et al., 2008).

Además de esta regulación a nivel de la transcripción, las modificaciones postraduccionales y la regulación de la estabilidad sobre los componentes de este primer ciclo imponen retrasos temporales entre la activación transcripcional de CLK/CYC y la represión ejercida por TIM y PER. PER es fosforilado por CASEÍNA QUINASA IE (CK1 ϵ)/DOUBLETIME (DBT) y CASEÍNA QUINASA 2 (CK2), mientras que TIM es fosforilado por GLUCOGENOSINTETASA QUINASA 3 β /SHAGGY (GSK3 β /SGG) y CK2. La fosforilación por parte de SGG es de crucial importancia debido a que además de estar involucrada en la estabilidad de TIM (Stoleru et al., 2007), es crucial para la translocación al núcleo del dímero PER/TIM (Martinek et al., 2001), constituyendo por tanto una pieza clave en el establecimiento del período endógeno. A su vez, PER y TIM son sustratos de las fosfatasa PROTEIN FOSFATASA 2A (PP2A) y PROTEIN FOSFATASA 1 (PP1), respectivamente. Las diversas fosforilaciones a las que son sujetas las proteínas PER y TIM conducen a su degradación; en el caso de PER, su fosforilación por parte de DBT dispara su ubiquitinación mediada por la E3 ligasa SUPERNUMERARY LIMBS (SLIMB), lo cual gatilla la degradación por el proteasoma al comienzo del día. La falta de PER libera la represión sobre su propia transcripción dando comienzo a un nuevo ciclo. CLK/CYC también funcionan como activadores transcripcionales de un segundo ciclo entrelazado con el primero, el cual es importante para asegurar la fase y amplitud del oscilador y sus vías de salida. En este ciclo, el dímero CLK/CYC activa directamente la transcripción de *Par domain protein 1 (Pdp1)* y *vrille (vri)*, dos reguladores transcripcionales cuyos productos proteicos se unen al promotor de *clk* pero con funciones opuestas; mientras que VRI inhibe la transcripción de *clk*, PDP1 la estimula. La acumulación retrasada de PDP1 respecto de VRI establece el ritmo de acumulación de *clk*, el cual es antifásico respecto de *per* y *tim* (Figura 4).

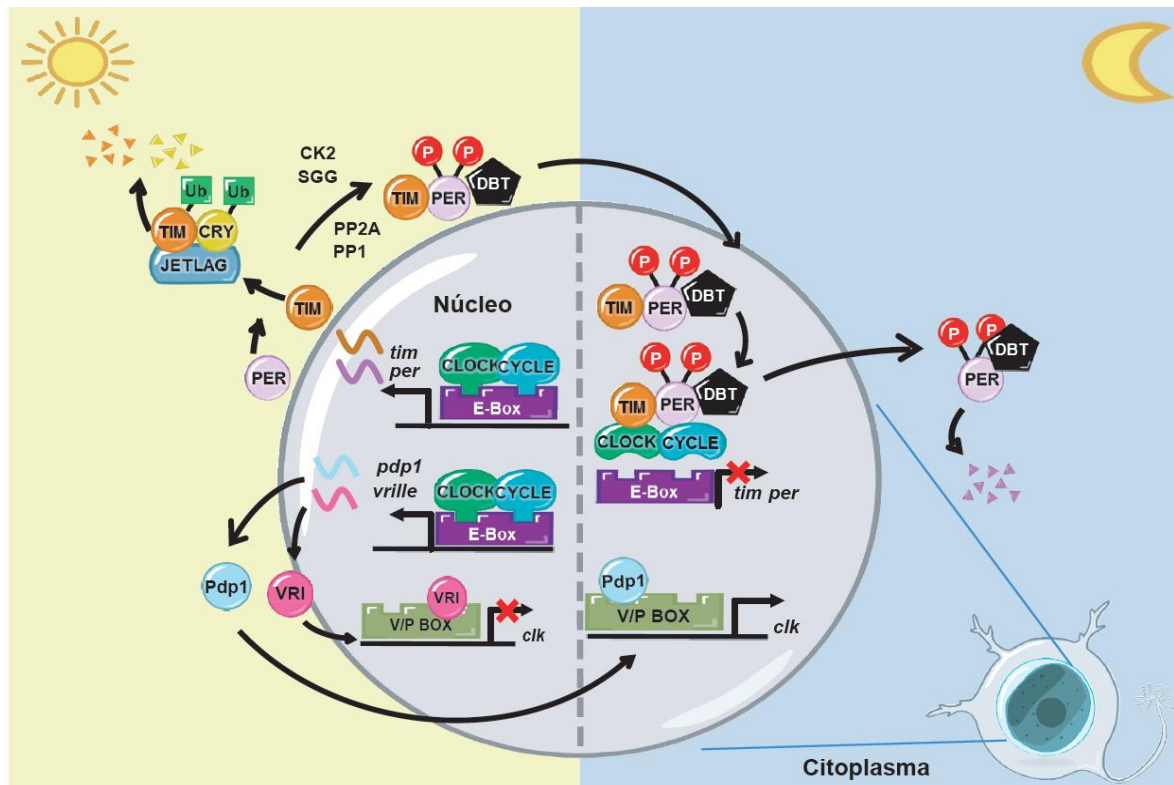


Figura 4. **Mecanismo molecular del reloj circadiano de *Drosophila*.** Se muestran los principales elementos que componen el reloj molecular conformando los dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa. Del lado izquierdo se muestra parte del primer ciclo donde el dímero CLK/CYC se une a secuencias reguladoras para activar la transcripción de *tim* y *per*. Las proteínas TIM y PER dimerizan, son modificadas por fosfatasa (PP2A y PP1) y quinasas (DBT, CK2 y SGG) y translocan al núcleo para unirse a regiones reguladoras de su propio activador. A su vez, como parte del segundo ciclo, durante el día el dímero CLK/CYC activa la transcripción de *vrille* y *pdp1*. La acumulación de VRI está en fase con su transcripto y reprime la transcripción de *clk* mientras que PDP1 estimula su transcripción durante la noche, permitiendo de esta manera regular los niveles del CLK. Gráficos modificados de la UC San Diego BioClock Studio ([CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

1.3.3 El cerebro de *Drosophila*

Este oscilador molecular descrito en la sección anterior, reside en unas 150 neuronas que expresan las proteínas TIM y PER las cuales son nombradas de acuerdo a su tamaño y localización en el cerebro (Figura 5). Así se pueden encontrar dos grandes grupos, las neuronas laterales y las neuronas dorsales (LN y DN respectivamente, por sus siglas en inglés). Las DN se subdividen a su vez en tres subgrupos a cada lado del cerebro, las DN1 (15 neuronas), DN2 (2 neuronas) y DN3 (40 neuronas). Por otro lado, las LN están formadas por cuatro pequeños subgrupos, también ubicados a cada lado del cerebro. Estos

subgrupos están conformados por 3 a 4 neuronas posteriores laterales, 6 neuronas laterales dorsales, 5 neuronas laterales ventrales pequeñas y 4 neuronas laterales ventrales grandes (LPN, LN_d, sLN_v y lLN_v respectivamente, por sus siglas en inglés). De las 5 sLN_v, 4 expresan el neuropéptido *Pigment Dispersing Factor* (PDF), al igual que las lLN_vs; la restante sLN_v es conocida como la quinta sLN_v (5- sLN_v) y no lo expresa. Dentro del grupo de las LNs que expresan el neuropéptido PDF, las sLN_vs se consideran el marcapaso central del reloj, siendo suficientes y necesarias para mantener la actividad locomotora circadiana rítmica en condiciones constantes (Helfrich-Forster, 1998). Los otros grupos de neuronas circadianas son capaces de controlar diferentes outputs del reloj (Murad et al., 2007; Sheeba et al., 2008a; Zhang et al., 2010b) y las oscilaciones moleculares en ellos corren con algunas diferencias respecto del marcapaso central; en conjunto forman una red o circuito de osciladores levemente diferentes que logran determinar y controlar un output suficientemente coherente como para que el periodo circadiano se mantenga en aproximadamente 24hs. Estas diferencias entre los distintos grupos de neuronas circadianas le otorgan al sistema cierta flexibilidad como para poder hacer frente a eventuales cambios ambientales por ejemplo durante la sucesión de estaciones. Hoy se acepta que todos los grupos son necesarios para ajustar de una manera fina la fisiología y el comportamiento.

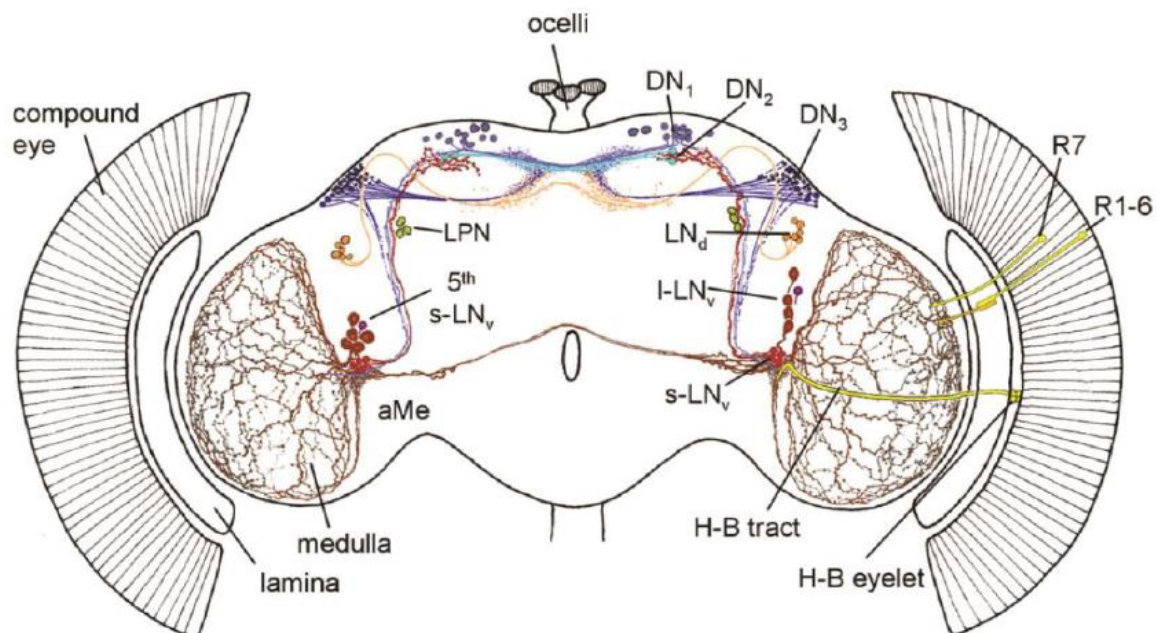


Figura 5. **Neuronas circadianas en el cerebro de un adulto de *Drosophila*.** Esquema del cerebro de *Drosophila* donde se muestran los grupos neuronales que expresan genes relevantes del reloj circadiano. Se representan también las principales estructuras fotorreceptoras capaces de transmitir la información lumínica al reloj endógeno (los rhabdomeros R7 y R1-6 del ojo compuesto, los ocelos, el

H-B eyelet y *H-B tract*). aMe indica la médula accesoria, región donde se ubican los somas de las LNV. PI: *Pars intercerebralis*. Modificado de(Helfrich-Forster et al., 2007).

Si bien todos los grupos circadianos expresan las proteínas reloj fundamentales para el funcionamiento del mismo, existen diferencias en la expresión de otras proteínas como CRY (las neuronas reloj pueden ser CRY+ y CRY-)(Benito et al., 2008; Yoshii et al., 2004), y el tipo de neuropéptidos y de neurotransmisores expresados en cada uno de ellos (Figura 6) (Frenkel et al., 2017(Chung et al., 2009; Dahdal et al., 2010; Hermann et al., 2012; Johard et al., 2009; Taghert, 2001)). Estas moléculas son esenciales para la comunicación entre neuronas reloj. Dado que la comunicación requiere de un ajuste fino entre los distintos grupos de neuronas circadianas, es esperable que varios mecanismos de regulación a nivel de las sinapsis sean reclutados para este fin.

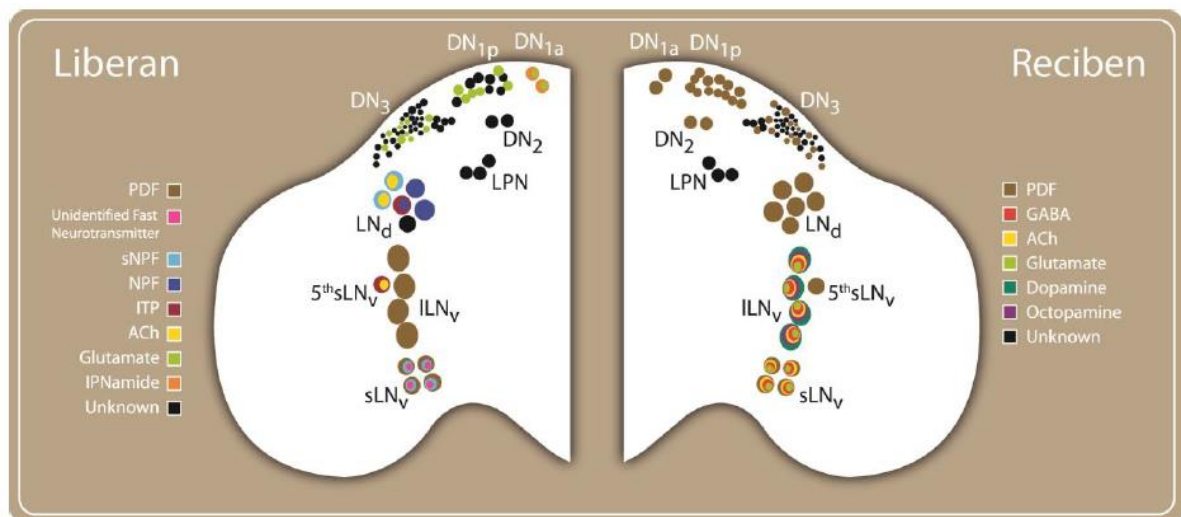


Figura 6. **Caracterización neuroquímica de las neuronas circadianas.** El panel izquierdo muestra los neurotransmisores/neuropéptidos que son liberados por cada grupo circadiano, en el panel derecho los que son recibidos. Los diferentes colores indican diferentes moléculas. NPF (Neuropéptido F), sNPF (*short* NPF), ITP (*ion Transport Peptide*) y Ach (Acetilcolina). El color negro indica que aún no se conoce el contenido peptidérgico de ese grupo o neurona. Modificado de Muraro et al., 2013.

1.4 Plasticidad estructural circadiana

Detrás del control circadiano del comportamiento y de la fisiología subyacen los mecanismos que permiten traducir estos cambios diarios desde el reloj central hacia los otros osciladores y hacia los centros de control de los distintos fenómenos, por ejemplo centros motores. La existencia de un reloj endógeno permite que la comunicación entre los distintos grupos de neuronas circadianas también varíe a lo largo del día; en nuestro laboratorio se han caracterizado algunos de los mecanismos que permiten una

comunicación diferencial, por ejemplo se ha demostrado que las proyecciones dorsales de las sLNvs muestran cambios morfológicos entre el día y la noche (Figura 7) (Fernandez et al., 2008), acompañando los niveles del neuropéptido PDF en dichas terminales (Park et al., 2000). Durante el día las arborizaciones dorsales del circuito se encuentran en una configuración más compleja, caracterizada por un aumento en el número de botones sinápticos, neuritas y la desfasciculación de las neuritas principales. Por la noche, por el contrario, las arborizaciones reducen su complejidad y adoptan una configuración menos desplegada. Esta oscilación en la estructura no puede evidenciarse en mutantes para proteínas centrales del reloj, como *per01* y *tim01* (Fernandez et al., 2008), lo cual indicaría que es un fenómeno controlado por el reloj biológico.

Por otro lado también se ha demostrado que estos cambios en la plasticidad pueden reflejarse en modificaciones en los contactos entre distintos grupos de neuronas por ejemplo, el marcapaso central (sLNvs) es capaz de contactar grupos de neuronas distintas en diferentes momentos (Gorostiza et al., 2014).

Dado que el fenómeno de plasticidad ha sido recientemente caracterizado existen pocos trabajos que hayan estudiado los mecanismos responsables de estos cambios en la complejidad de las proyecciones. Trabajos de otros laboratorios han demostrado que el momento de máxima excitabilidad (Cao and Nitabach, 2008) llamativamente coincide con el momento de máxima arborización de las proyecciones lo que sugiere que este fenómeno podría ser dependiente de la actividad neuronal (Depetris-Chauvin et al., 2011) otro lado hace algunos años se reportó que estos cambios diarios en las terminales de las sLNv resultan de cambios en el grado de fasciculación regulados por el factor de transcripción Mef2 (Sivachenko et al., 2013) y adicionalmente, se ha demostrado que la remodelación depende de cambios en el citoesqueleto de actina (Petsakou et al., 2015) que pueden estar mediados por GTP asas como Rho1 (Blau et al., 2015). 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 y en los patrones de conectividad sináptica.

Dada la complejidad de este fenómeno han de existir otros mecanismos que permitan generar y regular los cambios observados en la complejidad de las terminales: Hasta el momento sólo trabajos de nuestro laboratorio como Herrero et al., 2017 y el presente trabajo han demostrado la existencia de mecanismos capaces de disociar las oscilaciones de PDF y la plasticidad.

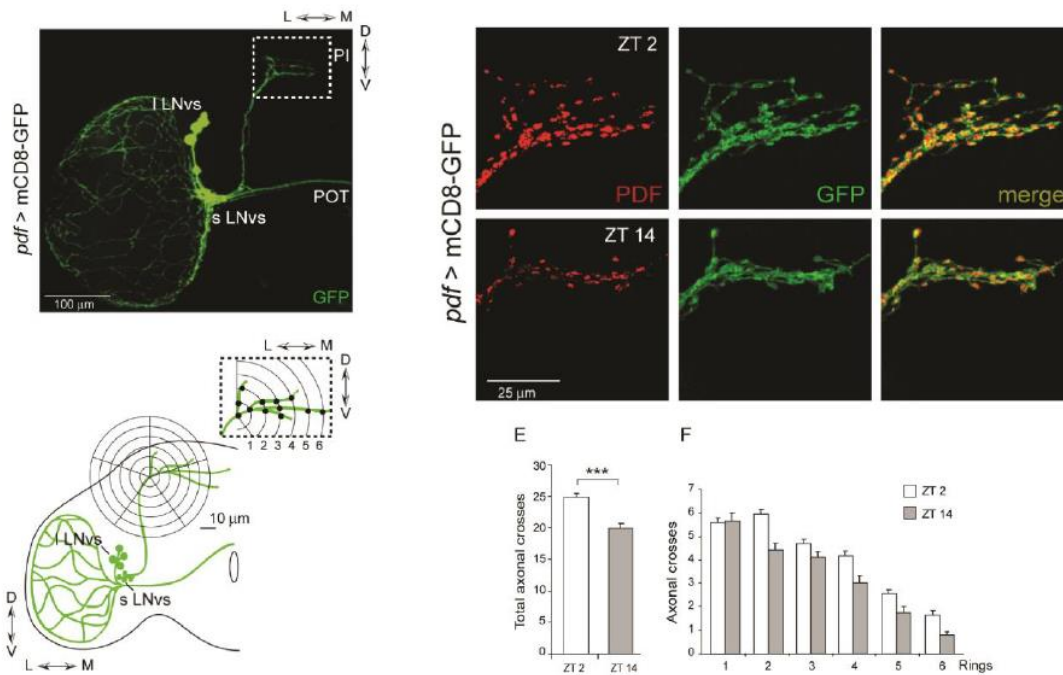


Figura 7. **Remodelación diaria de las proyecciones axonales de las sLNvs.** En las figuras de la izquierda se muestra una imagen confocal representativa (imagen superior) de un hemicerebro de *Drosophila*. En el panel inferior se muestra el método utilizado para cuantificar la complejidad como el número de cruces entre las proyecciones y anillos concéntricos (método de Sholl- incluir cita). De lado derecho se muestran imágenes confocales representativas de dos momentos del día, el principio de la mañana (ZT02) y principio de la noche (ZT14) mostrando las proyecciones de las sLNvs con un marcador de membrana CD8GFP (verde) y el neuropéptido PDF (rojo). E-F Cuantificación del número de entrecruzamientos en los dos momentos del día, donde se observa que la complejidad es menor durante la noche (Fernandez et al., 2008).

1.4.1 La placa neuromuscular (NMJ) en *Drosophila*: un ejemplo de plasticidad estructural

Durante el desarrollo larval el tamaño de la larva aumenta desde su eclosión hasta el comienzo de la pupariación unas 300 veces. Los músculos responsables de los movimientos son inervados por motoneuronas que establecen una sinapsis muy íntima en regiones que determinan la formación de botones sinápticos. Dado que la cantidad de músculo a inervar también aumenta en un proceso que es relativamente rápido, la cantidad de contactos sinápticos debe aumentar en un fenómeno que también puede considerarse como de plasticidad. Varios son los mecanismos reclutados que permiten por un lado mantener la homeostasis entre el músculo y la motoneurona y por el otro generar un aumento en la cantidad de botones sinápticos; estudios realizados en la placa neuromuscular han

demostrado que ligandos pertenecientes a la vía de señalización BMP ("*Bone morphogenetic protein*") son reclutados para activar mecanismos que desencadenen finalmente modificaciones en el citoesqueleto de actina de la motoneurona (Ball et al., 2010; Ellis et al., 2010a; McCabe et al., 2003).

1.5 La vía de señalización BMP

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

Drosophila melanogaster tiene siete miembros de la familia de TGF β . DECAPENTAPLEGIC (DPP) y SCREW (SCW) son homólogos de BMP, y determinan el eje dorsoventral y la diferenciación en diversos tejidos, siendo el ala de la mosca el modelo de estudio más difundido (Affolter and Basler, 2007). Otro homólogo de BMP es GLASS BOTTOM BOAT (GBB), que además de regular el desarrollo del ala está involucrado en el desarrollo del cerebro (Keshishian and Kim, 2004; Marques and Zhang, 2006; Salinas, 2003) y es importante en la homeostasis y desarrollo de la placa neuromuscular de *Drosophila* (Fuentes-Medel et al., 2012). Los ligandos tipo activin son dACTIVIN (ACT β) y DAWDLE (DAW), y cumplen un rol tejido específico, por ejemplo en el desarrollo del sistema nervioso larval (Zhu et al., 2008). A estos cinco ligandos se suman MAVERICK y MYOGLIANIN, que se expresan en células del endodermo y el mesodermo, pero cuya función no ha sido caracterizada en detalle (Lee-Hoeflich et al., 2005; Nguyen et al., 2000), aunque se sabe que MAV cumple un rol importante como ligando liberado desde la glía en la placa neuromuscular (Fuentes-Medel et al., 2012).

	<i>Homo sapiens</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>			<i>Caenorhabditis elegans</i>		
	BMP-like	TGFB-like	BMP-like	TGFB-like	Other	Dauer	Sma/Mab	Other
Ligands	4 ACTIVINs, 10 BMPs, 3 TGFBs, 11 GDFs AMH and NODAL		DPP GBB SCW	ACT β DAW	MAV MYO	DAF-7	DBL-1	TIG-2 TIG-3 UNC-129
Type II receptors	ACVR2A ACVR2B TGFB2 BMP2 AMHR2		PUT WIT			DAF-4		
Type I receptors	ACVRL1 ACVR1 BMP1A BMP1B	ACVR1B TGFB1 ACVR1C	TKV SAX	BABO		DAF-1	SMA-6	
R-Smad	SMAD1 SMAD5 SMAD9	SMAD2 SMAD3	MAD	SMOX		DAF-8 DAF14	SMA-2 SMA-3	
Co-Smad	SMAD4		MED			DAF-3	SMA-4	
I-Smad	SMAD6 SMAD7		DAD			TAG-68		

Tabla 1. **Componentes centrales la vía de TGFb en humanos, *Drosophila* y *C.elegans*.** En la tabla se muestran los distintos elementos centrales, desde ligandos hasta factores de transcripción que forman parte de la vía de señalización. Se observa que todos los elementos están presentes y conservados a lo largo de las especies, si bien en *Drosophila* y *C. elegans* la diversidad es menor. En la mayoría de los casos la vía se divide según a qué tipo de receptor se unen los ligandos y qué tipo de efector reclutan río abajo, y de acuerdo a ello se denomina la rama “*BMP-like*” o “*TGFb* o *Activin-like*”. (Weizz y Atisano, 2012).

Los ligandos de la vía de señalización BMP inician su acción a través de la unión a receptores transmembrana que tienen una actividad quinasa intrínseca mediada por serinas y treoninas, conocidos como receptores de Tipo I, THICKVEINS (TKV), SAXOPHONE (SAX) y BABOON (BABO), o Tipo II PUNT (PUT) y WISHFUL THINKING (WIT). Los ligandos tipo BMP se unen a los receptores tipo I TKV y SAX, mientras que BABO media la actividad de ACT β y DAW (Affolter and Basler, 2007; Zhu et al., 2008) (Heldin et al. 1997). Estas clases de receptores son estructuralmente similares, comparten una región extracelular rica en cisteínas y una región intracelular que incluye el dominio quinasa, importante para la fosforilación y activación de los factores de transcripción que se unen a los genes blancos de la vía. Los receptores Tipo I tienen además regiones ricas en residuos glicina y serina (dominios GS)

Los receptores de Tipo II se encuentran constitutivamente activos y son los que se unen a los ligandos. Una vez unido el ligando, el receptor Tipo II se asocia a receptores Tipo

I, cuya actividad quinasa es activada a través de la fosforilación mediada por el receptor Tipo II. Los receptores de Tipo I a su vez pueden encontrarse formando homómeros u heterodímeros con otros receptores del mismo tipo como es el ejemplo de TKV y SAX; en diversos tejidos pueden encontrarse asociados. Una vez activado, el receptor Tipo I es capaz de fosforilar componentes río abajo de la vía, como el factor de transcripción MAD. MAD fosforilada luego se asocia con MED y en conjunto translocan al núcleo donde pueden afectar la expresión de genes targets combinándose con otros factores de transcripción como SHN (*schnurri*) (Figura 8).

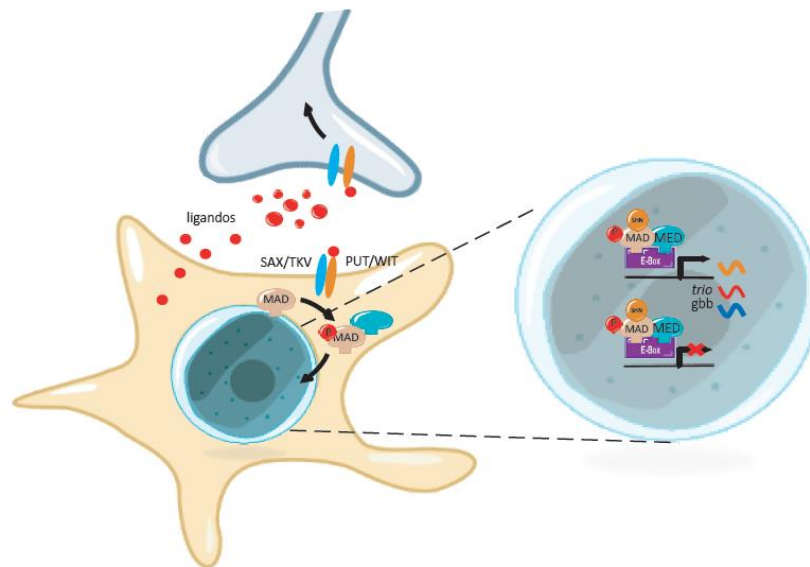


Figura 8. **Vía canónica de señalización de BMP.** Esquema de los componentes principales y su función caracterizada principalmente en el desarrollo embrionario y en la placa neuromuscular (NMJ) de la larva de *Drosophila*. Los ligandos de la vía son liberados por la motoneurona u otras células y se unen a receptores Tipo II (PUT y WIT) en las células receptoras. El cambio de conformación generado por esta unión hace que estos receptores se unan a los de Tipo I (SAX y TKV) activando el dominio quinasa de estos últimos, lo que a su vez permite fosforilar al factor de transcripción MAD. MAD fosforilado se une a MED y a SHN entre otros para traslocar al núcleo. En el núcleo el complejo formado se une a los E-BOX de genes para activar o reprimir su expresión. Entre ellos, *trio*, que tiene relevancia por generar modificaciones sobre el citoesqueleto de actina. La misma vía puede regular a su vez la expresión de ligandos como por ejemplo a *gbb* (en color rojo).

1.5.1 Elementos reguladores de la actividad de la vía de BMP

Existe una extensa lista de factores regulatorios de la transcripción y de la activación de la vía que se unen a las proteínas MAD (para una revisión detallada de los coreguladores en diversas especies ver Moustakas, A., y Heldin, C.H., 2009). En particular, el factor de transcripción MAD (SMAD 1/5/9 en mamíferos) presenta una región “*linker*” que puede ser fosforilada por la quinasa glicógeno sintetasa 3 (GSK3) (Figura 9) cuyo homólogo en *Drosophila* es la proteína SHAGGY (SGG); SGG cumple un rol importante en el reloj molecular a través de la fosforilación del dímero PER/TIM permitiendo su ingreso al núcleo (Figura 4). La fosforilación mediada por SGG retiene a MAD fosforilada en el citoplasma evitando su translocación al núcleo y restringiendo su efecto sobre los genes *targets* de la vía.

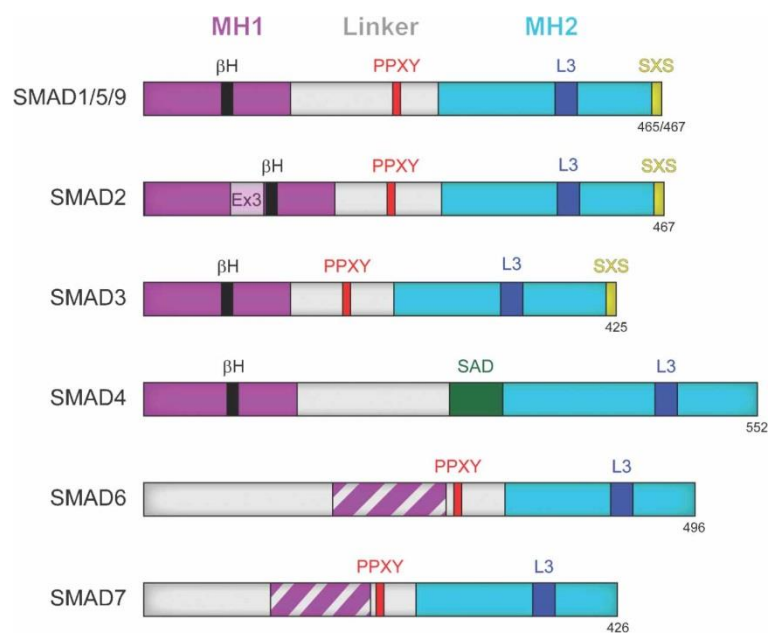


Figura 9. **Familia de las proteínas SMAD de mamíferos.** Todas las SMAD comparten el dominio de homología MAD MH1 (violeta) y MH2 (celeste) que median la interacción con una gran variedad de proteínas citoplasmáticas. Todas las R-SMADs comparten un motivo C-terminal SXS en el que las últimas dos serinas son fosforiladas por el receptor Tipo I. La región “*linker*” es la que puede interactuar con GSK3 (SGG) al ser fosforilada (Weiss y Attisano, 2012).

1.5.2 Contribución de la vía en la plasticidad sináptica de la placa neuromuscular

Las sinapsis químicas son uniones especializadas entre distintas células que median la transmisión de información a través de pequeñas moléculas y/o péptidos como neurotransmisores. Las terminales pre-sinápticas de estas sinapsis contienen vesículas con neurotransmisores o neuropéptidos y la maquinaria necesaria para liberarlos. Los compañeros post-sinápticos, que pueden ser otras neuronas o células no neuronales, tienen estructuras especializadas que contienen receptores que pueden unirse a los neurotransmisores liberados por las neuronas presinápticas y traducir esto en señales químicas y/o eléctricas. Si bien hay innumerables trabajos que se han enfocado en estudiar los neurotransmisores o neuropéptidos clásicos, poco se sabe de cómo vías de señalización que involucran péptidos pueden desencadenar mecanismos río abajo que terminen afectando la expresión génica de las neuronas post-sinápticas, y el modo en que aquellas puedan estar siendo utilizadas para comunicarse entre neuronas en el cerebro. Muchas de las moléculas y mecanismos usados por la plasticidad sináptica durante el desarrollo son reutilizados luego en neuronas maduras en el adulto como por ejemplo, durante los cambios plásticos que acompañan el proceso de aprendizaje y memoria. Por ello no es sorprendente que vías como la de BMP pueda estar siendo cooptada en el adulto de *Drosophila* para cumplir un rol diferente, por ejemplo, para comunicar información relevante entre las distintas neuronas circadianas.

La vía de señalización de BMP ha sido implicada en el ensamblado de sinapsis y plasticidad tanto en sistemas vertebrados como en invertebrados. Estudios en la placa neuromuscular (NMJ) de la larva de *Drosophila* muestran que *wit*, un gen que codifica una proteína relacionada con el receptor Tipo II de la vía de BMP, es requerido para un desarrollo y funcionamiento normal de la placa neuromuscular. En particular en su trabajo () demuestran que el receptor Tipo I SAX y el factor de transcripción que éste fosforila, MAD son esenciales para el correcto desarrollo de la estructura y función de la placa neuromuscular, una sinapsis que muestra plasticidad dependiente de la actividad (Figura 10).

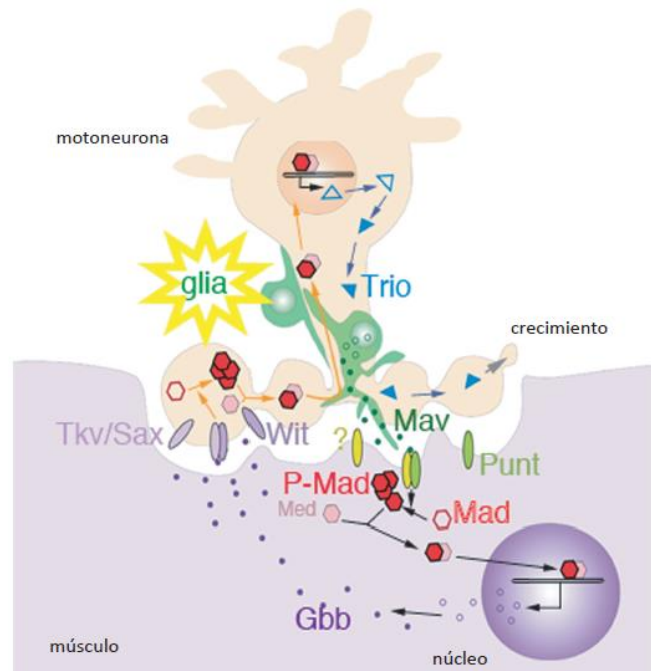


Figura 10. **Esquema de la placa neuromuscular en la larva de *Drosophila* (NMJ)**. El músculo libera ligandos de la vía de BMP como GBB los que son recibidos por la motoneurona. Los ligandos se unen a los receptores y activan la vía de señalización en la motoneurona, MAD fosforilado traslocan al núcleo y activa genes como *trio* que permiten luego el crecimiento de los botones sinápticos que inervan el músculo. A su vez la glía y la misma motoneurona activan la vía en el músculo permitiendo por ejemplo que aumente la transcripción de los mismos ligandos. Modificado de Fuentes-Medel et al., 2012.

1.5.3 La vía de BMP y el reloj circadiano en *Drosophila*

Hace algunos años en nuestro laboratorio se demostró que uno de los factores de transcripción de la vía de BMP, SHN, era capaz de afectar el reloj circadiano modulando los niveles de la proteína CLK; en particular, la activación de la vía en las LNvs generaba un periodo largo debido a una disminución en los niveles de CLK (Beckwith et al., 2013). Esta es la primera y única evidencia de que esta vía de señalización puede ser cooptada por el cerebro del adulto, y en particular por la red circadiana, como una forma de ajuste fino entre los distintos osciladores. El hecho de que se trate de una vía de señalización retrógrada permitió proponer que distintos grupos de neuronas circadianas que se comunican con las sLNvs pueden emplear esta vía como una forma de transmitir información temporal hacia el reloj central. La falta de consolidación de la actividad locomotora circadiana cuando hay una reducción en los niveles de expresión de los ligandos en grupos particulares de neuronas circadianas avala esta hipótesis. Sin embargo, hasta el presente trabajo no se conocía específicamente qué ligandos eran utilizados por qué grupos de neuronas reloj y si era

posible afectar respuestas controladas por el reloj a través de la activación de la vía mediada por ligandos específicos. Dado que la vía puede actuar utilizando diferentes ligandos y receptores de Tipo I y II y que puede formar complejos con diferentes proteínas, los genes targets de la vía pueden variar dependiendo del tejido y de la célula, afectándose diferentes aspectos del reloj. La hipótesis de este trabajo plantea que distintos grupos de neuronas circadianas utilizan a la vía de BMP como un mecanismo para comunicarse entre ellas afectando, como ya fue demostrado, el reloj molecular (Beckwith et al., 2013) pero también otros outputs del reloj como por ejemplo la plasticidad estructural cumpliendo un rol similar al ya descrito para la vía en la placa neuromuscular (Aberle et al., 2002; Ball et al., 2015; Fuentes-Medel et al., 2012).

2 Materiales y Métodos

2.1 Drosophila, sujeto de estudio

2.1.1 *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 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, USA) con aproximadamente 50 ml del mismo medio de cultivo. 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. Cuando se utilizó el sistema *Target* (termo-sensible) los cruzamientos se mantuvieron a 18°C para evitar activación de la maquinaria UAS/GAL4 durante el desarrollo. 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 CO₂, 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 2-3 hembras por cada 2 machos. En general se agregó una pequeña cantidad de levadura en polvo a cada vial para optimizar la ovipuesta.

2.1.2 *Nomenclatura de Drosophila*

Drosophila es un organismo diploide que cuenta con cuatro pares de cromosomas; un par corresponde al par sexual (el par 1, es XX en hembras y XY en machos); los 3 pares restantes son autosómicos (par 2, 3 y 4). De estos últimos el cuarto par, debido a su tamaño y cantidad de genes, generalmente no es usado para inserciones de herramientas genéticas.

En *Drosophila* el genotipo se escribe de una manera estandarizada; de izquierda a derecha se describen los elementos de los cromosomas de 1 al 4, y cada cromosoma se separa con punto y coma “;”. Los cromosomas homólogos se separan con un barra “/” y de manera abreviada a lo largo de este trabajo se indicará con el símbolo “>”. Si el genotipo

para un cromosoma es el salvaje se indica con el signo “+”. A su vez cuando se quiere indicar más de un gen o transgen en el mismo cromosoma se indica con una coma “,”.

Cuando se utilizaron herramientas genéticas como ARN de interferencia específicos para genes de la vía, se abrevió con el nombre del gen seguido por la letra “i”; Ej. ARN de interferencia para *dpp*, se abrevia *dppi*.

2.1.3 Líneas de *Drosophila* empleadas

Genotipo	Procedencia	Observaciones
Líneas controles y balanceadores		
<i>w¹¹¹⁸</i>	Bloomington Stock Center	CrX
<i>dBw: CyO;TM3/ES</i>	Generada en el laboratorio	CrII y CrIII
<i>pdfRFP</i>	Dr. Justin Blau	Marcador citoplasmático, CrII
Líneas “driver”		
<i>pdfGAL4</i>	# 6900 Bloomington Stock Center	Altos niveles de expresión, Expresión en las LNvs, CrII,
<i>c929GAL4</i>	#25373 Bloomington Stock Center	Expresión en las ILNvs, CrII
<i>ILNvGAL4</i>	Dr. Taishi Yoshii	Expresión en las ILNvs, CrIII
<i>sLNvsGAL4</i>	Dr. Taishi Yoshii	Expresión en las sLNvs, CrII
<i>r6GAL4</i>	Bloomington Stock Center	Expresión en las sLNvs, CrII
<i>Mai179GAL4</i>	Dr. Patrick Emery - UMASS	Expresión en las LNds (CRY+), CrII
<i>DvpdfGAL4;pdfG80</i>	Dr. Patrick Emery - UMASS	Expresión en las LNds (CRY+),CrII
<i>dClk4.1GAL4</i>	N. Glossop (University of Manchester)	Expresión en las DN1s,CrII
<i>dClk856GAL4</i>	N. Glossop (University of Manchester)	Expresión en todos los grupos circadianos, CrII
<i>timGAL4</i>	#7126 Bloomington Stock Center	Expresión en todos los grupos circadianos, CrII
Líneas reporteras de ligandos		
<i>dppLacZ</i>	#12379 Bloomington Stock center	CrII
<i>dpp::GFP</i>	#318414 Vienna Stock Center	CrII
<i>gbbGAL4</i>	Vienna Stock Center	CrII
<i>ActbGAL4</i>	Donada por el laboratorio del Dr. O'Connor	CrII
<i>scwGAL4</i>	Donada por el laboratorio del Dr O'Connor	CrII
<i>myoGAL4</i>	Donada por el laboratorio del Dr. O'Connor	CrII
<i>dawGAL4</i>	Donada por el laboratorio del Dr. O'Connor	CrII

<i>dadLacZ</i>	#10305 Bloomington Stock Center	CrII
<i>brkLacZ</i>	Bloomington Stock Center	CrII
Líneas “driver” con expresión adulto-específica		
<i>pdfGAL4;tubG80ts,dicer</i>	Generada en el laboratorio	Expresión en las LNvs CrII y CrIII
<i>c929GAL4;tubG80ts,dicer</i>	Generada en el laboratorio	Expresión en las ILNvs CrII y CrIII
<i>tubG80ts; ILNvsGAL4</i>	Generada en el laboratorio	Expresión en las ILNvs CrII y CrII
<i>sINVvsGAL4;tubG80ts,dicer</i>	Generada en el laboratorio	Expresión en las sLNvs CrII y CrIII
<i>dCk856GAL4;tubG80ts,dicer</i>	Generada en el laboratorio	Expresión en todas las neuronas circadianas, CrII y CrIII
Líneas con marcadores nucleares , citoplasmáticos y presinápticos		
<i>UAS gfpn</i>	#4776 Bloomington Stock Center	Marcador nuclear, CrIII
<i>UAS cd8rfp</i>	Ben-Zion Shilo (Weizmann Institute)	Marcador citoplasmático, crIII, obtenida por medio del Dr. Wappner,
<i>UAS brpgfp</i>	Bloomington Stock Center	Marcador presináptico, CrX
Líneas para activar la vía de BMP		
<i>pdfGAL4, 756</i>	Generada en el laboratorio	Driver de LNvs recombinado con la inserción 756
<i>UAS shn</i>	Dr. M. Affolter (Basel University)	Para sobreexpresar el factor de transcripción SHN, CrII
<i>UAS tkv^A</i>	Eric Buchner (University Wuerzburg, Alemania)	Versión constitutivamente activa del receptor Tipo TKV, CrII
<i>UAS dpp</i>	#1486 Bloomington Stock Center	Sobreexpresa <i>dpp</i> , CrIII
<i>UAS gbb</i>	Dr. G. Marquez	Sobreexpresa <i>gbb</i> , CrIII
<i>UAS sax^A</i>	Eric Buchner (University Wuerzburg, Alemania)	Versión constitutivamente activa del receptor Tipo TKV, CrII
<i>pdfRFP;UASdpp</i>	Generada en el laboratorio	Marcador citoplasmático CrII, UAS para sobreexpresar DPP CrIII
<i>pdfRFP;UASgbb</i>	Generada en el laboratorio	Marcador citoplasmático CrII, UAS para sobreexpresar GBB CrIII
ARN de interferencia para ligandos de la vía deBMP		
<i>UAS ARNidpp</i>	#33618 Bloomington Stock Center	CrIII
<i>UAS ARNigbb</i>	#34898 Bloomington Stock Center	CrIII
<i>UAS ARNimyos</i>	#31200 Bloomington Stock Center	CrIII
<i>UAS ARNimav</i>	#34650 Bloomington Stock Center	CrIII
<i>UAS ARNiActb</i>	#29597 Bloomington Stock Center	CrIII
Otras herramientas genéticas		
<i>CS</i>	Bloomington Stock Center	

UAS <i>dicer2</i>	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center	CrII
-------------------	--------------------------------------	------

Tabla 2. Descripción de los genotipos de las líneas utilizadas a lo largo de esta tesis. Se indica también la procedencia y el cromosoma donde se encuentra la inserción.

2.1.4 El sistema GAL4/UAS

Esta es probablemente la herramienta más ampliamente utilizada por los laboratorios que utilizan *Drosophila* como sistema modelo. Este sistema heterólogo (proveniente de levaduras) permite la expresión de un gen de interés en un determinado tejido. Se basa en la afinidad del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*) (Brand and Perrimon, 1993) (Figura 11).

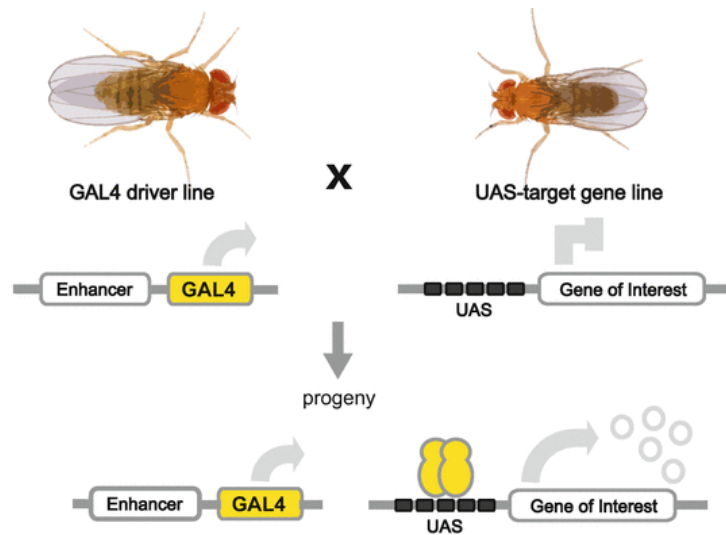


Figura 11. **Sistema GAL4-UAS.** Se muestra un esquema del funcionamiento del sistema de expresión heterólogo de *Drosophila*. Dos líneas transgénicas, una portando una construcción que alberga un promotor particular controlando la expresión del factor de transcripción GAL4, y otra cuya construcción porta la secuencia UAS controlando un gen de interés, se cruzan para obtener en la progenie moscas que expresen el gen de interés en el patrón espacial y temporal del promotor utilizado.

En términos generales, este sistema se basa en la utilización de dos tipos de líneas de moscas transgénicas. Una línea de moscas que expresa el factor de transcripción GAL4 bajo un promotor específico de tejido (P) es cruzada con otra que posee un gen X controlado por la secuencia UAS (por ejemplo, UAS-GFP). El resultado es que sólo en aquellos individuos de la progenie que posean ambos elementos se expresará el gen X bajo el promotor P. La nomenclatura abreviada utilizada en esta tesis fue $\rho G4 > x$. A lo largo de

esta tesis se utilizaron múltiples líneas GAL4 y UAS para expresar transgenes y ARNs de interferencia.

A este sistema también se ha incorporado la utilización del inhibidor de GAL4, GAL80 (Ma and Ptashne, 1987), también proveniente de levaduras (Figura 12). Esto permite restringir la función de GAL4 en el patrón de expresión que determine el promotor utilizado para expresar a GAL80. A su vez se ha desarrollado un sistema regulable por temperatura. Este sistema se basa en la expresión conjunta del factor de transcripción GAL4 y su represor, el factor de transcripción GAL80^{TS}. A temperaturas bajas (18-22°C) el GAL80^{TS} está activo y reprime la actividad del GAL4, impidiendo así la transcripción de genes controlados por la secuencia UAS. Pero a temperaturas altas (28-30°C), el GAL80^{TS} sufre cambios conformacionales y se inactiva, permitiendo la unión del GAL4 a la región UAS, y la transcripción del gen de interés.

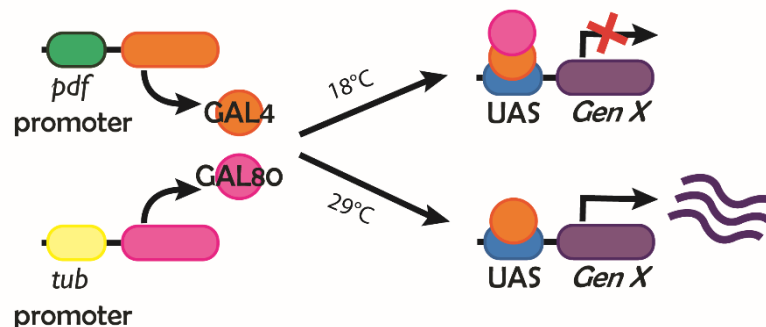


Figura 12. **Esquema del funcionamiento del sistema inducible termo-sensible.** A temperaturas bajas el factor de transcripción GAL80 reprime la actividad del GAL4, mientras que a temperaturas altas deja de ser funcional permitiendo la unión del GAL4 a la región UAS, para que ocurra la transcripción del gen de Interés X.

2.1.5 Cromosomas balanceadores

Una de las herramientas más útiles del repertorio disponible para estudios genéticos en *Drosophila* son los cromosomas balanceadores, ya que impiden la recombinación entre cromátidas hermanas. Estos cromosomas están formados por múltiples inversiones y translocaciones, lo cual evita el entrecruzamiento entre cromosomas homólogos. Cuando además poseen mutaciones que les atribuyen marcadores fenotípicos dominantes son sumamente útiles para el análisis de segregación en la progenie y la construcción de genotipos definidos. Los cromosomas balanceadores pueden, además, llevar marcadores moleculares (como los genes LacZ o GFP) que permiten su identificación por tinción directa u observación al microscopio de fluorescencia.

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

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

2.1.6 Líneas recombinantes

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

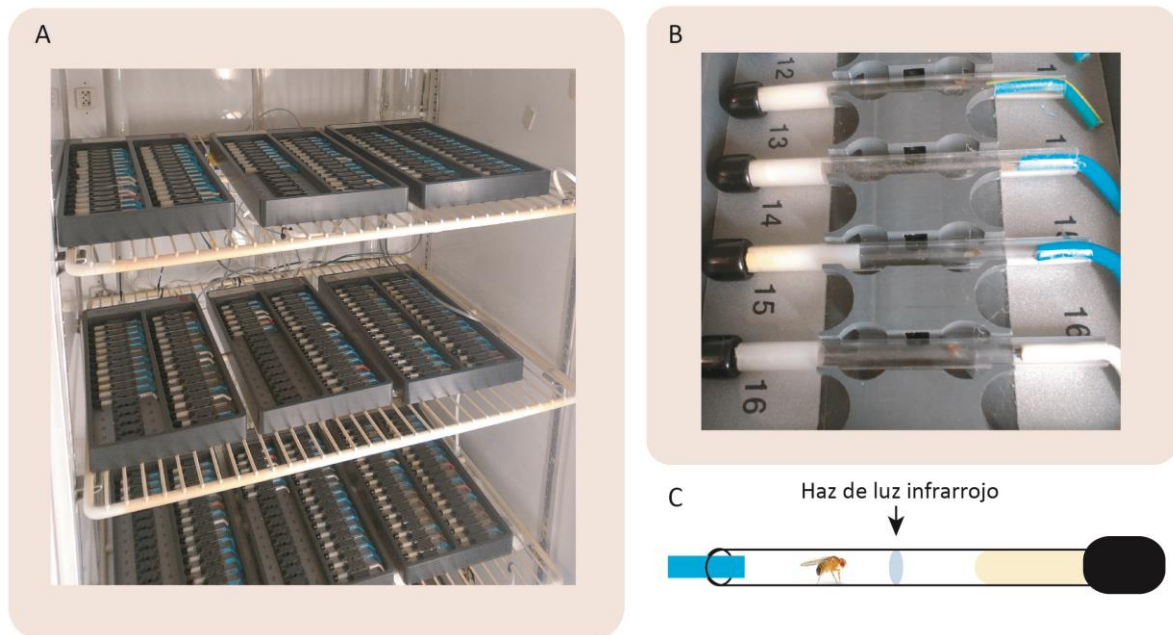
2.2 Análisis del comportamiento circadiano

2.2.1 *Análisis automatizado de la actividad locomotora*

El monitoreo automatizado de la actividad locomotora se llevó a cabo colocando a las moscas individualmente en tubos pyrex de 0,3 cm de diámetro interno y éstos a su vez en

Materiales y Métodos

una de las 32 posiciones que poseen los monitores de actividad. Cada posición se encuentra flanqueada por un emisor y detector de luz infrarroja (Figura 13). La luz infrarroja no afecta el patrón de comportamiento estudiado, ya que tanto el sistema visual como el sistema circadiano de *Drosophila* son insensibles a la luz de longitud de onda entre 850 y 950 nm. Los monitores fueron conectados a una computadora que adquiere los datos de cada canal (32 por monitor) en intervalos predeterminados (1 a 30 minutos) y colocados en incubadoras capaces de controlar las condiciones de luz y temperatura.



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

actogramas y calcular el período asociado a través de periodogramas. Asimismo, este programa cuenta con un paquete estadístico que permite validar cada observación con un cálculo de probabilidad asociada (Figura 14).

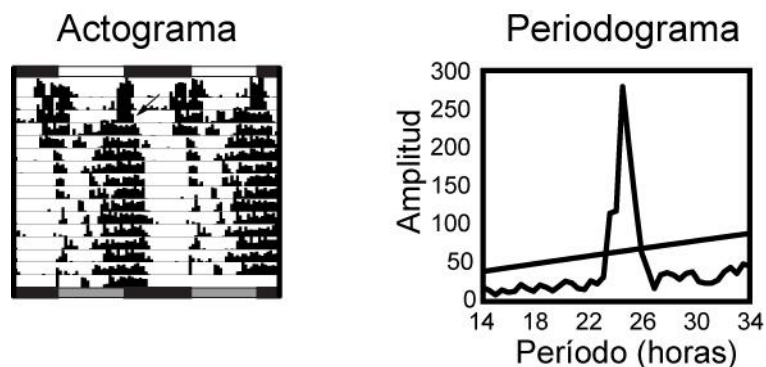


Figura 14. **Actograma y periodograma de una mosca silvestre.** A través de Clocklab es posible evaluar el comportamiento locomotor circadiano, determinando ritmicidad y periodicidad. En el actograma, la flecha indica el momento de pasaje a oscuridad constante; las barras blancas y grises indican los días y días subjetivos, respectivamente, y las barras negras indican oscuridad. En el periodograma la barra diagonal indica la línea de corte para una significancia de 0,05 en la determinación del período.

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

Del análisis del comportamiento desplegado por cada individuo es posible definir distintos comportamientos (Figura 15):

Rítmico: cuando los datos se ajustan a una función con un período de una sola frecuencia (entre 14 y 34h). Durante el desarrollo de los resultados la variable medida que nos permite evaluar la ritmicidad será la medida del poder del ajuste “*power*”, que en el periodograma se identifica como la altura del pico, al que le restamos la “*significancia*”, determinada por el estadístico chi-cuadrado X^2 asociado al análisis del período.

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

Diferentes patrones de comportamiento de una mosca se ejemplifican en la Figura 15 en donde se muestra un actograma representativo de individuos silvestres de la línea w^{1118} y un actograma representativo de individuos arrítmicos (nulo para un componente del reloj).

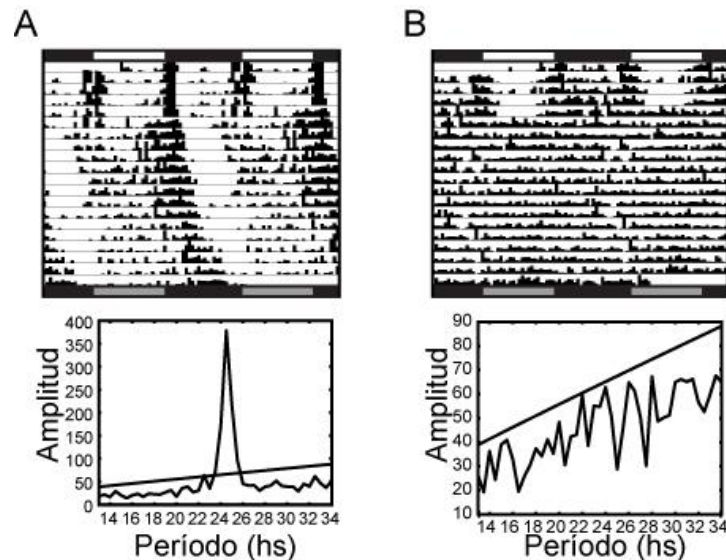


Figura 15. **Categorización de patrones comportamentales.** Se muestran actogramas y periodogramas representativos de dos de las categorías comportamentales definidas a lo largo de la tesis. (A) Una mosca silvestre w^{1118} ; (B) un ejemplo de animal arrítmico (nulo para un componente del reloj).

2.2.2 Cálculo del período de la actividad locomotora

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

2.2.3 Análisis del Índice de anticipación de la tarde (EI)

Con el objetivo de analizar en mayor profundidad algunos de los fenotipos observados que fueron evidentes aún en condiciones de luz-oscuridad, analizamos también el índice de anticipación de la tarde. Para ello utilizamos el método descrito por un índice capaz de describir en qué grado se presenta la actividad anticipatoria y consiste en el cálculo de las

pendientes de regresiones lineales establecidas para la cantidad de actividad antes del apagado de las luces para cada mosca de cada genotipo.

Luego se realiza el test correspondiente para comparar los distintos índices obtenidos.

2.2.4 *Análisis estadísticos*

Se utilizaron test paramétricos (*T-test*, *One-way ANOVA*, *Two-way ANOVA*) y no paramétricos (*Mann-Whitney*, *Welch* y *Kruskall-Wallis*) dependiendo de la naturaleza de los datos con sus correspondientes test a posteriori. En todos los casos se graficó la media +/- SEM.

2.3 Análisis inmunohistológicos

2.3.1 *Inmunohistoquímica en cerebros de moscas adultas*

Las moscas fueron anestesiadas en hielo y decapitadas en buffer fosfato con detergente (PT, PBS 0,1% Tritón X-100) utilizando pinzas de disección nº5 (Dumont) bajo una lupa (Leica CLS 100X). Una vez decapitadas, las cabezas se transfirieren a solución de fijación (paraformaldehído 4%, 0,1M PB) durante 40-60 minutos en hielo. Luego de la fijación, las cabezas se lavan y se disecan en PT utilizando pinzas de disección y bajo lupa. Las disecciones se realizan sobre placas de SYLGARD 184 (Dow Corning), bajo una fuente de luz fría. Una vez disecados los cerebros se lavan con 3 enjuagues de PT de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con el objetivo de eliminar los restos de fijador. A continuación se bloquean durante una hora con suero normal de cabra 7% en PT.

Los cerebros se incuban con los anticuerpos primarios a 4°C. El tiempo de incubación con el anticuerpo primario varía según cada caso, en el presente trabajo en la mayoría de los casos se incubó con primario por 48 horas. Posteriormente se realizan 3 lavados con PT en agitación suave, de 15 minutos cada uno. A continuación se agregan los anticuerpos secundarios diluidos en PT (habitualmente 1:250) y se incuban durante 2-3 horas a temperatura ambiente. En los casos en los que el anticuerpo primario genera una gran cantidad de señal inespecífica, se incuba tanto el anticuerpo primario como el secundario con 7% de suero normal de cabra. Luego de remover el/los anticuerpos secundarios los cerebros se lavan mediante 3 enjuagues en PT de 15 minutos cada uno en tubos cubiertos por papel de aluminio. Finalmente, los cerebros se montan bajo lupa en portaobjetos de 25 x 76 mm (*Fisher*) en aproximadamente 5µl de una solución de montaje

(VECTASHIELD Antifade Mounting Medium) que permite mantener la fluorescencia y se cubren con cubreobjetos. Los cerebros se colocan en el centro de un cuadrado realizado con esmalte de uñas y luego de cubrirse con un cubreobjetos de 24 mm de lado se sellan con el mismo esmalte para evitar que las muestras se dessequen.

2.3.1.1 Anticuerpos

2.3.1.2 Anticuerpos primarios:

IgG anti PER (policlonal, en conejo) 1:500. Alpha Diagnostic

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

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

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

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

IgG anti-pMAD (monoclonal en conejo) 1:100. EPITOMICS (USA).

IgG anti-pMADGSK3 (monoclonal en conejo) 1:100. Donado por el laboratorio del Dr. M. De Robertis.

2.3.1.3 Anticuerpos secundarios:

Todos los anticuerpos secundarios utilizados provienen de Jackson Immunoresearch (USA). Se utilizan en una dilución de 1:250 en PT y se incuban durante 2-3 hs a temperatura ambiente.

IgG anti conejo: Cy2 Cy3 y Cy5.

IgG anti pollo: Cy2 y Cy3

IgG anti rata: Cy3 y Cy5.

2.4 Microscopía y procesamiento de imágenes

Las imágenes de esta tesis fueron obtenidas en dos microscopio confocales Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, NJ); en particular LSM 710. El *pinhole* utilizado es siempre de 1

unidad *airy*. Las imágenes de hemicerebro se realizaron con un objetivo de 40x y zoom digital de 1. Las imágenes de las proyecciones para el análisis de la plasticidad y morfología se tomaron con un objetivo de 63x y zoom digital de 1,4x. Todas las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1024x1024 y 8 bit.

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

2.4.1 Cuantificación de partículas BRP positivas

Para estimar el número de zonas activas se utilizó la localización de la proteína *bruchpilot* (*brp*) fusionada a GFP. Obtenidas las galerías de secciones confocales se realizan proyecciones 2-D utilizando el programa ImageJ. Con el mismo programa se delimita el área que contiene el circuito PDF más allá del nodo de ramificación de las proyecciones dorsales, utilizando para esto la marca de membrana provista por la proteína CD8RFP. A partir de la selección se elimina el resto de la imagen con el objetivo de minimizar la sobrestimación de partículas positivas producida por el *background*. Obtenido el recorte de la proyección y siempre con el programa ImageJ se aplica un filtro de alisado para definir más claramente las partículas positivas, se aplica una máscara que define las partículas positivas y se utiliza la herramienta "Analyse Particles" para contar el número de partículas y evaluar sus dimensiones. Se consideró como partículas BRP positivas a toda aquella señal con un diámetro mayor a 0,1 μm .

2.4.2 Análisis de los niveles de PDF en las proyecciones dorsales de las sLNvs

Los niveles de PDF en las terminales se analizaron en diferentes genotipos en dos momentos del día en condiciones de luz y oscuridad (ZT02 y ZT14). Para su análisis se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PDF y anti-RFP (marcador citoplasmático) que permitió definir el área para cuantificar la señal de PDF. Se tomaron imágenes en el microscopio confocal con objetivo 63x y zoom digital 1,4x enfocadas en la región del protocerebro dorsal, utilizando las mismas condiciones de excitación y ganancia del láser.

Para la cuantificación se procesaron las imágenes con el programa ImageJ. Se realizó una proyección en Z de todas las secciones utilizando la intensidad máxima. Utilizando la marca citoplasmática de RFP se delimitó el área a medir y se creó una máscara con ella. Esta máscara fue utilizada luego para medir en el canal de PDF midiéndose la intensidad media; para eliminar el ruido se realizó una substracción del “*background*” realizándose un área por fuera de la región de las proyecciones; se midió la intensidad media y se le resto a la señal del neuropéptido. Se promediaron los niveles para cada genotipo y se relativizaron a cada experimento independiente. Se realizaron entre 2 y 3 experimentos y se analizaron y compararon las medias de todos los cerebros (6-15) analizados con sus valores relativizados.

2.4.3 *Análisis de la morfología de las proyecciones de las sLNvs*

Con el objetivo de cuantificar la extensión de los procesos de las sLNvs se utilizó el método de Sholl (Sholl, 1953), originalmente diseñado para la caracterización de los árboles dendríticos de neuronas en cultivo. Para esto se utiliza el programa ImageJ y se realizan proyecciones 2-D de las galerías de imágenes obtenidas por microscopía confocal las cuales incluyen la totalidad de las proyecciones en las que se detecta señal de GFP o RFP en cada uno de los cerebros. Las imágenes se convierten a 8-bits en escala de grises y se les aplica un “*threshold*” para permitir al programa interpretar las proyecciones. Se traza una línea desde el primer nodo de ramificación hasta el final de la neurita más larga, lo que le indica al programa hasta donde realizar la cuantificación y que coloque anillos separados por una distancia de 10 μm . La localización del centro de los anillos concéntricos es sencilla ya que los axones de las sLNvs presentan una anatomía muy consistente; permanecen fasciculados hasta un punto del protocerebro dorsal (conocido como “*lateral horn*”) donde se desfasciulan y el árbol axonal se abre. Se analizan 6-15 cerebros para cada genotipo y cada punto, repitiéndose este análisis en dos o tres muestras independientes (Figura 16).

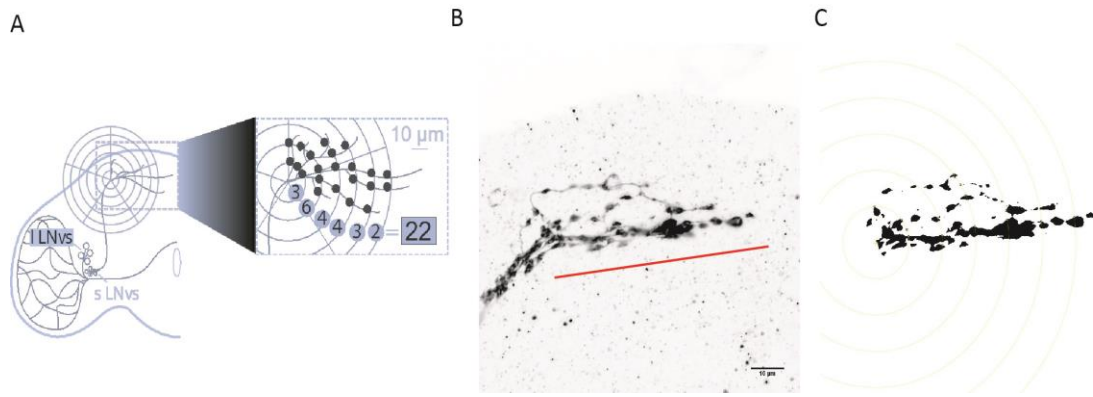


Figura 16. **Análisis de Sholl con el programa ImageJ.** **A.** Esquema de un hemiserebro y detalle de las proyecciones de las sLNvs en el protocerebro dorsal. La región luego de la primera ramificación es dónde se realiza la medición del número de entrecruzamientos de manera automática con el programa ImageJ. El programa analiza el número de neuritas que interceptan a los anillos concéntricos colocados con una distancia de $10\ \mu\text{m}$ entre sí. **B.** Imagen confocal representativa de las proyecciones de una mosca salvaje; en gris se muestra el marcador citoplasmático *pdfRFP* que permite visualizar las proyecciones; la línea roja le indica al programa desde que lugar comenzar a cuantificar. **C.** La imagen luego de ser procesada; se muestran los anillos establecidos a partir del punto elegido y la máscara realizada para cuantificar los entrecruzamientos de manera automatizada. El programa reporta por cada anillo el número de entrecruzamientos y luego el total.

3 Resultados

4 Capítulo I: Caracterización de la actividad de la vía de BMP en las neuronas circadianas del adulto de *Drosophila*

4.1 La vía de BMP está activa en las LNvs y en otros grupos de neuronas no circadianas

En trabajos realizados anteriormente en el laboratorio de Genética Del Comportamiento, la actividad de la vía de BMP había sido reportada utilizando un anticuerpo ampliamente caracterizado en el campo (anti-p-MAD) que permite detectar la fosforilación mediada por los receptores de Tipo I (TKV/SAX) del factor de transcripción MAD en las regiones específicas con motivos SXS (Figura 9). En estos experimentos se había utilizado una línea que expresaba una versión constitutivamente activa de los receptores (TKV^A y SAX^A) (Beckwith et al., 2013). Para corroborar cuan extensivamente se recluta esta vía en el circuito circadiano, se utilizó una línea “*driver*” que permite dirigir la expresión de GFPn a todas las neuronas circadianas *dClk856G4>GFPn* y se realizó la tinción de inmunohistoquímica en cerebros de adultos a ZT02. Empleando una herramienta validada en el campo fue posible detectar la presencia de p-MAD en el núcleo de neuronas no circadianas; sorprendentemente, observamos p-MAD en el citoplasma de las LNv (Figura 17).

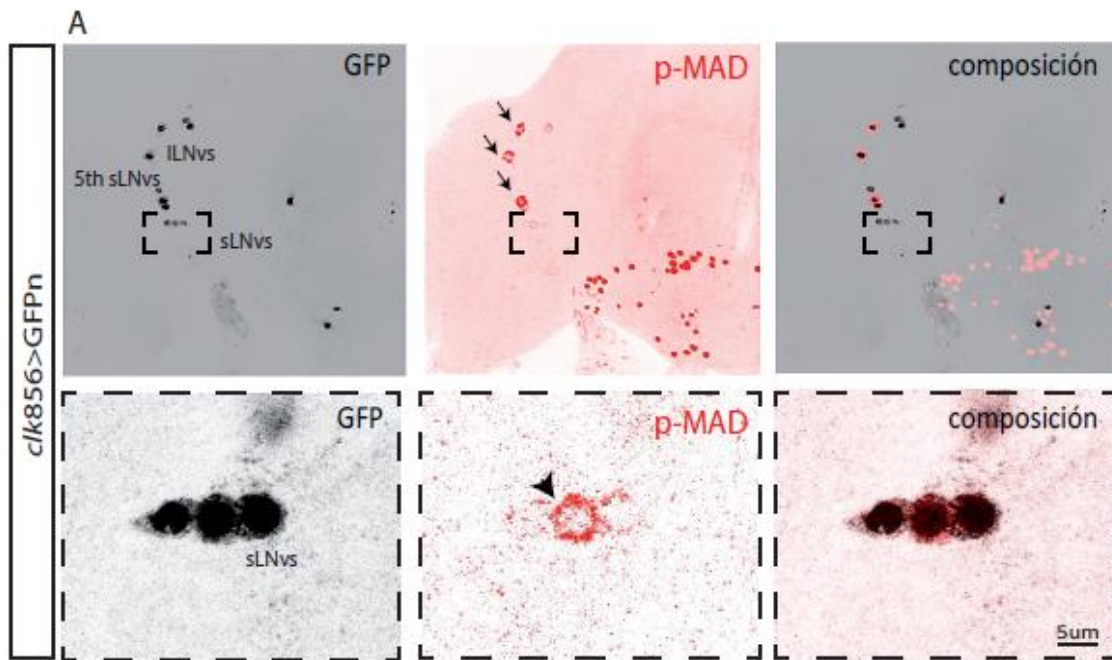


Figura 17. **La vía de BMP está activa en las LNvs.** **A.** Imágenes representativas de un hemiserebro adulto de *Drosophila*, se muestran las LNvs (sLNvs, ILNvs y 5^{ta} sLNvs) de la línea *dClk856>GFPn*, en gris se muestra la señal de GFP para identificar los distintos grupos circadianos; en rojo, la señal de p-MAD y la imagen de la derecha muestra la composición entre ambas señales mostrando que la señal de p-MAD se encuentra rodeando al núcleo de las LNvs. Las imágenes inferiores muestran con más detalle tres de las sLNvs. Las flechas negras indican zonas donde se observó señal de p-MAD.

Se observó señal en distintas regiones del cerebro; en regiones dorsales, como por ejemplo en la zona de la PI (Figura 18 A). Por otro lado, para comprobar que la señal de p-MAD nuclear es de tipo neuronal realizamos inmunohistoquímica con un anticuerpo que nos permitió identificar neuronas (anti-ELAV) en líneas silvestres (*Canton S*, CS) y con el anticuerpo anti-p-MAD. Observamos que todos los núcleos que fueron positivos para p-MAD co-localizaron con la señal de ELAV (Figura 18 B)

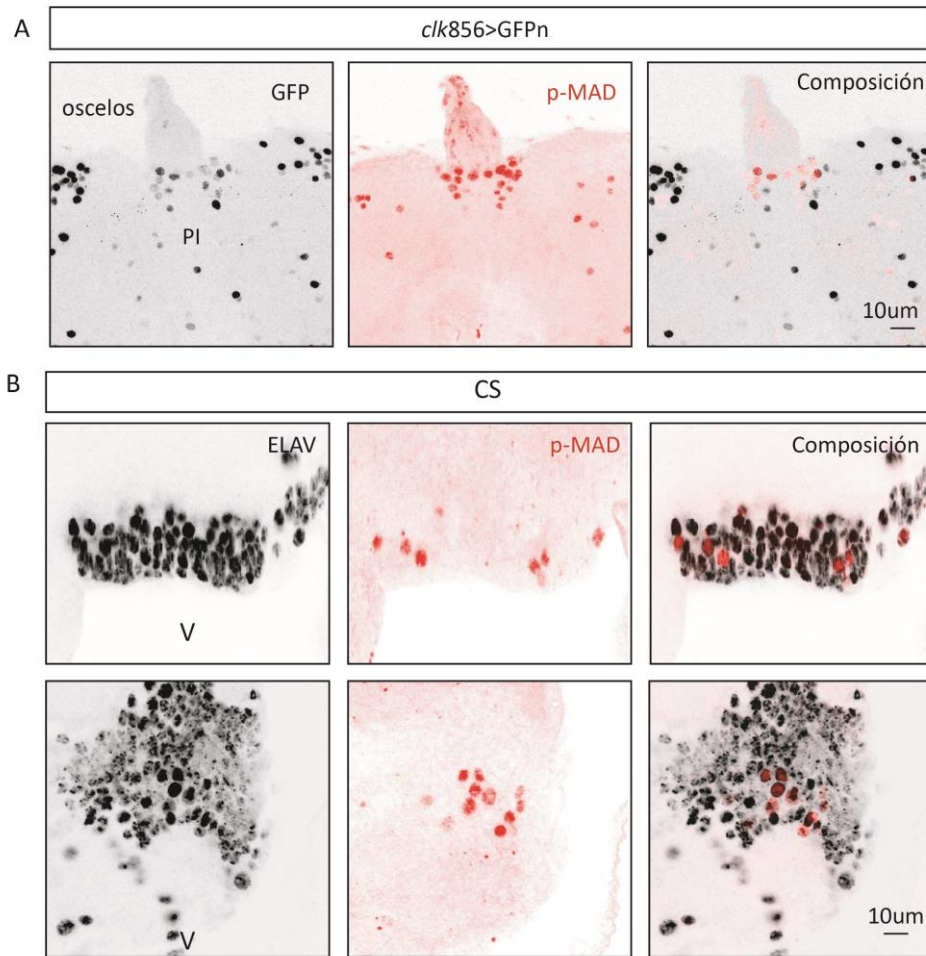


Figura 18. **Detección de p-MAD en distintas regiones del cerebro adulto de *Drosophila*.** **A.** Imágenes confocales representativas de una región dorsal de cerebros de adultos de *Drosophila* de una línea con el marcador nuclear GFP (escala de grises) dirigido por un *driver* pan-circadiano (*dClk856*); en rojo se muestra la señal para p-MAD; en el panel de la derecha se muestra la composición de ambas señales. **B.** Imágenes confocales representativas de regiones ventrales del cerebro de moscas salvajes CS; en escala de grises se muestra la señal para el marcador neuronal ELAV y en rojo la señal de p-MAD. Las imágenes de la derecha representan la composición de ambas señales.

4.1.1 *La vía puede activarse potencialmente en otros grupos de neuronas circadianas*

Sabiendo que la sobreexpresión de los receptores constitutivamente activos permitía la detección de la actividad de la vía en el núcleo de las LNvs (Beckwith et al., 2013) se evaluó si era posible detectar actividad de la vía a través de p-MAD en otros grupos de neuronas circadianas. Utilizando el *driver* pan-circadiano *dClk856G4*, se sobreexpresó la versión activada de los receptores Tipo I (TKV y SAX,

dClk856G4>tkv^A;sax^A). Se realizó una tinción por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-p-MAD y se detectó la señal nuclear en otros grupos circadianos (LNds, DN3s y algunas DN1s), además de las LNvs (Figura 17 B) (Figura 19). Esto sugeriría que los elementos necesarios para la activación de la vía de BMP están presentes en estos grupos y potencialmente la vía podría activarse en distintos grupos de neuronas circadianas.

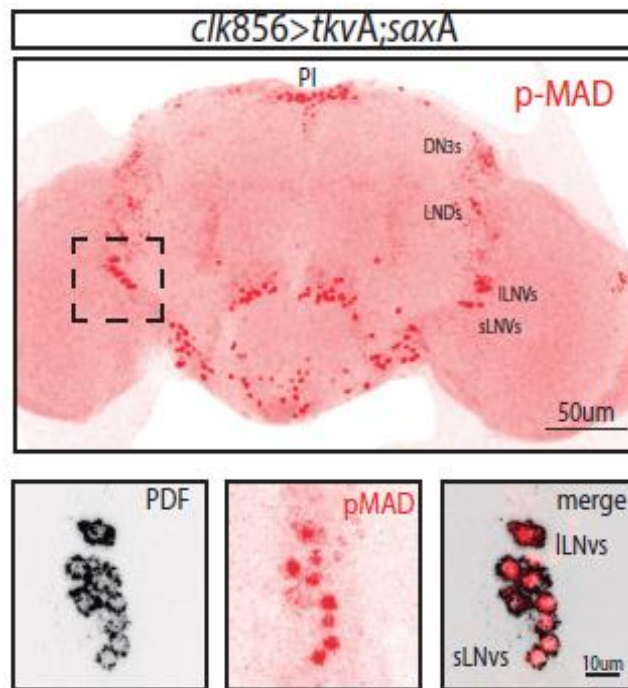


Figura 19. **La vía de BMP puede activarse en otros grupos circadianos.** Imagen representativa de un cerebro de adulto de *Drosophila* de la línea *clk856>tkv^A;sax^A*, con la cual se sobreexpresa una versión constitutivamente activa de los receptores Tipo I (TKV y SAX) en todas las neuronas circadianas. Se observa señal de p-MAD en los distintos grupos donde se sobreexpresó esta construcción. En las imágenes inferiores se muestran un detalles de la señal observada en las LNvs.

4.2 La vía de BMP podría estar controlada por SGG en la LNvs

Dado que en la literatura la actividad de la vía de BMP se determina por la translocación al núcleo del complejo formado por p-MAD y MED, la detección de p-MAD fuera del núcleo sugirió la presencia de un mecanismo que activamente estaría reteniendo al factor de transcripción fosforilado en el citoplasma, impidiendo que active o reprima genes blancos de la vía. Para indagar acerca de esta posibilidad y teniendo

Resultados

en cuenta que en la placa neuromuscular se ha identificado a SGG (*shaggy*) como una proteína capaz de fosforilar a MAD en una región “*linker*” (Aleman et al., 2014), realizamos tinciones en cerebros de moscas silvestres adultas utilizando un anticuerpo que permite reconocer la fosforilación mediada por SGG (anti-p-MADGSK3). A través de esta herramienta pudimos detectar la presencia de MAD fosforilada por SGG en el citoplasma de las LNvs (Figura 20), lo que permite proponer que en las neuronas reloj p-MAD es retenida activamente a través de la fosforilación mediada por SGG, lo cual permite explicar la detección nuclear de p-MAD en situaciones donde el sistema se ve sobrepasado, como es el caso de la expresión de los receptores constitutivamente activos. (Beckwith et al., 2013).

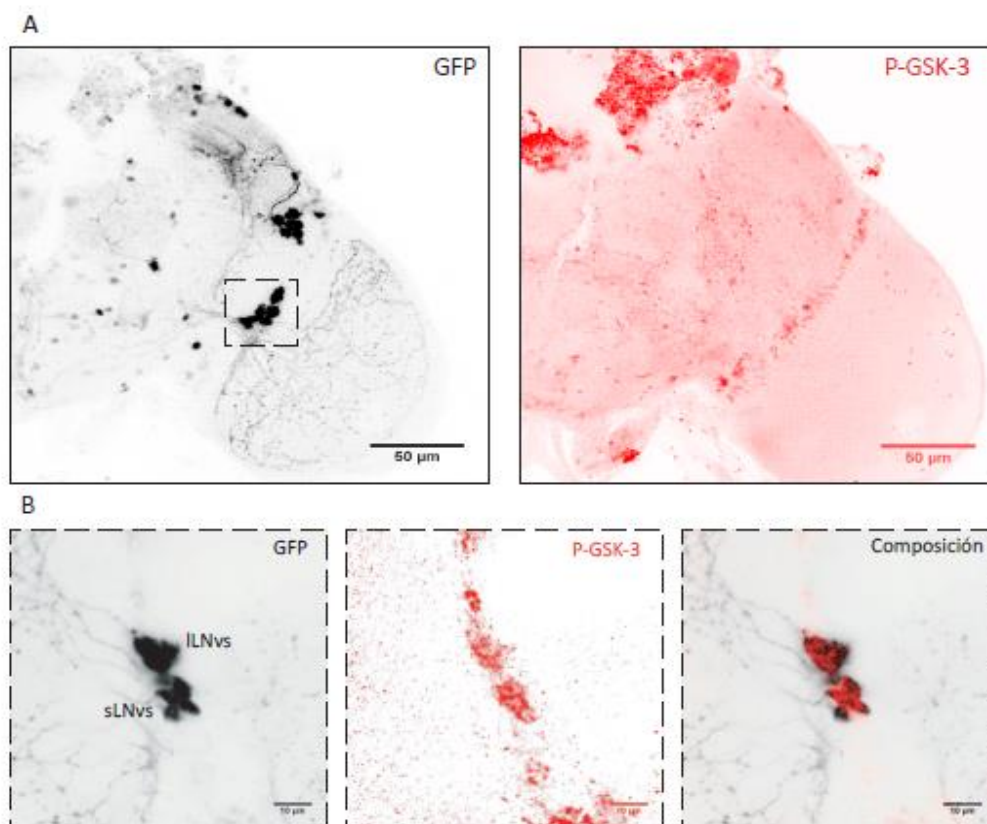


Figura 20. **MAD es fosforilada por GSK-3 en las LNvs.** **A.** Imágenes confocales representativas de un hemicerebro; la imagen de la izquierda muestra la señal de GFP cuya expresión está dirigida por la línea “*driver*” pan-circadiana *dC1k856G4*, para identificar los distintos grupos circadianos. La imagen de la derecha muestra la señal del anticuerpo que reconoce la fosforilación de MAD mediada por GSK-3 (rojo). **B.** Imágenes confocales representativas de las LNvs; la imagen de la izquierda muestra la señal de GFP (gris), el panel intermedio, la señal de P-GSK-3 (rojo) y a la derecha una composición dónde se muestra la co-localización de las dos señales.

4.3 Las neuronas circadianas expresan una variedad de ligandos de la vía BMP

Resultados previos del laboratorio (Beckwith et al., 2013) mostraron que la desregulación de distintos ligandos en las LNvs (*pdfGAL4*) y en todos los grupos de neuronas circadianas excluyéndolas (*timGAL4, pdfGAL80*) era capaz de generar una desconsolidación de la actividad locomotora, lo que indicaría que dichos ligandos se expresan en estos grupos. Para corroborar estos resultados funcionales y realizar una caracterización más detallada de cada ligando en particular se utilizaron distintas líneas reporteras específicas de cada uno para describir el patrón de expresión de cada uno de ellos; estos datos se resumen en la Figura 21.

Tal como se predijo a partir de los experimentos comportamentales anteriores, muchos de los ligandos presentaron expresión en grupos circadianos, siendo las LNvs las que presentaron una mayor diversidad. Llamativamente, sólo *Activin β* se expresa en todos los grupos circadianos (aproximadamente en el 90% de las neuronas) (Figura 21 y Figura 24).

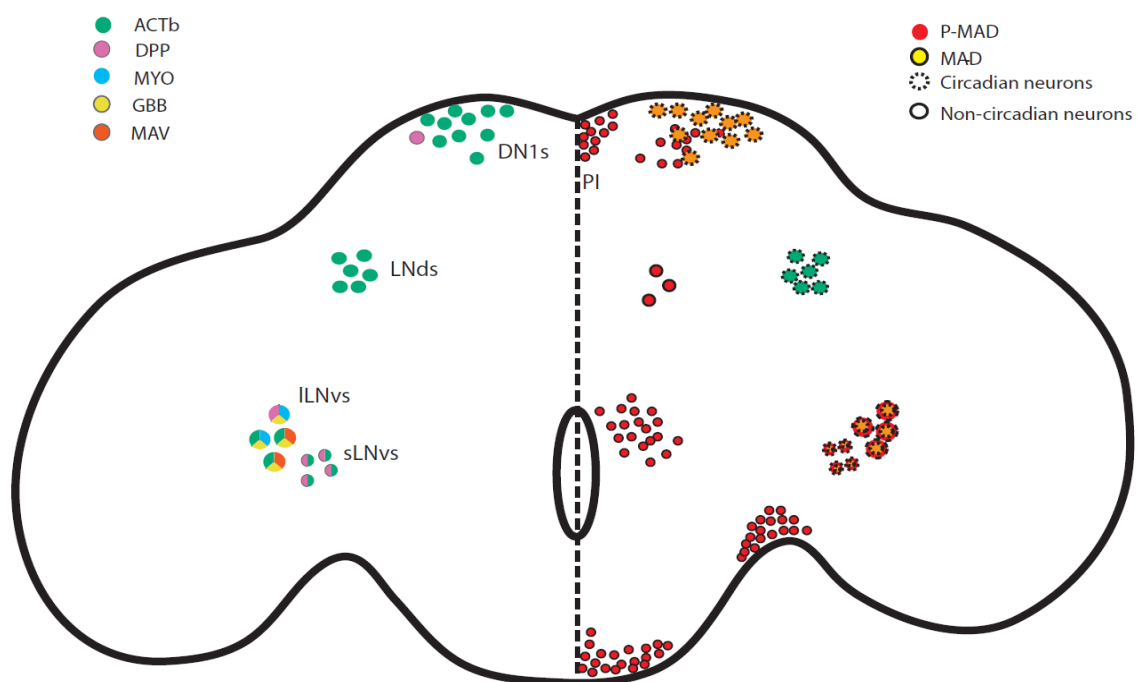


Figura 21. **Las neuronas circadianas expresan ligandos que pertenecen a la vía de BMP y la vía está activa en las LNvs.** Ilustración de un cerebro de *Drosophila* resumiendo el patrón de expresión en las neuronas circadianas (izquierda) y la activación de la vía (p-MAD, derecha). Cada ligando se muestra en un color diferente. Los ligandos Daw y Scw no se incluyeron ya que no presentaron expresión en neuronas circadianas.

Resultados

De los patrones de expresión analizados las ILNvs mostraron la mayor diversidad en cuanto a la expresión de ligandos de la vía. Los ligandos DPP (Figura 22), Act β (Figura 24) y Myo (Figura 25) fueron los que mayor consistencia mostraron en cuanto a la expresión en todas las ILNvs mientras que GBB (Figura 23) se expresó en una o dos ILNvs existiendo diferencias entre algunos cerebros analizados. Parte de estas diferencias pueden deberse a las líneas utilizadas como reporteras.

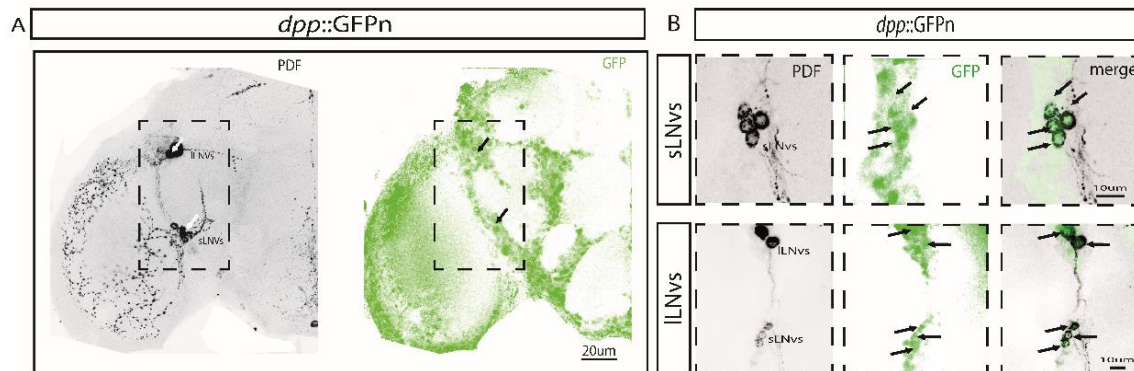


Figura 22. **Las LNvs expresan DPP.** **A.** Imágenes confocales representativas de la línea *dpp::GFPn*, donde GFP (panel derecho) reporta la expresión de DPP. La imagen de la izquierda muestra la señal del neuropéptido PDF para identificar a las LNvs; las flechas en ambas imágenes indican la co-localización de la señal de PDF con GFP. **B.** Imágenes confocales representativas de la región recuadrada con líneas punteadas mostrando con mayor detalle las sLNvs (imágenes superiores) y las ILNvs (imágenes inferiores). En gris se muestra la señal de PDF y en verde la de GFP, las flechas indican co-localización entre estas dos señales.

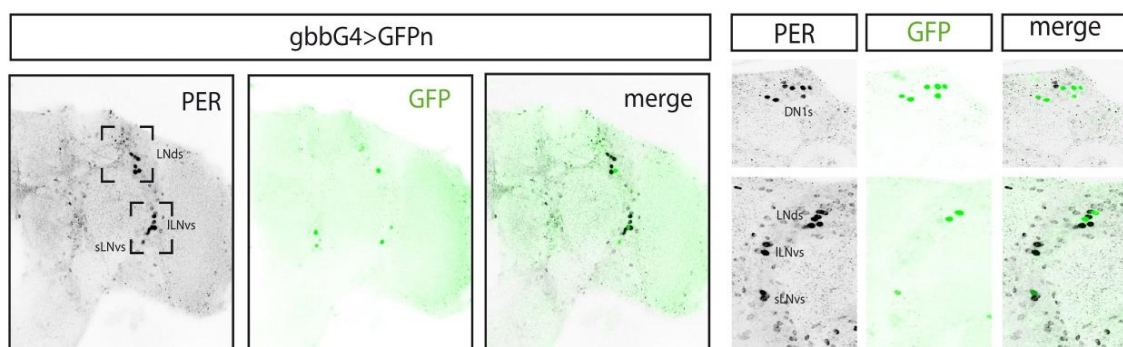


Figura 23. **Algunas LNvs expresan GBB.** **A.** Imágenes confocales representativas de un hemisferio. La imagen del panel izquierdo muestra la señal de la proteína reloj PER que permite identificar los distintos grupos circadianos. En la imagen del medio se muestra la señal de GFP bajo el control de la línea reportera *gbbG4* (verde) y a la derecha una composición de ambas imágenes que permite mostrar el grado de colocación entre las dos señales. **B.** Imágenes confocales representativas detallando los distintos grupos circadianos: DN1s en la imagen superior, LNds, ILNvs y sLNvs en las imágenes inferiores. Las imágenes de la izquierda

Resultados

muestran la señal para PER (gris), la del medio GFP (verde) y a la derecha una composición de ambas imágenes.

Las sLNvs también expresan los ligandos DPP (Figura 22) y Act β (Figura 24); por otro lado GBB (Figura 23) mostró expresión en una sLNv y sólo en algunos cerebros y no se observó expresión del ligando Myo.

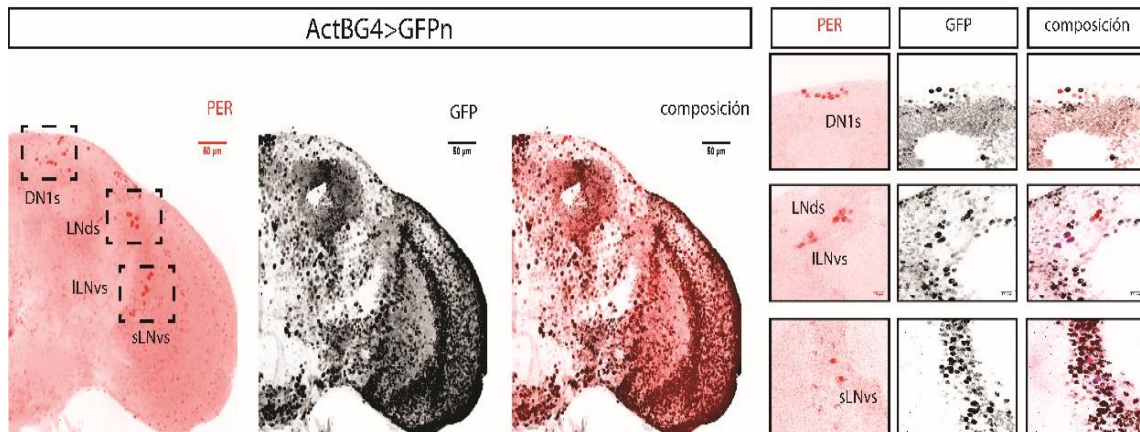


Figura 24. **Diferentes grupos circadianos expresan Act β .** **A.** Imágenes confocales representativas de hemicerebros. En rojo (imagen izquierda) se muestra la señal de la proteína reloj PER que permite identificar los distintos grupos circadianos; en el medio, en gris, la señal de GFP cuya expresión está dirigida por la línea “*driver*” Act β G4 y en la imagen de la derecha se muestra la composición de ambas señales. **B.** Imágenes confocales detallando distintos grupos de neuronas circadianas: las DN1s en las imágenes superiores; las LNds y ILNvs en las imágenes del medio, y las sLNvs en las imágenes inferiores. En rojo se muestra la señal de PER (izquierda) en el medio en gris la señal de GFP y a la derecha composición de ambas.

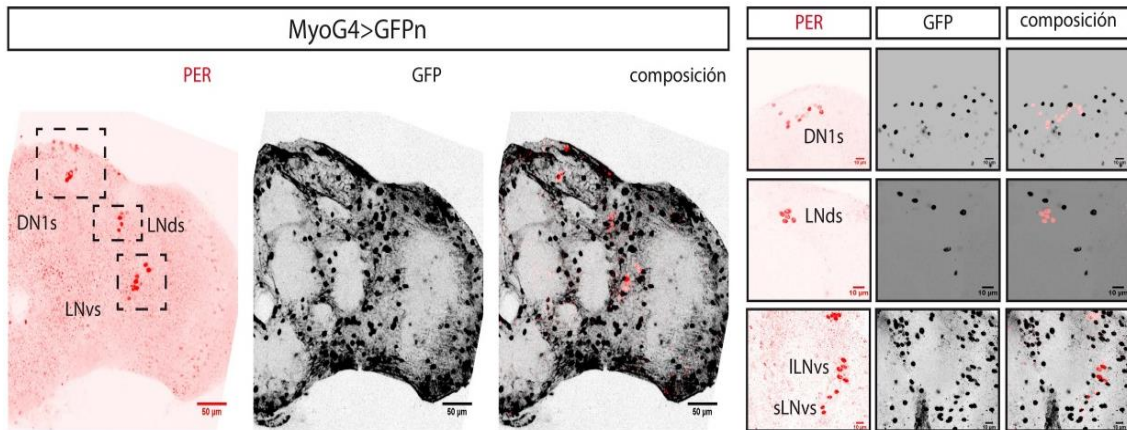


Figura 25. **Las LNvs expresan Myo.** **A.** Imágenes confocales representativas de hemicerebros mostrando los distintos grupos circadianos a través de la señal de PER (rojo) los distintos grupos se muestran con un recuadro con líneas punteadas. En la imagen del medio en gris se muestra la señal de GFP dirigida por la línea “driver” *MyoG4*. En la imagen de la derecha se muestra la composición de ambas señales. **B.** Detalles de los distintos grupos circadianos: DN1s, imágenes superiores; LNds en el medio y ILNvs y sLNvs, inferiores. En rojo se muestra la señal de PER y en gris la de GFP.

Los ligandos DAW y SCW presentaron una expresión en la glía, lo que pudo ser determinado por su co-localización con anticuerpos específicos como anti-REPO. La expresión del ligando MAV fue muy acotada reportándose señal en la región del lóbulo óptico, en la PI y en algunos cerebros una señal no muy intensa en las LNvs (ANEXO I).

5 Capitulo II: Comunicación a través de la vía de BMP entre neuronas circadianas y su rol en la actividad locomotora

5.1 La desregulación específica de los ligandos en grupos de neuronas circadianas genera desconsolidación de la actividad locomotora

5.1.1 *Desregulación de los ligandos de la vía con expresión en las LNvs*

Una vez conocidos los patrones de expresión de cada ligando y sabiendo cuales se expresan en grupos específicos de neuronas circadianas nos preguntamos cuál era el efecto de desregular específicamente cada uno de ellos en las neuronas circadianas donde se expresaban. Utilizando ARN_is específicos para cada ligando y líneas “drivers” para dirigir su expresión a los grupos de interés, disminuimos la expresión de cada ligando en los distintos grupos de neuronas circadianas. Tal como se había observado en trabajos previos del laboratorio (Beckwith et al., 2013) la falta de los ligandos generó una desconsolidación de la actividad locomotora (Figura 26 y Figura 27).

Para el caso de las sLNvs (Figura 26 A) la desregulación tanto de DPP como de MAV generó desconsolidación de la actividad locomotora (Ritmicidad: *Kruskal-Wallis test* $H X^2(3) = 15,84$; $p < 0,05$; *Dunn's multiple comparisons test*: $r6G4 > dicer$ vs. $r6G4 > dicer, dppi$ $p = 0,0023$; $r6G4 > dicer$ vs. $r6G4 > dicer, myoi$, $p = 0,8533$; $r6G4 > dicer$ vs. $r6G4 > dicer, mavi$, $p = 0,0035$).

En cuanto al período de la actividad locomotora se observó un alargamiento que fue estadísticamente significativo (Periodicidad: *Kruskal-Wallis test* $H X^2(3) = 14,34$; $p < 0,05$; *Dunn's multiple comparisons test*: $r6G4 > dicer$ vs. $r6G4 > dicer, dppi$ $p = 0,0004$; $r6G4 > dicer$ vs. $r6G4 > dicer, myoi$, $p = < 0,0001$; $r6G4 > dicer$ vs. $r6G4 > dicer, mavi$, $p = 0,0004$) (Figura 26 B); sin embargo, la línea driver *per se* también presentó diferencias en el período con respecto a los controles para los ARN_is de cada ligando por lo que el cambio de período fue atribuido principalmente a esta diferencia.

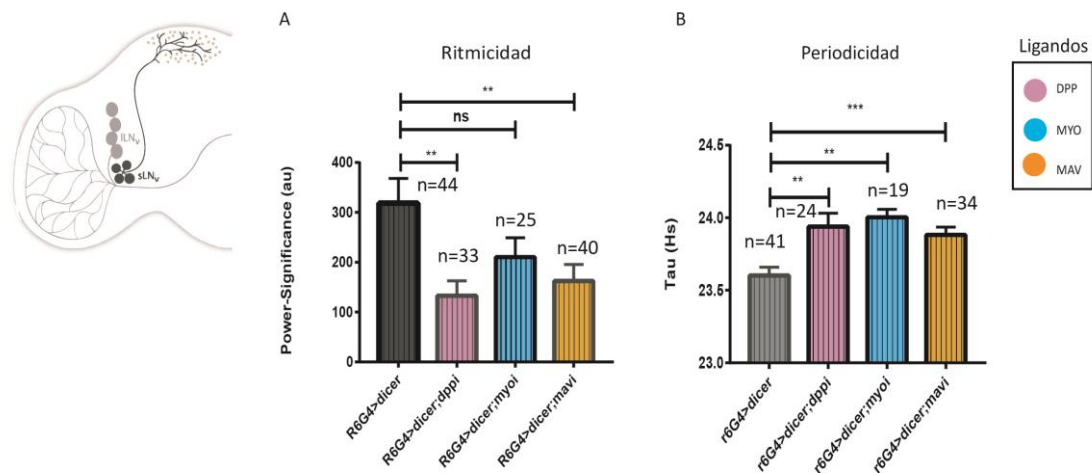


Figura 26. La desregulación de ligandos de la vía de BMP en las sLNvs generó desconsolidación de la actividad locomotora. La ilustración de la izquierda muestra un esquema de un hemicerebro donde se resaltan en negro las neuronas circadianas sLNvs. **A.** Gráfico de barras mostrando la ritmicidad medida como “power-significancia” de moscas controles (barra gris) y para los ARN_is de cada ligando. **B.** Gráfico de barras de la cuantificación de la periodicidad (Tau, horas) entre el control de la línea driver (*r6G4*) y los ARN_is para cada ligando. (*) diferencias estadísticamente significativas. A la derecha se muestra el código de colores para cada ligando. Los resultados son la sumatoria de dos experimentos independientes. Las barras muestran la media +/- SEM.

Para las ILNvs, a pesar de que se observó una tendencia a la desconsolidación de la actividad locomotora con GBB, Myo y MAV, sólo con este último se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Ritmicidad: *Kruskal-Wallis test* $H, \chi^2(3) = 29,15; p < 0,0001$; *Dunn's multiple comparisons test*: *c929G4>dicer* vs. *c929G4>dicer;gbbi* $p = 0,1463$; *c929G4>dicer* vs. *c929G4>dicer;myoi*, $p = 0,1303$; *c929G4>dicer* vs. *c929G4>dicer;mavi*, $p = < 0,0001$) (Figura 27 A).

Resultados

Llamativamente, el período del patrón de actividad locomotora se vio afectado con la desregulación de GBB; en este caso el control de la línea driver no presentó diferencias con el control para el ARN_i, por lo que se atribuyó el cambio del periodo a la falta del ligando GBB en las ILNvs. La desregulación de los otros ligandos no afectó el periodo de la actividad locomotora (Periodicidad: *Kruskal-Wallis test H*, $X^2(3) = 14,34$; $p < 0,0025$; *Dunn's multiple comparisons test*: $c929G4 > dicer$ vs. $c929G4 > dicer,gbbi$ $p = 0,0014$; $c929G4 > dicer$ vs. $c929G4 > dicer,myoi$, $p > 0,05$; $c929G4 > dicer$ vs. $c929G4 > dicer,mavi$, $p = 0,1784$) (Figura 27 B).

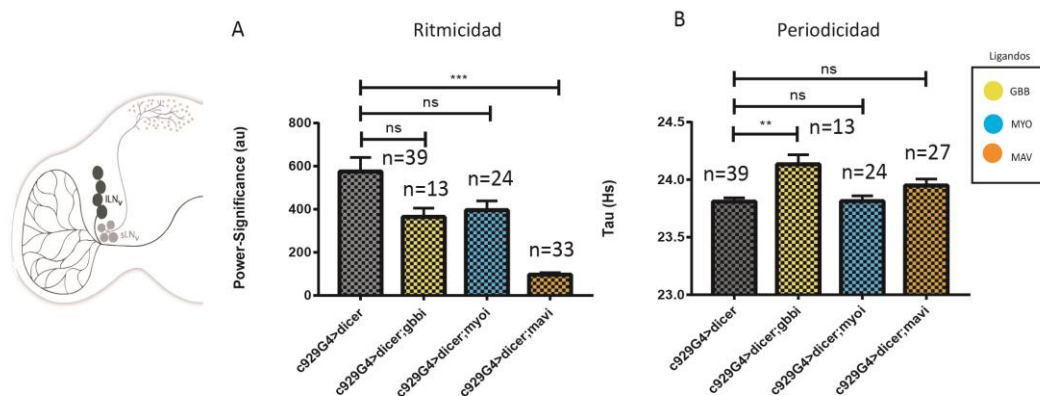


Figura 27. La liberación de distintos ligandos desde las ILNvs afecta propiedades básicas del comportamiento rítmico. La ilustración de la izquierda muestra un esquema de un hemisferio donde se resaltan en negro las ILNvs. **A.** Gráfico de barras mostrando la ritmicidad medida como “*power-significancia*” de moscas controles (barra gris) y para los ARN_is de cada ligando. **B.** Gráfico de barras de la cuantificación de la periodicidad (Tau, horas) entre el control de la línea driver ($c929G4$) y los ARN_is para cada ligando. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas. A la derecha se muestra el código de colores para cada ligando. Los gráficos representan los resultados de dos experimentos independientes.

Dado que existen diferencias en la fuerza de expresión de los distintos “*drivers*” y considerando que previamente (Beckwith et al., 2013) utilizó la línea *pdfG4* para desregular los ligandos en las LNvs, parte de las diferencias observadas pueden deberse a diferencias en la efectividad de los ARN_is específicos utilizados para silenciar cada ligando. Experimentos con otros drivers para sLNvs y ILNvs son necesarios para evaluar esta posibilidad. Sin embargo, y a pesar de la falta de significancia estadística para algunos de los ligandos, en todos los casos se observó una tendencia a la disminución en la consolidación de los patrones de actividad.

5.1.2 Desregulación de Actβ

La desregulación de Actβ generó una desconsolidación de la actividad locomotora que fue estadísticamente significativa cuando se desreguló en todas las neuronas circadianas (*timG4*) y en el grupo de las LNds (*Mai179;pdfG80*). En el resto de los grupos la disminución del ligando si bien pareció generar una tendencia, ésta no fue estadísticamente diferente del control (Ritmicidad: *Kruskal-Wallis test H*, $X^2(12)=200,3$; $p<0,0001$; *Dunn's multiple comparisons test*) (Figura 28 A).

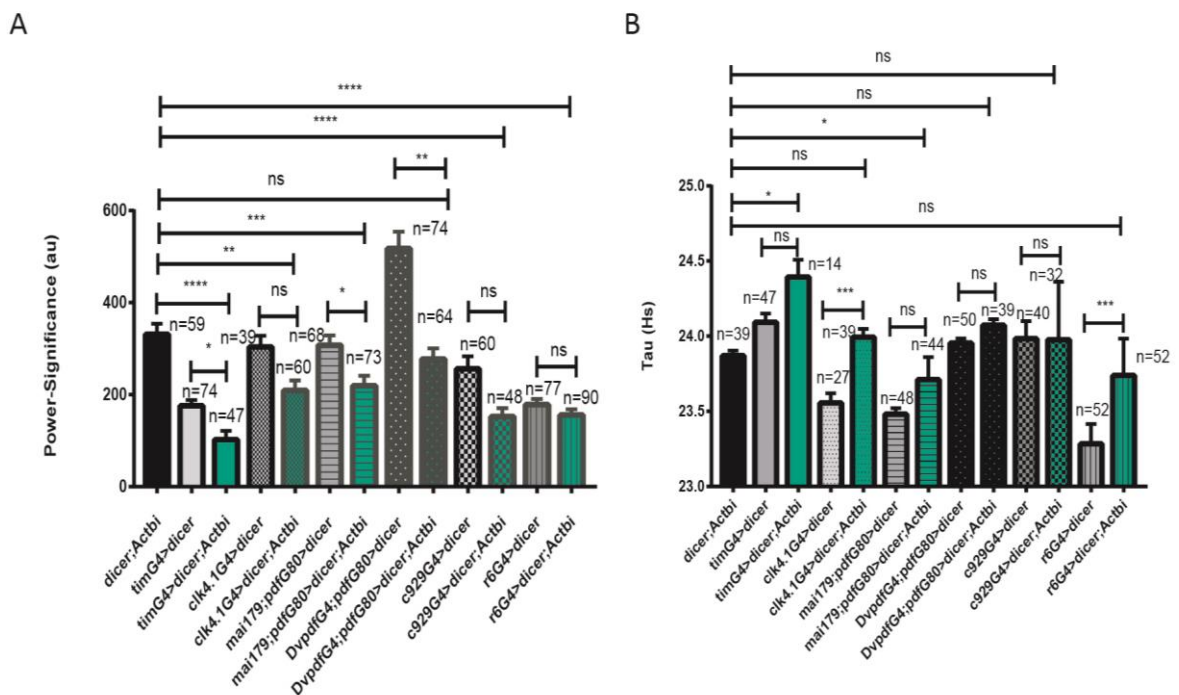


Figura 28. La falta de Actβ en grupos circadianos específicos generó desconsolidación de la actividad locomotora sin afectar el período. **A.** Gráfico de barras detallando la cuantificación de la ritmicidad como power-significancia. **B.** Cuantificación del período de la actividad locomotora (Tau, Hs). La barra negra muestra el control común a todos los genotipos (*dicer;Actβ*). En gris, con distintos patrones, se muestran los controles específicos para cada línea “driver” y en verde el genotipo con el ARNi para Actβ. (*) El asterisco destaca las comparaciones que fueron estadísticamente diferentes. *Kruskal-Wallis test*. Los gráficos representan los resultados de tres experimentos independientes. Las barras indican la medias +/- SEM.

La desregulación de Act β en grupos específicos de neuronas reloj no afectó el período de la actividad locomotora. Aunque se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas entre algunos grupos, estas diferencias no fueron consistentes entre los distintos controles (Período: *Kruskal-Wallis test H*, $X^2(12)=201,5$; $p<0,0001$; *Dunn's multiple comparisons test*) (Figura 28 B).

5.1.3 Act β no es necesario para permitir un ajuste de fase de la actividad locomotora

Los parámetros evaluados dentro del paradigma de la actividad locomotora circadiana, como la ritmicidad y el período, permiten determinar la relevancia de genes de interés en el control y regulación del reloj molecular que dirige este comportamiento. Sin embargo, muchas veces otros aspectos de la actividad locomotora pueden verse afectados y para poder detectarlos es necesario forzar al reloj a ajustarse a otras condiciones diferentes a las que habitualmente se encuentra entrenado. En este sentido, cuando el reloj circadiano y la comunicación entre las neuronas reloj se encuentra en un correcto funcionamiento, los individuos deben ser capaces de adaptarse rápidamente a cambios ambientales. Ejemplos de estos cambios son las modificaciones en las condiciones de iluminación, en la duración de las horas de luz y oscuridad (diferentes fotoperíodos) o variaciones en el momento en el que ocurren estos eventos (cambios de fase).

Para evaluar si parte de esta adaptación podía estar mediada por la comunicación a través de la vía de BMP, y en particular a través de Act β , realizamos experimentos de cambios de fase. Se entrenaron los individuos a condiciones de luz y oscuridad con ciclos de 16:8 horas, para distinguir más eficientemente los picos que evidencian actividad anticipatoria (mediada por el reloj) de aquellos que son la respuesta inmediata a la condición de iluminación (conocidos como "startle effect") (Yoshii et al., 2015). Luego de siete días se realizó un retraso de fase de 8 horas prolongando las horas de luz y retrasando el inicio de la noche; los individuos se mantuvieron por siete días más en la nueva fase (Figura 29A). Utilizando el sistema UAS/G4 y ARNis específicos para Act β desregulamos la expresión del ligando en todas las neuronas circadianas (d*Clk856G4*) en las DN1s (*clk4.1;pdfG80G4*) y en las LNvs (*pdfG4*). En trabajos reportados en la literatura que muestran experimentos similares, el cambio de fase es observable al día siguiente en individuos normales; sin embargo, en mutantes para proteínas reloj relevantes como CRY (*cry⁰¹*) se observa un retraso en el ajuste a la nueva fase, que es particularmente evidente en el pico de la

tarde (Yoshii et al., 2015) (Figura 29 B). En nuestro caso no observamos diferencias significativas en la capacidad de ajuste al cambio de fase entre los controles y los individuos que expresaron el ARN_i para *Actβ* (Figura 29 C). Sin embargo se observó que la falta de *Actβ* afectó notablemente la actividad anticipatoria de la tarde y la respuesta a los cambios de iluminación “*startle effect*” (Figura 29 D).

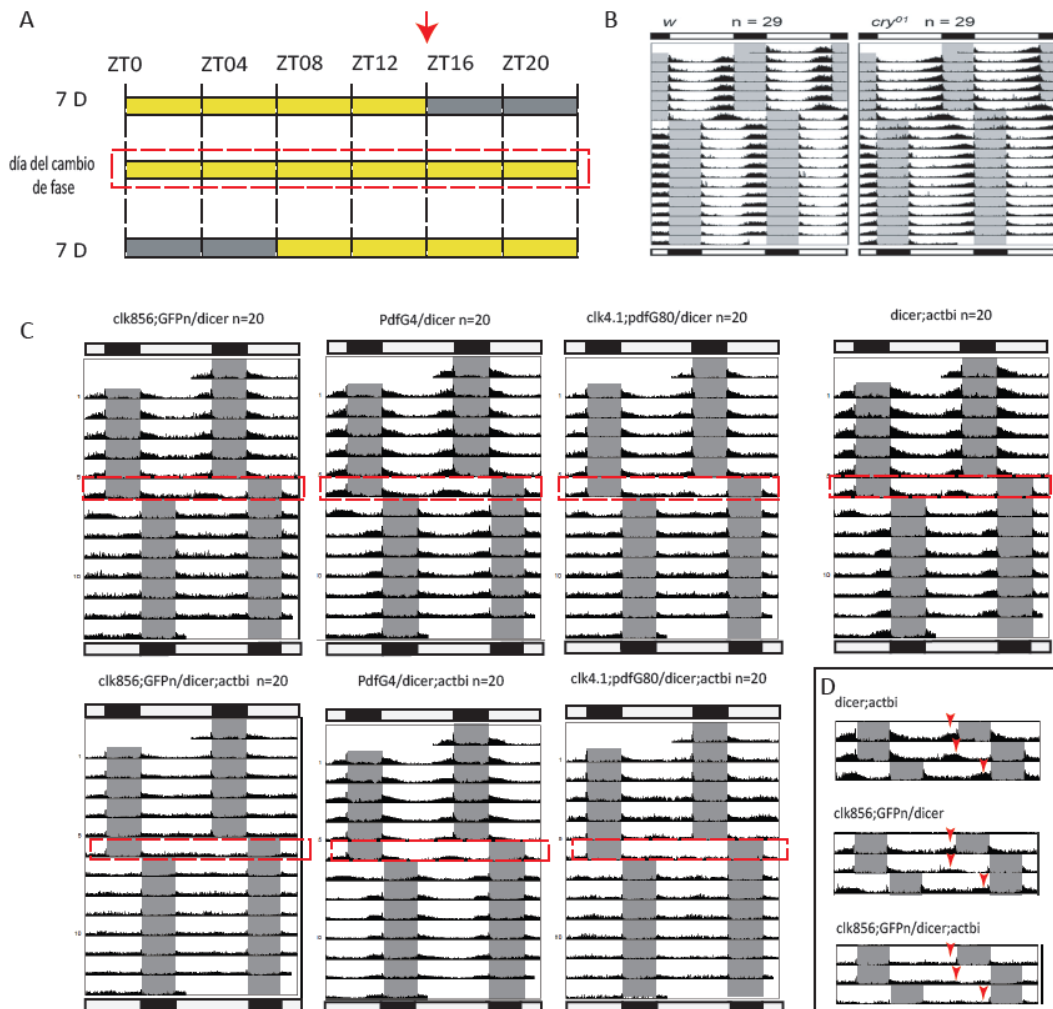


Figura 29. **La disminución de *Actβ* afecta la consolidación de la actividad al atardecer, independiente de los cambios de fase.** **A.** Esquema del experimento de cambio de fase, ZT indica el momento del día. Durante los primeros siete días los individuos se mantuvieron bajo un régimen de LD 16:8 cómo indica la figura, luego durante el día de cambio de fase se mantuvieron en condiciones constantes de luz retrasando el apagado hasta ZT0 del siguiente día. Se mantuvieron por siete días más en la nueva fase. Los recuadros amarillos indican los momentos de luz, y los grises, los de oscuridad. **B.** Actogramas ejemplo de experimentos similares de Yoshii *et al.*, (2015) donde se muestra a la izquierda el actograma promedio de individuos salvajes y a la derecha de mutantes para la proteína CRY (*cry⁰¹*). **C.** Actogramas promedio de los genotipos analizados; en la parte superior se muestran los controles y en el

panel inferior on el ARN_i de *Actβ*. El recuadro rojo indica el día de cambio de fase. **D.** Detalle de los actogramas para el driver *dClk856* y sus controles. Con la flecha roja se indica en pico de la tarde en los días anteriores al cambio, el día del cambio y el posterior. Las zonas grises indican los momentos de oscuridad y las blancas de luz.

5.1.4 La desregulación de *Actβ* reduce la anticipación de la tarde

La disminución de *Actβ* en la red circadiana (bajo el control de *dClk856*) tuvo un efecto claro sobre la anticipación de la tarde (Figura 29 D y

Figura 30). Este efecto de disminución en la anticipación fue evidente antes y luego del cambio de fase por lo que no parecería estar relacionado con este fenómeno (Figura 31).

Por este motivo nos propusimos analizar el índice de anticipación (EI, *evening index*) según el método utilizado en Stoleru et al. (2004). Se observaron diferencias significativas en el índice de anticipación de la tarde entre el control y la desregulación de *Actβ* sólo para la desregulación en todas las neuronas circadianas (*dClk856G4*) siendo menor en el último caso (*Kruskal-Wallis test*: $X^2_{(9)}=44,37$, $p<0,0001$) (Figura 30 y Figura 31).

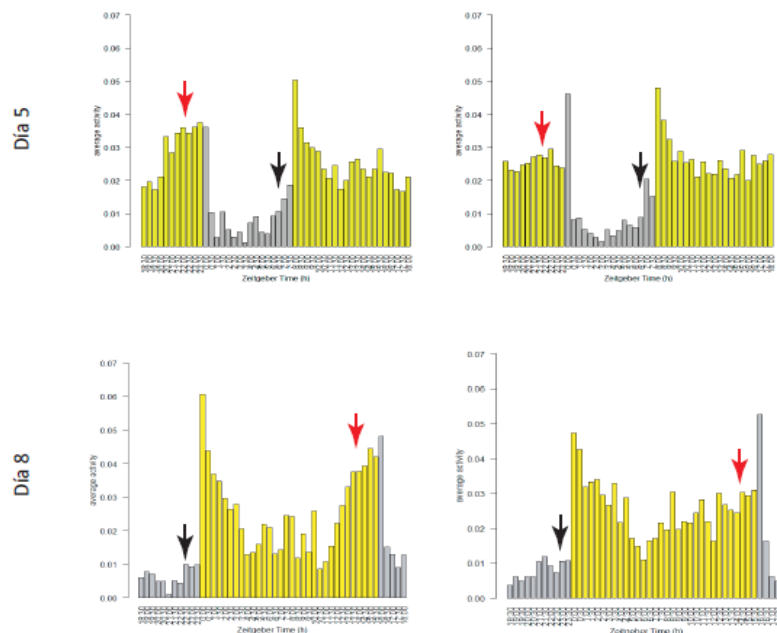


Figura 30. **La desregulación de *Actβ* en todas las neuronas circadianas generó pérdida de la anticipación de la tarde.** Gráficos del promedio de actividad normalizada de 20 individuos

control (*dClk856>dicer*, izquierda) y con el ARNi de *Actβ* (*dClk856;GFP>dicer;Actβi*, derecha) para el día previo al cambio de fase (Día 5, gráficos superiores) y para un día luego del cambio (Día 8, gráficos inferiores). Las barras amarillas indican presencia de luz y las grises, de oscuridad. Las flechas rojas muestran el pico de la tarde y las negras el de la mañana. Los animales se mantuvieron en una condición de luz-oscuridad de 16:8 horas respectivamente.

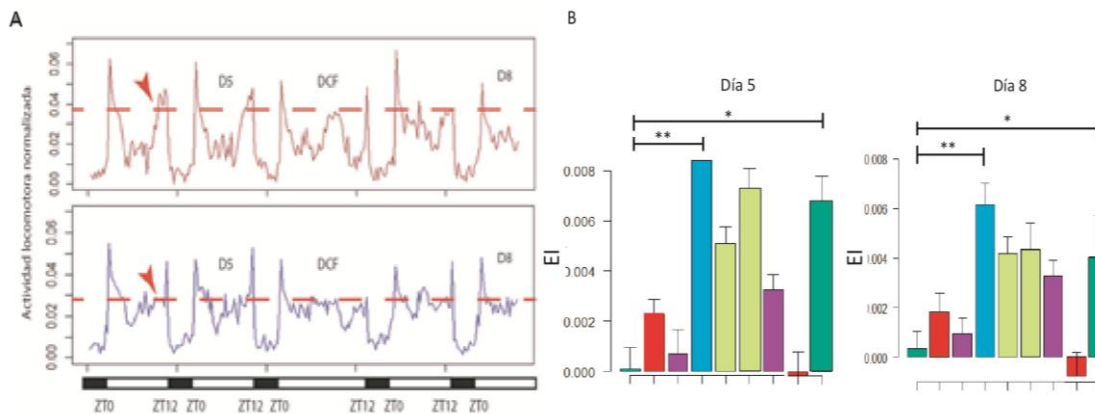


Figura 31. La desregulación de *Actβ* en todas las neuronas circadianas generó la pérdida de la anticipación de la tarde. **A.** Actividad promedio normalizada de todas las moscas del mismo genotipo a lo largo de varios días, antes y luego del cambio de fase (DCF); en el panel superior se muestra el control *dClk856>dicer;GFPn* (color marrón) y en el inferior en color azul la línea con el ARNi para *Actβ*. Las flechas rojas indican el pico de la tarde y la línea punteada la altura del pico a lo largo de los días. **B.** Cuantificación del índice de anticipación; se cuantificó la actividad promedio normalizada de cada genotipo 3 horas antes del apagado de las luces y se obtuvo por regresión lineal la pendiente (EI, *evening index*); los gráficos muestran la media de la pendiente +/- SEM para cada genotipo, para el día 5 antes de cambio de fase (gráfico de la izquierda) y para dos días luego del cambio de fase, día 8 (gráfico de la derecha). (*) Indica diferencias estadísticamente significativas. Colores iguales indican la línea control driver y la línea con el ARNi de *Actβ* (verde oscuro: *dClk856G4*, rojo: *Mañ179G4*, violeta: *clk4.1 G4*, verde claro: *pdfG4*, azul: control de ARNi). Kruskal-wallis test.

5.2 Rol de DPP y GBB en las LNvs

Entre los ligandos expresados por las LNvs, DPP y GBB pertenecen a la rama ("BMP-like") y generan su efecto uniéndose al mismo tipo de receptores Tipo II (WIT) y Tipo I (SAX y TKV); ambos ligandos son capaces de formar heterodímeros y durante el desarrollo embrionario las diferencias en concentración de uno y otro determinan diferentes patrones de desarrollo (Bangji and Wharton, 2006).

Previamente en el laboratorio el trabajo de Beckwith et al. (2013) había encontrado que la desregulación de cada uno de estos ligandos en las LNvs generaba desconsolidación de la actividad locomotora. Nos preguntamos, dado que estos ligandos pueden actuar de manera sinérgica, si la desregulación conjunta podía potenciar el efecto sobre la consolidación de la actividad locomotora o afectar otros aspectos, como el período de la actividad.

Para esto realizamos una desregulación constitutiva utilizando un *driver* específico de las neuronas PDF (sLNvs y lLNvs, *pdfG4*) y ARN de interferencia específicos para *dpp* y *gbb* en simultáneo.

La desregulación de ambos ligandos generó desconsolidación de la actividad locomotora, observada como una disminución en el porcentaje de ritmicidad, que fue estadísticamente diferente de los controles (Ritmicidad: *One-way analysis of variance*, $F_{(2,11)} = 6,675$, $p = 0,0167$; *Tukey's Multiple Comparison Test*: *dicer, pdfG4>+* vs *dicer, dppi>gbbi*, $p > 0,05$; *dicer, pdfG4>+* vs *pdfG4; dppi>gbbi*, $p > 0,05$ y *dicer, dppi>gbbi* vs *pdfG4; dppi>gbbi*, $p < 0,05$) sin afectarse el periodo de la actividad (Periodicidad: *Kruskal-Wallis test*, $X^2_{(2)} = 36,31$, $p < 0,0001$; *Dunn's multiple comparisons test*: *dicer, pdfG4>+* vs *dicer, dppi>gbbi*, $p = 0,2521$; *dicer, pdfG4>+* vs *pdfG4; dppi>gbbi*, y *dicer, dppi>gbbi* vs *pdfG4; dppi>gbbi*, $p < 0,0001$) (Figura 32).

Resultados

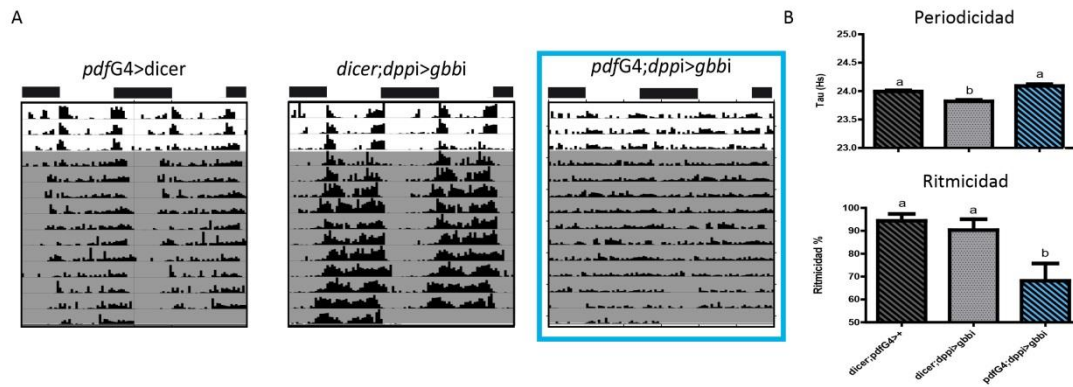


Figura 32. **Desregulación de *dpp* y *gbb* en las LNvs.** **A.** Actogramas representativos de controles genéticos (izquierda y medio) y de animales que expresan constitutivamente los ARNs de *dpp* y *gbb* en las LNvs (recuadro celeste). **B.** Los gráficos de barras muestran la cuantificación para el período (Tau hs, gráfico superior) y la consolidación de la actividad (Ritmicidad %, gráfico inferior). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Los resultados corresponden al promedio de 4 experimentos independientes. Las barras indican la media +/- SEM.

Teniendo en cuenta que tanto las “*small*” como las “*large*” LNvs expresan en mayor o menor medida los ligandos DPP y GBB, nos preguntamos si la falta de consolidación en la actividad se debía a la imposibilidad de algunos de los dos de grupos para comunicarse con las propias sLNvs. Para comprobar lo anterior realizamos experimentos de actividad locomotora utilizando *drivers* específicos de cada grupo, *c929G4* que si bien se expresa en varias neuronas en el cerebro adulto, dentro de la red circadiana es exclusivo de las ILNvs y *r6G4* (con expresión en las sLNvs).

Llamativamente, la reducción de niveles de *dpp* y *gbb* en las ILNvs tuvo un claro efecto sobre la consolidación de la actividad que fue estadísticamente significativo (Ritmicidad: *One-way analysis of variance*, $F_{(2,11)} = 19,76$, $p = 0,0005$; *Tukey's Multiple Comparison Test*: *dicer;c929G4>+* vs *dicer;dppi>gbbi*, $p > 0,05$; *dicer;c929G4>+* vs *c929G4;dppi>gbbi*, $p < 0,05$ y *dicer;dppi>gbbi* vs *c929G4;dppi>gbbi*, $p < 0,05$) (Figura 33).

Al igual que en experimentos anteriores no se observaron cambios en el período de la actividad locomotora por efecto de la desregulación de ambos ligandos (Periodicidad: *One-way analysis of variance*, $F_{(2, 131)} = 2,819$, $p = 0,0633$; *Tukey's Multiple Comparison Test*: *dicer;c929G4>+* vs *dicer;dppi>gbbi*, $p > 0,05$;

dicer;c929G4>+ vs *c929G4;dppi>gbbi*, $p > 0,05$ y *dicer;dppi>gbbi* vs *c929G4;dppi>gbbi*, $p > 0,05$) (Figura 33).

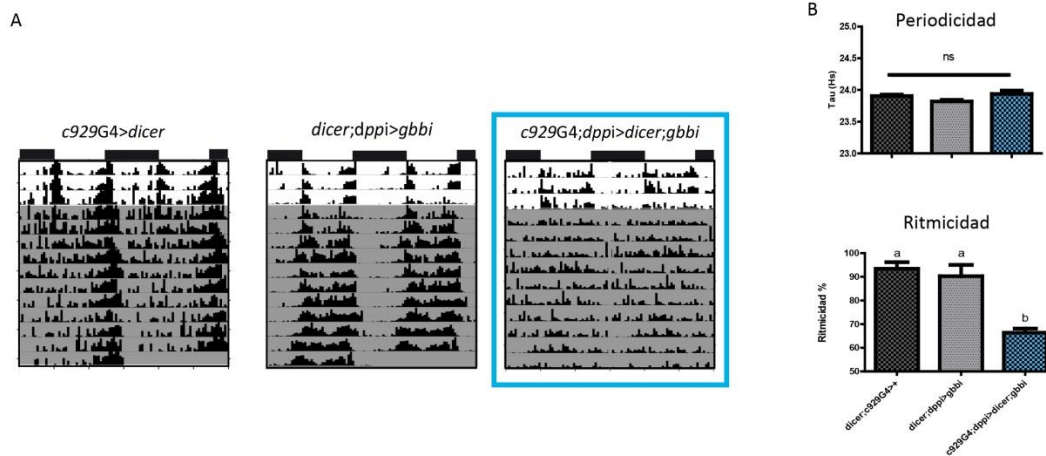


Figura 33. **Desregulación de *dpp* y *gbb* en las ILNvs.** **A.** Actogramas representativos de los controles (izquierda y medio) y de individuos que expresan ARN_is de *dpp* y *gbb* en las ILNvs (recuadro celeste). **B.** Los gráficos de barras muestran la cuantificación para el Periodo (Tau hs, gráfico superior) y consolidación de la actividad (Ritmicidad %, gráfico inferior). Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes. Las barras muestran la media +/- SEM.

La desregulación conjunta de los ligandos en el grupo de las sLNvs generó desconsolidación de la actividad locomotora, sin embargo el efecto no resultó ser estadísticamente diferente a unos de los controles (*Kruskal-Wallis test*, $X^2_{(2)} = 6,347$, $p = 0,0282$; *Dunn's multiple comparisons test*: *dicer;r6G4>+* vs *dicer;dppi>gbbi*, $p > 0,05$; *dicer;r6G4>+* vs *r6G4;dppi>gbbi*, $p = 0,0434$ y *dicer;dppi>gbbi* vs *r6G4;dppi>gbbi*, $p > 0,05$) (Figura 34).

El período de la actividad locomotora fue diferente sólo al compararse con la línea *driver* (*r6G4*) la cual presenta por sí sola una fenotipo de período más corto en relación a otras líneas control. Por ello a pesar de la diferencia estadística no es posible atribuir este cambio en el período a la desregulación de los ligandos. (Periodicidad: *Kruskal-Wallis test*, $X^2_{(2)} = 34,72$, $p < 0,001$; *Dunn's multiple comparisons test*: *dicer;r6G4>+* vs *dicer;dppi>gbbi*, $p < 0,05$; *dicer;r6G4>+* vs *r6G4;dppi>gbbi*, $p < 0,05$ y *dicer;dppi>gbbi* vs *r6G4;dppi>gbbi*, $p > 0,05$).

Resultados

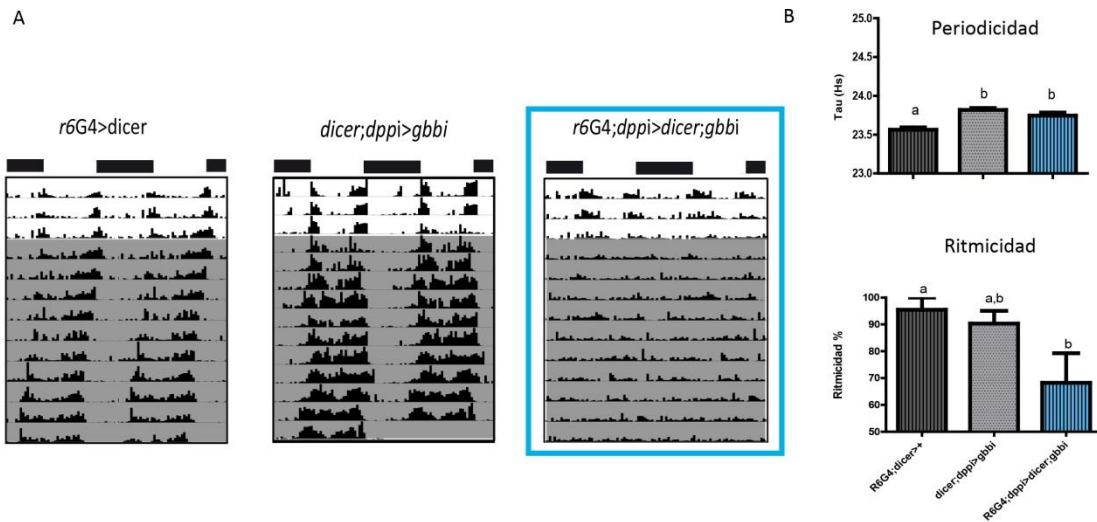


Figura 34. **Desregulación de *dpp* y *gbb* en las sLNvs.** **A.** Actogramas representativos de los controles (izquierda y medio) y de individuos que expresan los ARNs de *dpp* y *gbb* en las sLNvs (derecha, recuadro celeste). **B.** Los gráficos de barras muestran la cuantificación para el período (Tau hs, gráfico superior) y consolidación de la actividad (Ritmicidad %, gráfico inferior). Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes. Las barras muestran la media +/- SEM.

5.2.1 Las sLNvs y ILNvs utilizan a DPP y GBB como parte de la comunicación que permite la consolidación de la actividad locomotora

Dado que tanto DPP como GBB en condiciones de desregulación crónica generan desconsolidación de la actividad, tanto cuando son desregulados individualmente como en conjunto, nos preguntamos si la falta de estos ligandos de manera adulto-específica también afectaba la actividad locomotora, puesto que ambos ligandos son importantes durante el desarrollo y parte del efecto observado al afectar sus niveles crónicamente podría deberse a la falta de los ligandos en esa etapa (Affolter and Basler, 2007; Bangi and Wharton, 2006; Capovilla and Botas, 1998; Capovilla et al., 1994; de Celis et al., 1996; Hamaratoglu et al., 2014; Marques et al., 1997; Vuilleumier et al., 2010; Weiss et al., 2010). En ese sentido, nuestro laboratorio ya ha demostrado que en las LNvs la activación crónica de la vía por sobreexpresión de GBB puede afectar la morfología de los axones de las sLNvs (Gorostiza and Ceriani, 2013).

Para realizar estas desregulaciones de manera adulto-específica se empleó el sistema *Target*; las moscas se desarrollaron a 18°C (temperatura a la cual es activo el represor de GAL4) y los experimentos de actividad locomotora se realizaron a 30°C

(temperatura a la cual el represor de GAL4 es inactivo) para permitir la transcripción de los ARN_i.

5.2.2 Desregulación adulto-específica de DPP y GBB en las ILNvs

Para corroborar que estos ligandos se emplean a diario en el adulto, se analizó la contribución de la comunicación de las ILNvs a través de DPP y GBB. Para ello se utilizó la línea *driver* ILNvsG4;*tubG80ts* para desregular la expresión con ARN_is específicos para cada ligando.

La desregulación adulto-específica de DPP en las ILNvs generó una desconsolidación de la actividad locomotora, lo cual sugiere que este ligando es empleado regularmente por las ILNvs (Ritmicidad: *Mann Whitney test*, $U = 5$, $n_1=13$, $n_2=12$, $p < 0,0001$ *two-tailed*) (Figura 35 B). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al período de la actividad locomotora (Periodicidad: *Mann Whitney test*, $U = 39$, $n_1=13$, $n_2=12$, $p = 0,0593$ *two-tailed*) (Figura 35 B).

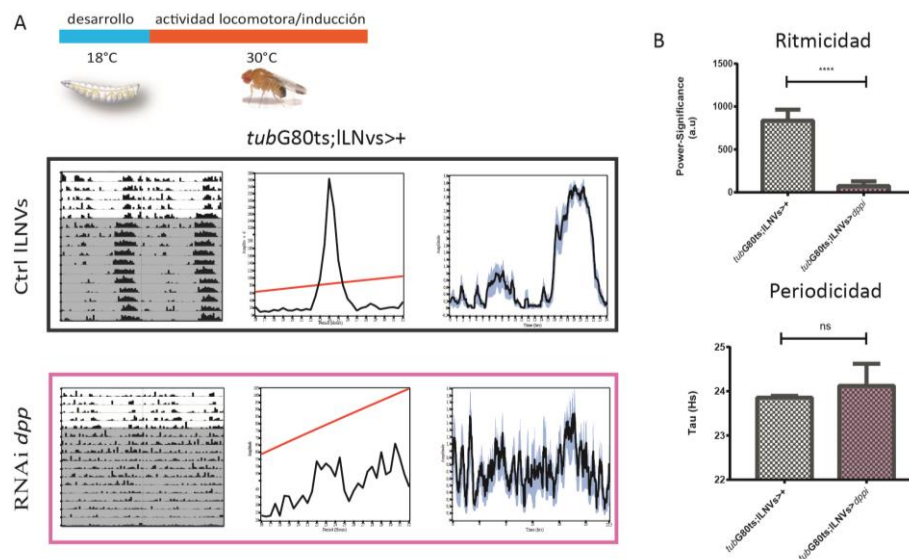


Figura 35. **La desregulación adulto-específica de DPP en las ILNvs generó desconsolidación de la actividad locomotora.** **A.** Actogramas (izquierda), periodograma (medio) y promedio de actividad (derecha) representativos del control para la línea *driver* (, recuadro negro) y para la línea con el RNAi para *dpp* (recuadro rosa). Con un recuadro sombreado se indican los días que permanecieron en condiciones de oscuridad constante. **B.** Cuantificación y análisis de la ritmicidad (*power-significancia*) y de la periodicidad de la actividad locomotora (Tau, hs). Las barras cuadrículadas de la izquierda pertenecen a los controles de la línea *driver* (*tubG80ts; ILNvs>+*) y las de la derecha en rosa la línea con el

RNAi de *dpp* bajo el driver de ILNvs. (*) Diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan el promedio de animales de un experimento. Se grafica la media +/- SEM.

Curiosamente, además de la desconsolidación de la actividad en oscuridad constante, también se observó que la actividad durante el LD (condición de luz y oscuridad) era diferente al control y las anticipaciones de la mañana y de la tarde parecían estar afectadas. Para analizar la actividad en este momento, realizamos el promedio de la actividad normalizada de cada individuo para los controles y para la línea con el ARNi de *dpp* en las ILNvs. Se analizó el segundo día de LD y se compararon los perfiles de actividad en ambos genotipos.

El análisis global de los perfiles de actividad sugiere que la principal diferencia es en el incremento de actividad que precede al amanecer (pico de la mañana) así como en la respuesta a las transiciones del amanecer y atardecer (fenómeno que no responde al reloj per se). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad anticipatoria de la mañana; la actividad promedio previa al inicio del día fue menor cuando se desreguló DPP. Lo mismo se observó en la respuesta al cambio de iluminación (conocido como “*startle effect*”) que fue menor para el ARNi de *dpp*, así como también la actividad posterior. No se observaron diferencias en la actividad durante la “siesta” y nuevamente se observó una disminución en la actividad en la respuesta al cambio de iluminación día-noche y en los minutos posteriores, mientras que la actividad durante la noche fue similar (Figura 37 A). (*Two-way RM ANOVA*: Interacción: $F(47, 2115) = 8,42, p < 0,0001$; Genotipo: $F(1, 45) = 10,11, p = 0,0027$; ZT: $F(47, 2115) = 78,69, p < 0,0001$, Post-hoc: *Sidak's multiple comparisons test*).

También se exploró la desregulación de GBB en las ILNvs de manera adulto específica y los resultados mostraron que existieron diferencias estadísticamente significativas en entre el control y la línea con el ARNi para *gbb* (Ritmicidad: *Mann Whitney test*, $U = 48, n_1=13, n_2=14, p = 0,0377, two-tailed$). La falta de GBB en las ILNvs presentó un fenotipo más desconsolidado que el control de la línea *driver* (y no se observaron cambios en cuanto al período de la actividad locomotora (Periodicidad: *Mann Whitney test*, $U = 70, n_1=13, n_2=14, p = 0,3107, two-tailed$) (Figura 36 A).

Resultados

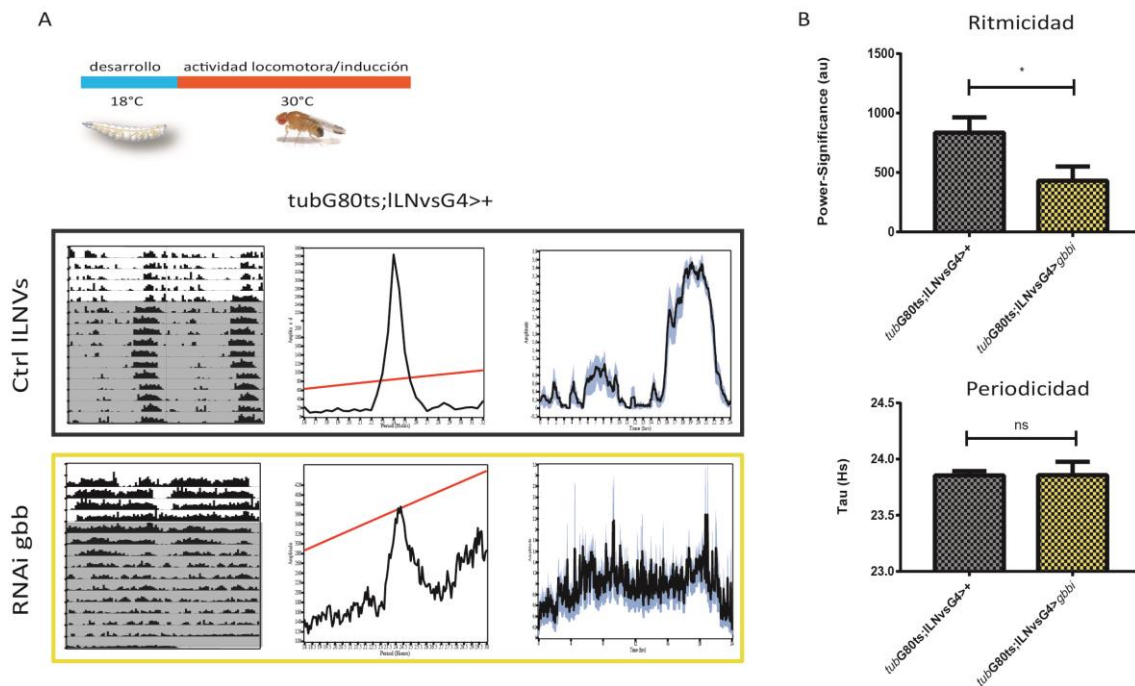


Figura 36. **La desregulación adulto-específica de GBB en las ILNvs afectó la consolidación de la actividad locomotora.** **A.** Actogramas (izquierda), periodograma (medio) y promedio de actividad (derecha) representativos del control para la línea *driver* (recuadro negro) y para la línea con el ARN_i para *gbb* (abajo, recuadro amarillo). Con un recuadro sombreado se muestran los días que permanecieron en condiciones de oscuridad constante. **B.** Cuantificación y análisis de la ritmicidad (*power-significancia*) y de la periodicidad de la actividad locomotora (Tau, hs). Las barras cuadrículadas de la izquierda pertenecen a los controles de la línea *driver* (*tubG80ts; ILNvs*) y las de la derecha en amarillo a la línea con el ARN_i de *gbb* bajo el driver de ILNvs. (*) Diferencias estadísticamente significativas. Las barras indican la media +/- SEM.

Tal como habíamos observado con la desregulación de DPP, la actividad locomotora durante los días de LD, también pareció afectada por la falta de GBB. Analizamos entonces la actividad promedio normalizada para los dos genotipos, el control y la línea con el ARN_i para *gbb*.

Al contrario de lo observado con DPP, la desregulación de GBB en las ILNvs no afectó la anticipación de la mañana, sin embargo existieron diferencias estadísticamente significativas en la anticipación de la tarde; la línea con el ARN_i para *gbb* comenzó a anticipar antes que el control, observándose diferencias a partir de ZT 17,5 hasta el momento del apagado de las luces. No se observaron diferencias en la actividad durante la noche ni durante la siesta (*Two-way RM ANOVA*: Interacción: F

(47, 2303) = 5,494, $p < 0,0001$; Genotipo: $F(1, 49) = 5,614$, $p = 0,0218$; ZT: $F(47, 2303) = 43,67$, $p < 0,0001$, Post-hoc: *Sidak's multiple comparisons test*) (Figura 37 B).

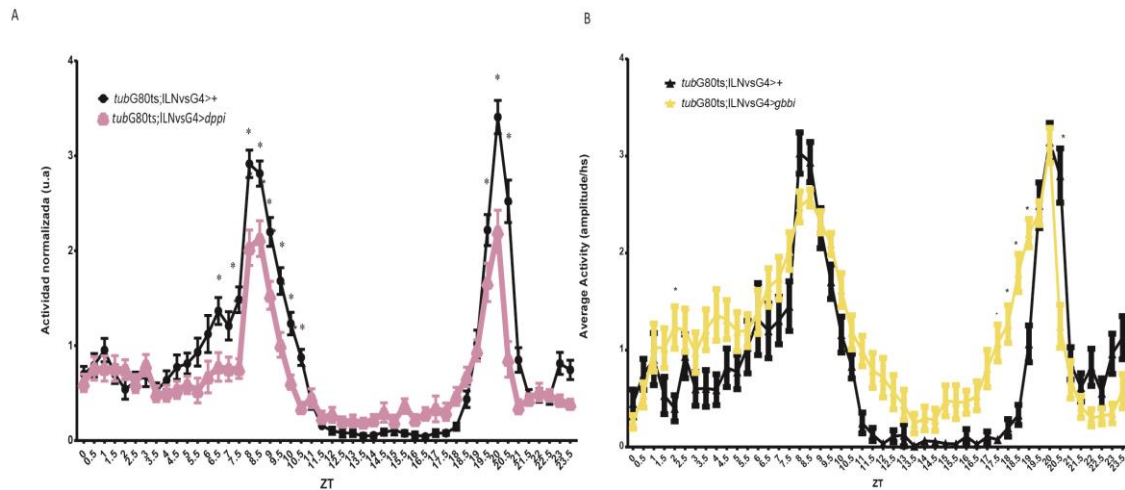


Figura 37. La **desregulación de DPP y GBB en las ILNs afecta la actividad anticipatoria de la mañana y de la tarde respectivamente**. **A.** Actividad promedio normalizada de todos los individuos del segundo día de LD del genotipo control del *driver* (*tubG80ts;ILNsG4>+*, línea negra, $n=25$) y de la línea con el ARN_i para *dpp* (*tubG80ts;ILNsG4>dpp*, línea rosa, $n=22$). **B.** Actividad promedio normalizada de todos los individuos del segundo día de LD del genotipo control del *driver* (*tubG80ts;ILNsG4>+*, línea negra, $n=25$) y de la línea con el ARN_i para *gbb* (*tubG80ts;ILNsG4>gbb*, *tubG80ts* línea amarilla, $n=24$). En el eje de las x se muestra el momento del día ZT (“*zeitgeber time*”). Se muestra la media para cada genotipo en cada momento del día +/- SEM. (*) Diferencias estadísticamente significativas.

En resumen, tanto DPP como GBB parecen cumplir un rol importante en el adulto de *Drosophila*, siendo necesarios para conseguir una consolidación de la actividad y para que las anticipaciones tanto de la mañana como de la tarde ocurran en los momentos precisos.

5.2.3 Desregulación de DPP y GBB en las sLNvs

La desregulación adulto-específica de DPP en las sLNvs generó desconsolidación de la actividad locomotora (Figura B), puesto que se observó una menor ritmicidad que fue significativamente diferente al control de la línea *driver* (Ritmicidad: *Mann Whitney test*, $U = 23$, $n_1=13$, $n_2=11$, $p = 0,0039$, *two-tailed*) (Figura 38 B). En este caso se observaron diferencias significativas en el período de la actividad locomotora entre uno (Periodicidad: *Mann Whitney test*, $U = 21$, $n_1=13$, $n_2=7$,

Resultados

$p = 0,0445$, *two-tailed*) (Figura 38 B), la línea con el ARNi para *dpp*, presentó un periodo levemente más corto; sin embargo dado que el fenotipo de desconsolidación de la actividad fue muy fuerte, la cantidad de individuos sobre los que se pudo calcular el período fue menor. Por tal motivo son necesarios más experimentos para poder corroborar si efectivamente la desregulación de *dpp* en las sLNvs genera cambios de período, dado que sería la primera vez que se observa este efecto.

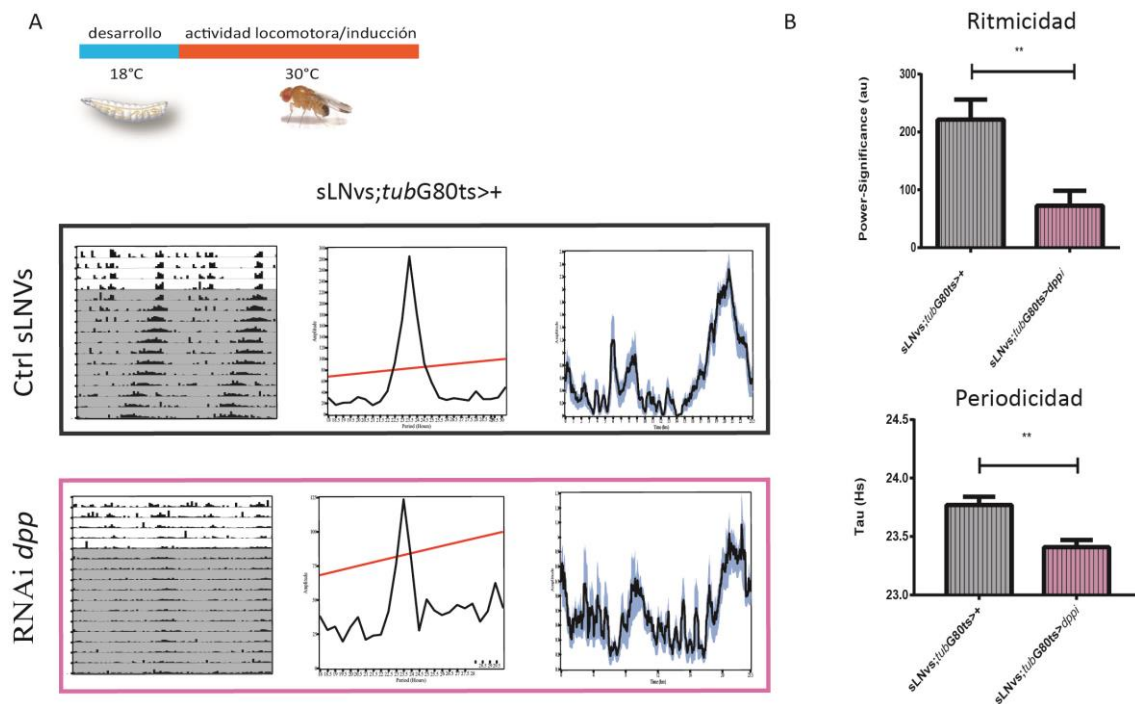


Figura 38. La desregulación adulto-específica de DPP en las sLNvs tuvo efectos sobre la consolidación de la actividad locomotora **A**. Actogramas (izquierda), periodograma (medio) y promedio de actividad (derecha) representativos del control para la línea *driver* (recuadro negro) y para la línea con el ARNi para *dpp* (recuadro rosa). **B**. Cuantificación y análisis de la ritmicidad (*power-significancia*) y de la periodicidad de la actividad locomotora (Tau, hs). Las barras rayadas de la izquierda pertenecen a los controles de la línea *driver* (sLNvsG4;tubG80ts>+) y las de la derecha en rosa a la línea con el ARNi de *dpp* bajo el driver de sLNvs. (*) Diferencias estadísticamente significativas. Las barras indican la media +/- SEM.

Al igual que lo que habíamos observado en resultados previos con desregulaciones crónicas, la desregulación adulto-específica de GBB en las sLNvs no tuvo efectos significativos sobre la consolidación de la actividad locomotora ni sobre el período de la misma (Ritmicidad: *Mann Whitney test*, $U = 47$, $n_1=13$, $n_2=14$, $p = 0,7501$, *two-tailed*) (Periodicidad: *Mann Whitney test*, $U = 35$, $n_1=13$, $n_2=14$, $p = 0,3893$, *two-tailed*) (Figura 39 B).

Resultados

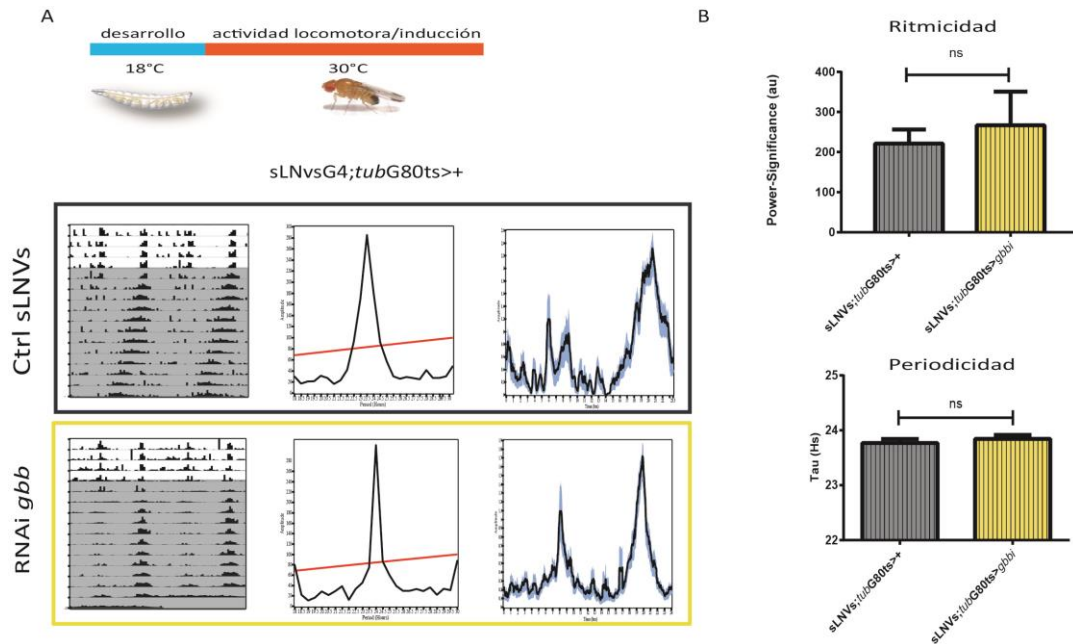


Figura 39. La desregulación adulto-específica de GBB en las sLNvs no afectó la consolidación de la actividad locomotora. **A.** Actogramas (izquierda), periodograma (medio) y promedio de actividad (derecha) representativos del control para la línea *driver* (recuadro negro) y para la línea con el ARN_i para *gbb* (recuadro amarillo). **B.** Cuantificación y análisis de la ritmicidad (*power-significancia*) y de la periodicidad de la actividad locomotora (Tau, hs). Las barras rayadas en gris de la izquierda pertenecen a los controles de la línea *driver* (sLNvsG4;tubG80ts>+) y las de la derecha en amarillo a la línea con el ARN_i de *gbb* bajo el driver de sLNvs (*) Diferencias estadísticamente significativas. Las barras indican la media +/- SEM.

Tanto para la desregulación de DPP como de GBB nos preguntamos si la desregulación en las sLNvs podía tener efectos sobre la actividad anticipatoria, tal como habíamos observado con las ILNvs. Realizamos el análisis de la actividad promedio normalizada para el segundo día en LD y comparamos la actividad de los genotipos controles (sLNvsG4;tubG80ts>+) y los genotipos con el ARN_i para *dpp* y *gbb*.

La desregulación de DPP y de GBB afectó de la misma manera la anticipación de la mañana siendo estas diferencias estadísticamente significativas (sLNvsG4;tubG80ts >+ vs. sLNvsG4;tubG80ts >*dpp*; : *Two-way RM ANOVA*: Interacción: F (47, 2115) = 8,42, p<0,0001; Genotipo: F (1, 45) = 10,11, p=0,0027; ZT: F (47, 2115) = 78,69, p<0,0001, Post-hoc: *Sidak's multiple comparisons test*) (sLNvsG4;tubG80ts >+ vs. sLNvsG4;tubG80ts >*gbb*; : *Two-way RM ANOVA*: Interacción: F (47, 2209) = 9,541, p<0,0001; Genotipo: F (47, 2209) = 80,5; ZT: F (1, 45) = 10,11, p<0,0001, Post-hoc: *Sidak's multiple comparisons test*) (Figura 40 A y B).

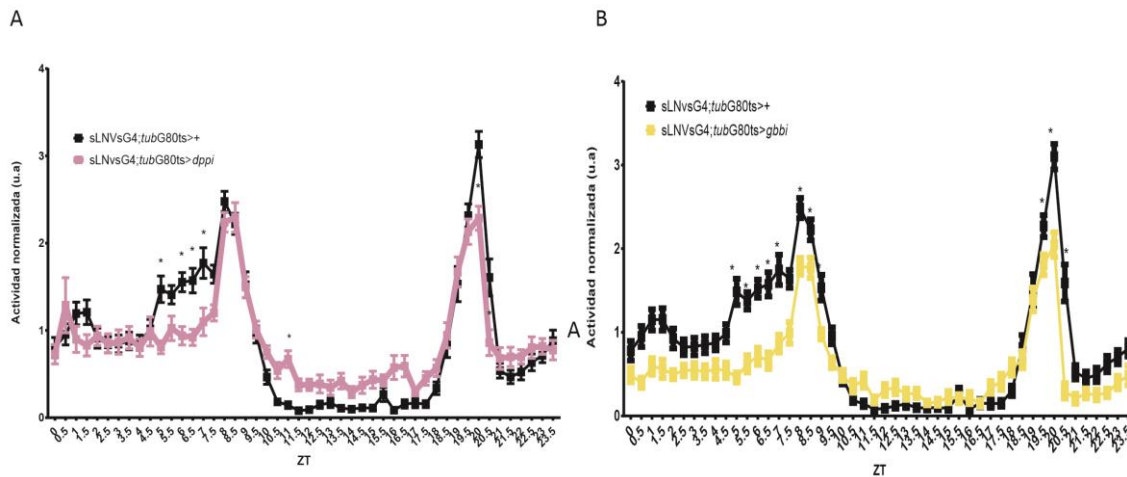


Figura 40. La **desregulación de DPP y GBB en las sLNvs afecta la actividad anticipatoria de la mañana**. **A.** Actividad promedio normalizada de todos los individuos del segundo día de LD del genotipo control del *driver* (sLNvsG4; tubG80ts >+, línea negra, n=26) y de la línea con el ARN_i para *dpp* (sLNvsG4; tubG80ts >dpp_i, línea rosa, n=26). **B.** Actividad promedio normalizada de todos los individuos del genotipo control del *driver* (sLNvsG4; tubG80ts >+, línea negra, n=25) y de la línea con el ARN_i para *gbb* (sLNvsG4; tubG80ts >gbb_i, línea amarilla, n=24). En el eje de las x se muestra el momento del día ZT (“zeitgeber time”). Se muestra la media para cada genotipo en cada momento del día +/- SEM. (*) Diferencias estadísticamente significativas.

En resumen los resultados obtenidos de las desregulaciones de DPP y GBB en las sLNvs, mostraron que sólo DPP es importante para la consolidación de la actividad locomotora mientras que GBB no sería relevante en este caso. Para nuestra sorpresa ambos ligandos parecen ser importantes en la regulación de la actividad anticipatoria de la mañana, la falta de alguno de ellos genera una disminución en la actividad previa al inicio del día.

5.3 La activación de la vía por DPP y GBB afecta el periodo de la actividad locomotora

En trabajos previos del laboratorio se había demostrado que la sobreexpresión de elementos de la vía de BMP modifica el periodo de la actividad locomotora. En particular, se comprobó que la sobreexpresión del factor de transcripción SHN generaba fenotipos con un período más largo que el control; esto se debía al enlentecimiento del reloj molecular a través de la regulación de un componente elemental del reloj, la proteína CLK (Beckwith et al., 2013); esto se debía al enlentecimiento del reloj molecular a través de la regulación transcripcional de un

componente elemental del reloj, la proteína CLK (Beckwith et al., 2013). Por otro lado, en el mismo trabajo, se demostró que la sobreexpresión de una versión constitutivamente activa de los receptores de Tipo I (TKV^A y SAX^A) también generaba un enlentecimiento del período de aproximadamente 2 horas. Estos experimentos fueron los primeros en demostrar, por un lado, que genes del reloj pueden ser blanco de la vía, y por otro, que la vía debe debería estar muy regulada en neuronas reloj ya que su activación tiene consecuencias directas sobre el periodo de la actividad locomotora.

Ya en la sección anterior mostramos que las LNvs expresan tanto DPP como GBB, y que la falta de ambos ligandos (en forma conjunta, o separadamente) genera desconsolidación del patrón de actividad locomotora.

Si bien la expresión de ARNi(s) permite definir la relevancia de estos ligandos en este grupo de neuronas reloj, la necesidad de depender de la maquinaria de silenciamiento impide analizar acotadamente (en el tiempo) su desregulación. Esta limitación se podría subsanar a través otras herramientas que permiten aumentar la expresión de estos ligandos. Utilizando el sistema UAS/GAL4 para sobreexpresar DPP y GBB específicamente en las LNvs (*pdfG4*), en contexto de la variante termosensible del represor (Gal80) para evitar desregular la vía durante el desarrollo, se analizó el patrón de actividad locomotora.

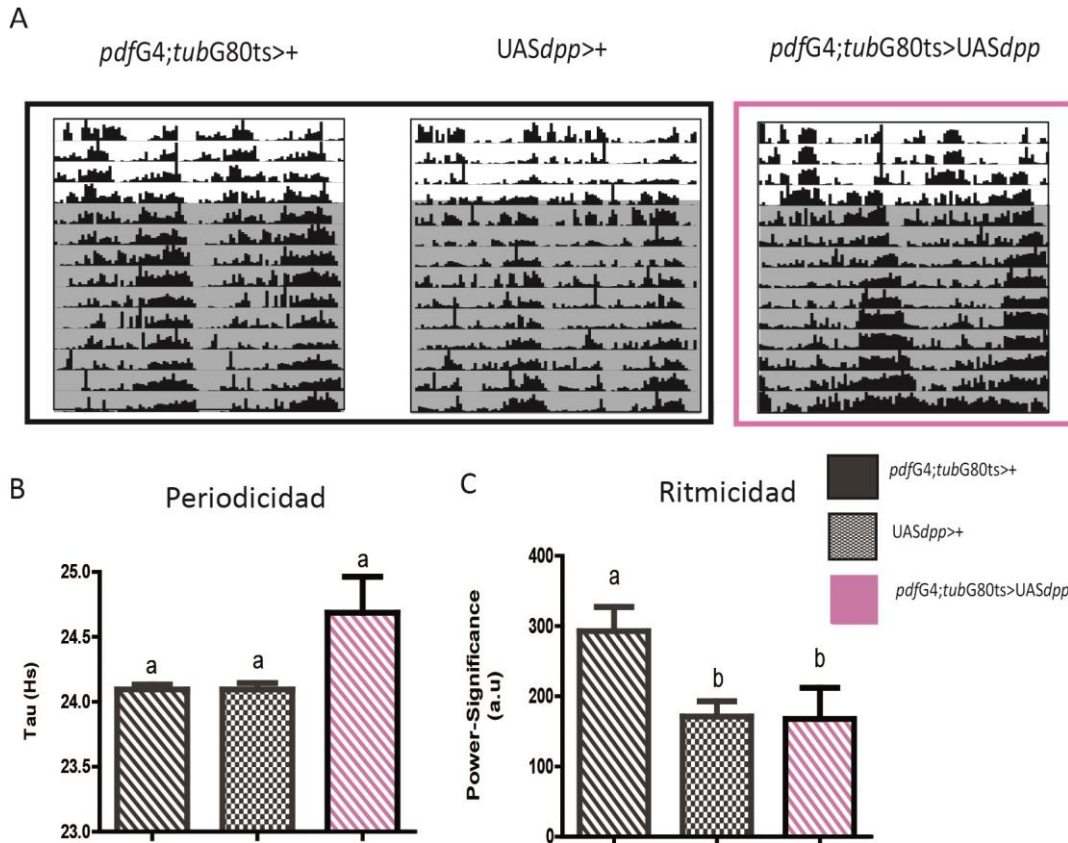


Figura 41. **La liberación crónica de DPP por las LNvs no afecta la actividad locomotora circadiana.** **A.** Actogramas representativos de los controles (izquierda y medio) y de la línea que permite la sobreexpresión de DPP en las LNvs (recuadro rosa). Mediante el sombreado se muestran los días en condiciones constantes de oscuridad (DD) precedidos por 4 días bajo ciclos de luz-oscuridad (LD). Los experimentos fueron realizados a 30°C para desactivar la herramienta termosensible y permitir la sobreexpresión de DPP. **B.** Cuantificación del período (Tau) para los controles (barras de la izquierda y del medio, color gris) y para la sobreexpresión de DPP (barra, color rosa). **C.** Cuantificación de la ritmicidad o medida de la consolidación de la actividad locomotora (*power-significancia*), para los controles (barras de la izquierda y del medio, color gris) y para la sobreexpresión de DPP (barra, color rosa). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan la media +/- SEM.

El análisis del efecto de la sobreexpresión de DPP en LNvs no arrojó diferencias significativas respecto a los controles. Sin embargo, se observaron dos efectos principales sobre la actividad locomotora: la desconsolidación de la actividad en la mayoría de los individuos, mientras que en unos pocos que fueron rítmicos presentaron un periodo largo que no resultó estadísticamente significativo (Figura 41), en parte debido al número reducido de individuos rítmicos ($n=13$) para los cuales pudo calcularse el período; nuevos experimentos serán necesarios para corroborar si dicha

Resultados

tendencia se mantiene (Periodicidad: *Kruskal-Wallis statistic* $X^2_{(2)} = 3,494$, $p = 0,1743$)(Ritmicidad: *Kruskal-Wallis statistic* $X^2_{(2)} = 11,07$, $p = 0,0039$).

Por otro lado, la sobreexpresión de GBB afectó ambos parámetros significativamente; por un lado la línea que expresó GBB en las LNvs presentó un periodo más largo que sus controles (Periodicidad: *Kruskal-Wallis statistic* $X^2_{(2)} = 34,51$, $p < 0,0001$; *Dunn's Multiple Comparison Test*: *pdfG4;tubG80ts/+* vs *pdfG4;tubG80ts>UASgbb*, $p < 0,05$; *UASgbb/+* vs *pdfG4;tubG80ts>UASgbb*, $p < 0,05$) (Figura 42 B).

La sobreexpresión de GBB aumentó la consolidación de la actividad, particularmente al final del día (Ritmicidad: *Kruskal-Wallis statistic* $X^2_{(2)} = 21,82$, $p < 0,0001$; *Dunn's Multiple Comparison Test*: *pdfG4;tubG80ts/+* vs *pdfG4;tubG80ts>UASgbb*, $p < 0,05$; *UASgbb/+* vs *pdfG4;tubG80ts>UASgbb*, $p < 0,05$). Si bien se sabe que el aumento de la temperatura genera una mayor consolidación al final de día como una respuesta de huida a las altas temperaturas, la consolidación fue aún más notoria en los individuos que sobreexpresaron GBB (Figura 42 A).

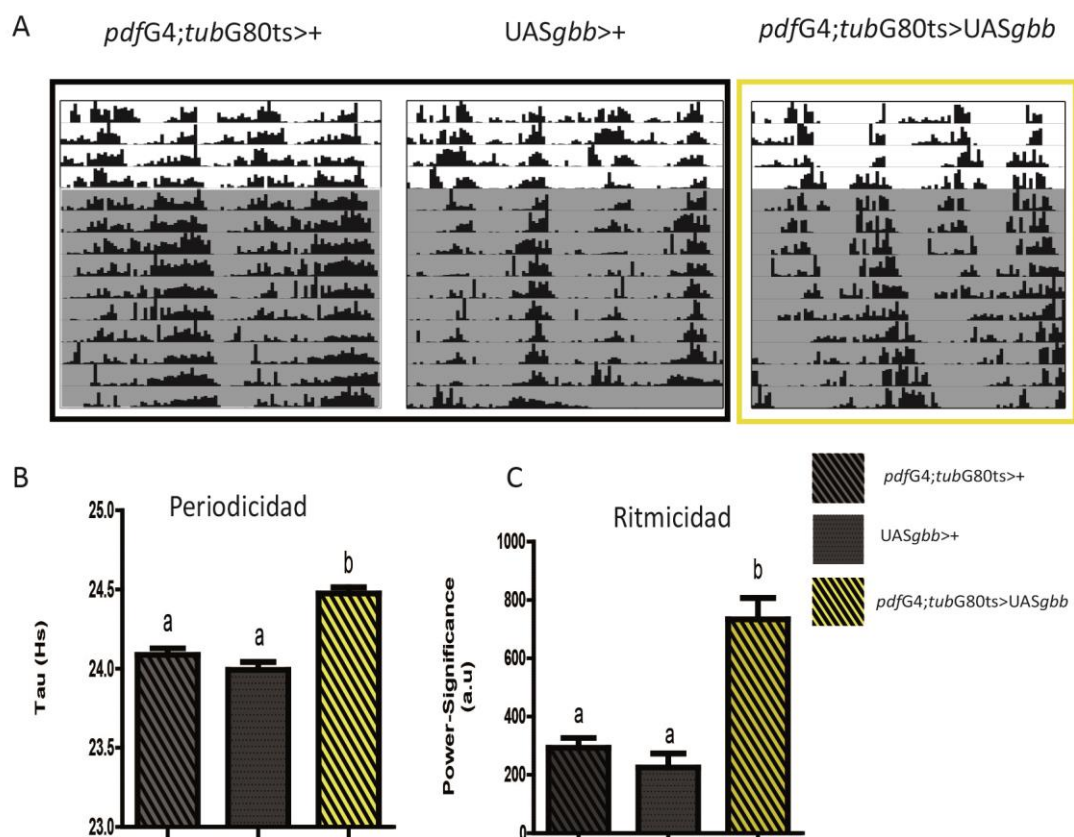


Figura 42. La liberación crónica de GBB por las LNvs alarga el período de la actividad locomotora circadiana. A. Actogramas representativos de los controles (izquierda y medio) y

de la línea que sobreexpresó GBB en las ILNvs (recuadro amarillo). Los experimentos son similares a la figura anterior. **C.** Cuantificación de la ritmicidad (*power-significancia*), para los controles (barras de la izquierda y del medio, color gris) y para la sobreexpresión de GBB (barra color amarillo). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan la media +/- SEM.

Dado que GBB se expresa en la mayoría de las ILNvs (Figura 23) y la disminución de sus niveles específicamente en las ILNvs fue suficiente para generar la desconsolidación del patrón de actividad locomotora (a diferencia de lo que ocurrió al disminuirlos en las sLNvs), es probable que los efectos comportamentales estén mediados por la liberación de GBB desde las ILNvs. Por otro lado, hasta el momento no hay reportes de cambios en el periodo de actividad locomotora mediados directamente por las ILNvs, por lo que proponemos que GBB podría actuar sobre las sLNvs para mediar estos efectos.

Estos resultados contrastan con los observados para la sobreexpresión de DPP (probablemente debido a un número insuficiente de observaciones, como fue explicado oportunamente). Teniendo en cuenta que tanto las ILNvs como las sLNvs expresan dicho ligando a continuación se evaluó cuál era el aporte de cada uno de los grupos sobre la actividad locomotora.

Para analizar la contribución de la liberación de DPP por cada grupo neuronal y a la vez acotar dicha desregulación al adulto, se emplearon las líneas combinadas con la versión termosensible del represor Gal80.

Sorprendentemente, tanto la liberación de DPP por parte de las sLNvs como por las ILNvs afectó exclusivamente el periodo sin afectar la consolidación de la actividad. Sin embargo, mientras que la sobreexpresión de DPP por parte de las sLNvs generó fenotipos de periodo corto (Periodicidad: *Mann-Whitney U* = 14, $n_1 = 15$, $n_2 = 17$, $P < 0.0001$, *two-tailed*) (Ritmicidad: *Mann-Whitney U* = 90, $n_1 = 15$, $n_2 = 17$, $P = 0,1645$, *two-tailed*) (Figura 43), la sobreexpresión desde las ILNvs generó fenotipos de período largo (Periodicidad: *Mann-Whitney U* = 33,5, $n_1 = 15$, $n_2 = 10$, $p = 0,0194$, *two-tailed*) (Ritmicidad: *Mann-Whitney U* = 71, $n_1 = 15$, $n_2 = 10$, $p = 0,8490$, *two-tailed*) (Figura 44)

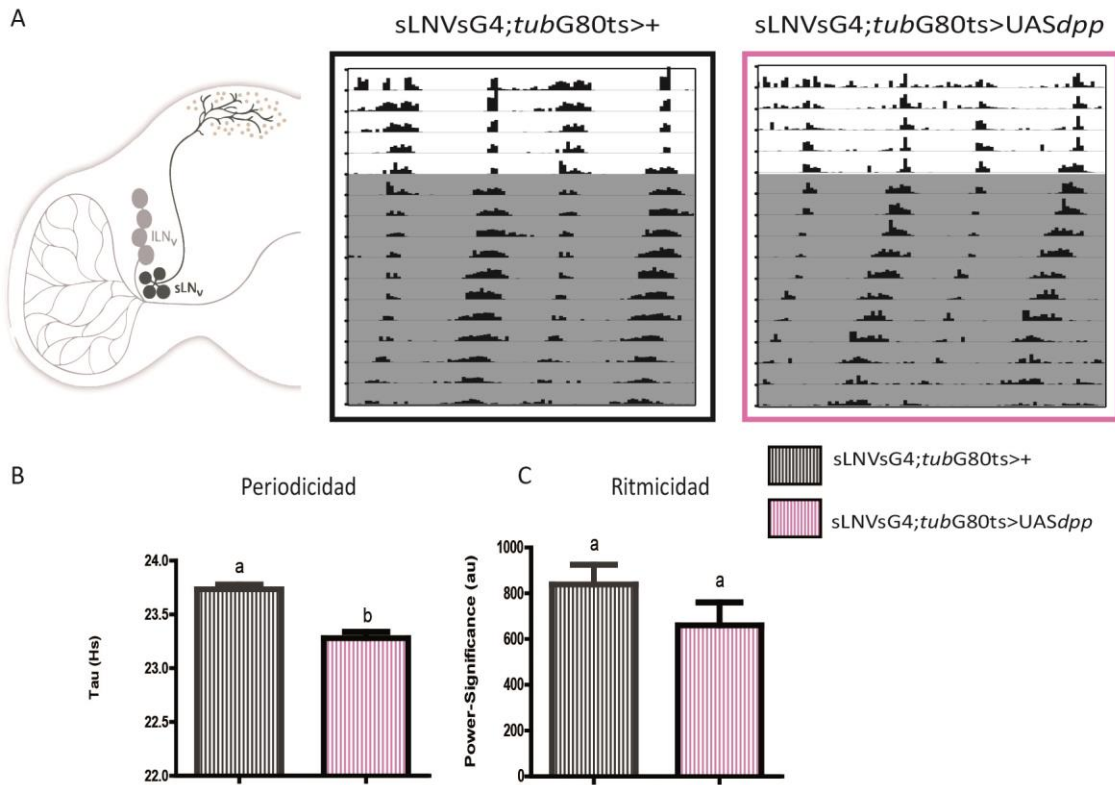


Figura 43. La liberación de DPP por parte de las sLNvs acorta el período de la actividad locomotora circadiana. **A.** Actogramas representativos de los controles (izquierda) y de individuos que sobreexpresan DPP en las sLNvs (recuadro rosa). **B.** Cuantificación del período (Tau, hs) de la actividad locomotora entre el control (barra gris) y la sobreexpresión de DPP (barra, rosa). **C.** Cuantificación de la consolidación de la actividad (*power-significancia*) entre el control (barra gris) y la sobreexpresión de DPP (barra, rosa). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan la media +/- SEM.

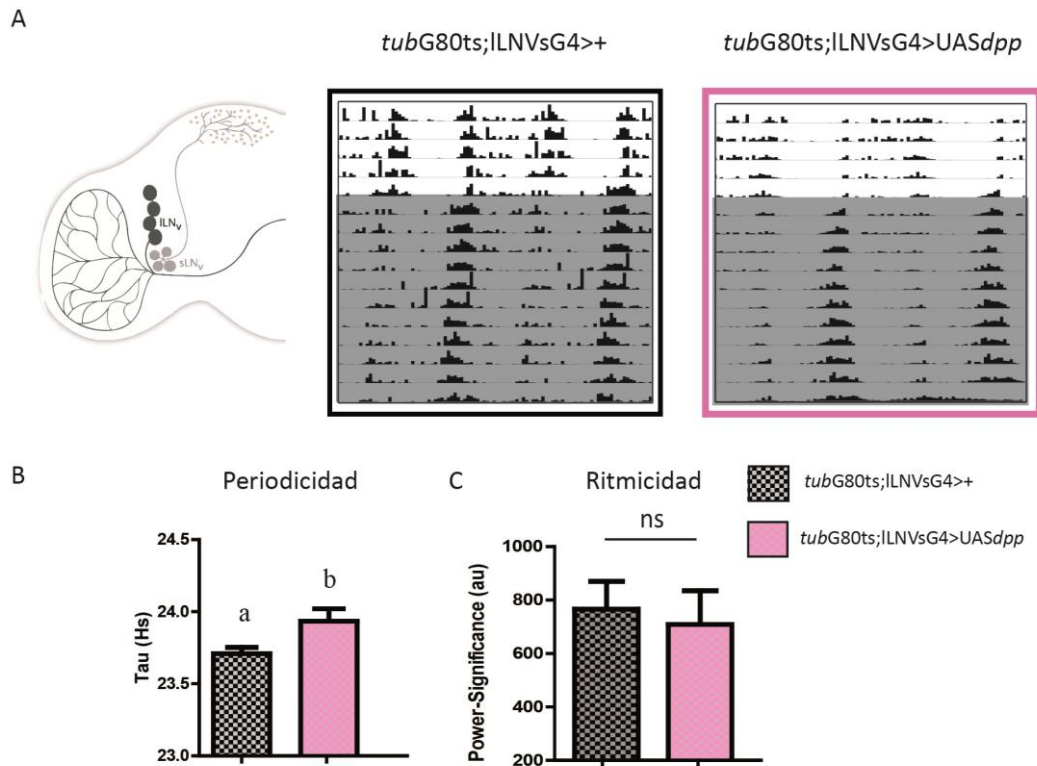


Figura 44. **La liberación de DPP por parte de las ILNvs alarga sutilmente el período de la actividad locomotora circadiana.** **A.** Actogramas representativos de los controles (izquierda) e individuos que sobreexpresan DPP en las ILNvs (derecha, rosa). **B.** Cuantificación del período (Tau Hs) de la actividad locomotora entre el control (barra gris) y con la sobreexpresión de DPP (barra, rosa). **C.** Cuantificación de la consolidación de la actividad (*power-significancia*) en los mismos genotipos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan la media +/- SEM.

Estos resultados, sumados a los de la sección anterior, refuerzan la idea de que las ILNvs, a través de la liberación tanto de DPP como de GBB, pueden afectar la actividad locomotora circadiana y podrían estar utilizando a la vía de BMP para comunicar información relevante al marcapasos central.

6 Capitulo III: La vía de BMP modula propiedades intrínsecas de las neuronas reloj

6.1 La sobreexpresión de SHN afecta el número de contactos sinápticos y los niveles de PDF

La activación de la vía de BMP en la placa neuromuscular (Ball et al., 2015; Fuentes-Medel et al., 2009) durante el desarrollo temprano de la larva de *Drosophila*, genera un aumento en el número de contactos sinápticos de las motoneuronas hacia el músculo; esto se traduce en un aumento en la inervación de los distintos segmentos musculares a medida que la larva aumenta de tamaño. Los mecanismos que dan lugar a la activación (liberación de ligandos de la vía de BMP) y que permiten el encendido de programas específicos para generar cambios en el citoesqueleto y finalmente en los axones de la motoneurona, están presentes también en el adulto de *Drosophila* y en particular en neuronas circadianas (Beckwith et al., 2013).

Dado que estos mecanismos podrían estar siendo cooptados para desarrollar funciones similares en otro tipo de neuronas, nos preguntamos si la activación de la vía, específicamente LNvs, podría tener efectos sobre la morfología de las proyecciones de las neuronas marcapasos, sLNvs.

En una primera aproximación activamos la vía por sobreexpresión de uno de los factores de transcripción, SHN (Beckwith et al., 2013). La sobreexpresión fue restringida al adulto haciendo uso de la herramienta termosensible y la línea *driver pdfG4* para expresar sólo en la LNvs. Para analizar el número de contactos sinápticos se empleó una fusión entre la proteína presináptica BRP (*bruchpilot*) y GFP (UAS-BRP::GFP). Se cuantificó el número de partículas GFP+ entre un control y con la activación de la vía; la línea utilizada fue BRPGFP;*pdfG4,756;tubG80ts>UASshn;CD8RFP*.

Las disecciones para estos experimentos se realizaron durante el día a ZT02, momento en el cuál las proyecciones se encuentran en su máximo de fasciculación y los niveles de PDF son más altos.

La activación crónica de la vía durante 7 días generó un aumento en el número de contactos sinápticos que fue significativamente diferente al control (*Mann-Whitney test* $U=1,5$, $n1 =5$, $n2 = 6$, $p= 0,0108$, *two-tailed*) (Figura 45). Esto fue similar a lo reportado por Beckwith et al. (2013), donde se observó que con dos días de activación había una tendencia a un aumento en el número de contactos sinápticos. Por otro

lado, no se observaron diferencias significativas ni en la morfología de las proyecciones de las sLNvs, medidas como el número de intersecciones, ni en los niveles de PDF (Figura 45 B-D). Sin embargo se observó una tendencia, para el caso de la morfología los circuitos parecieron más complejos y en cuanto a los niveles de PDF se observó una disminución. (#intersecciones: *Mann-Whitney test* $U= 8,5$, $n_1 =5$, $n_2 = 6$, $p= 0,2511$, *two-tailed*)(Niveles de PDF: *Mann-Whitney test* $U= 2$, $n_1 =5$, $n_2 = 6$, $p=0,0635$, *two-tailed*) aun en condiciones de alta sobreexpresión de SHN (dos copias del transgen). Más experimentos son necesarios para verificar si dicha tendencia es significativa.

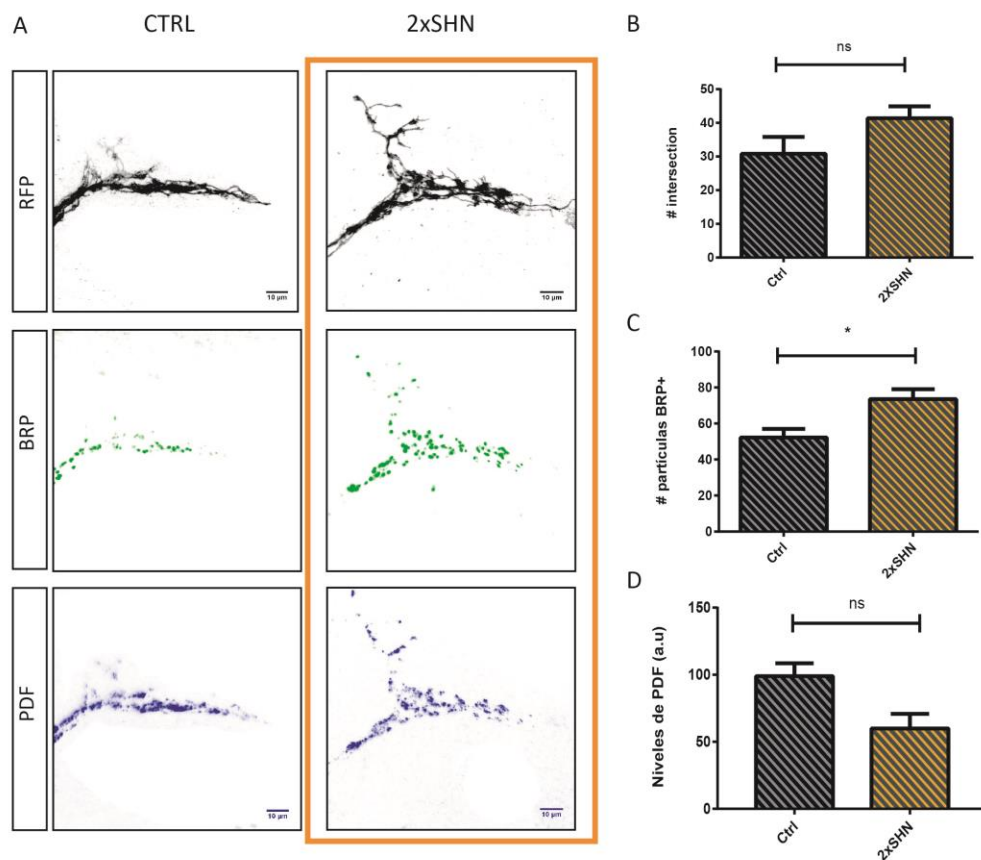


Figura 45. **La activación crónica de la vía genera un aumento de los contactos sinápticos de las proyecciones de las sLNvs.** **A.** Imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs. En el panel de la izquierda se muestra la línea control (BRPGFP;*pdfg4;tubg80ts>+;CD8RFP*) y a la derecha, la sobreexpresión de SHN (BRPGFP;*pdfG4,756;tubG80ts>UASshn;CD8RFP*, recuadro naranja). En gris se muestra el marcador de membrana RFP que permite recrear la estructura completa de las terminales. En verde se muestra BRP (centro), y abajo en azul el marcador para el neuropéptido PDF. **B.** Gráfico de barras mostrando la cuantificación para el número de intersecciones Sholl entre el CTRL y 2XSHN. **C.** Cuantificación del número de partículas BRP+ entre el control y con la

sobreexpresión de SHN. **D.** Cuantificación de los niveles de PDF. Las barras grises corresponden al CTRL y las naranjas a la línea que sobreexpresa SHN, 2xSHN. (*) Diferencias estadísticamente significativas. *Mann-Whitney test*.

Por otro lado, para evaluar el efecto de activar la vía por sobreexpresión de SHN durante un tiempo similar a la duración de los experimentos de actividad locomotora (14-20 días), se sobreexpresaron una o dos copias, que incluye la sobreexpresión de SHN y la del mutante 756 (una una inserción en el locus endógeno) (Beckwith et al., 2013), específicamente en las LNvs en estadios adultos. Analizamos el número de contactos sinápticos utilizando el reportero BRP-::GFP tal como se describió.

En el experimento reportado en la sección anterior no se observaron diferencias notables en inducciones más cortas en cuanto a los niveles de PDF (que podrían asociarse a los cambios observados en el patrón de comportamiento ;Wulbeck et al. (2008)); sin embargo, en inducciones más largas la activación de la vía podría generar algún efecto; para evaluar esta posibilidad se midió la intensidad de PDF en los genotipos con niveles crecientes de SHN. Sorprendentemente y a diferencia de lo observado durante las inducciones más cortas, el número de contactos sinápticos se redujo significativamente con la sobreexpresión de una o dos copias (Prueba de *Kruskal-Wallis* ($X^2_{(2)}=10.34$, $p<0.05$), *Dunn's multiple comparisons test*, CTRL vs. 1 x SHN $p= 0.0086$ y CTRL vs. 2 x SHN $p= 0.0179$). Asimismo, la sobreexpresión sostenida de SHN resultó en una drástica reducción de los niveles de PDF al comienzo del día, que coincide con los mayores niveles de PDF en las terminales (ZT02) (Prueba de *Kruskal-Wallis* ($X^2_{(2)}= 0.0024$, $p<0.05$), *Dunn's multiple comparisons test* CTRL vs. 1 x SHN $p= 0.0116$ y CTRL vs. 2 x SHN $p= 0.0218$) (Figura 46).

Resultados

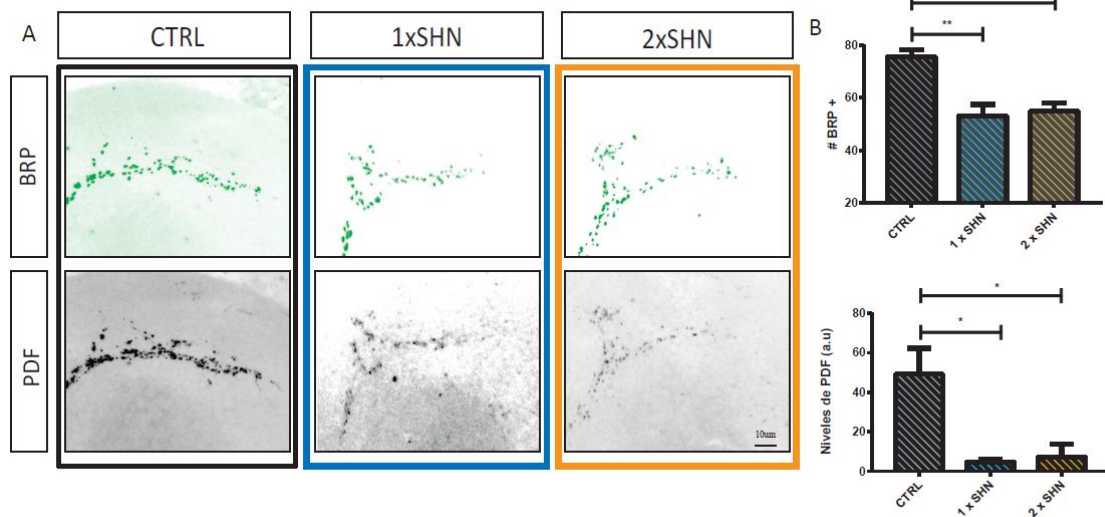


Figura 46. **La sobreexpresión de SHN sostenida en el tiempo disminuye el número de contactos sinápticos y los niveles de PDF.** **A.** Imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs de un control (CTRL, recuadro negro) BRPGFP;*pdfG4;tubG80ts*>CD8RFP, con la sobreexpresión de una copia de SHN (1 x SHN, recuadro celeste) BRPGFP;*pdfG4;tubG80ts*>CD8RFP;UAS*shn* y con dos copias (2 x SHN, recuadro naranja) BrpGFP;*pdfG4,756;tubG80ts*>CD8RFP;UAS*shn*. Las imágenes superiores muestran en verde la señal para BRP (*bruchpilot*) y las inferiores la señal de PDF en escala de grises. **B.** Diagramas de barra de la cuantificación del número de partículas BRP+ (gráfico superior) y de los niveles de PDF (gráfico inferior) entre el CTRL (barras grises), y la sobreexpresión de una copia (barras celestes) y dos copias (barras naranjas) de SHN. (*) Diferencias estadísticamente significativas. Las barras muestran la media +/- SEM.

6.2 DPP puede activar la vía de BMP en las sLNvs y modificar sus proyecciones

6.2.1 *La sobreexpresión crónica de DPP afecta la morfología de las proyecciones de las sLNvs*

La sobreexpresión de SHN permite la activación de la vía de BMP intracelularmente, modulando directamente la expresión de genes blanco; sin embargo, la vía puede actuar en ausencia de SHN utilizando otros factores de transcripción como *brinker* (BRK) (Hasson et al., 2001; Yao et al., 2008). Para explorar las consecuencias de la activación de la vía de una manera independiente de los factores de transcripción (río arriba de los receptores), se sobreexpresó el ligando DPP

Resultados

en las LNvs exclusivamente en el adulto. La sobreexpresión crónica (durante 7 días, condición equivalente a la Figura 45) de DPP en las LNvs activó la vía de BMP en las sLNvs, lo cual se evidenció por la acumulación de p-MAD en el núcleo de estas neuronas (Figura 47). Sorprendentemente, y a diferencia de lo esperado, teniendo en cuenta datos de la literatura en la placa neuromuscular (Ball et al., 2010), la sobreexpresión de DPP generó circuitos con poca complejidad (un menor grado de arborizaciones, aunque los procesos principales resultaron mas enlongados) a ZT02, sin afectar los niveles de PDF (#intersecciones: *Mann-Whitney test* $U=6$, $n_1=7$, $n_2=6$, $p=0,0303$, *two-tailed*)(Niveles de PDF: *Mann-Whitney test* $U=9$, $n_1=7$, $n_2=6$, $p=0,3290$, *two-tailed*). Resultados similares se habían observado con la sobreexpresión de SHN por 7 días (Figura 45).

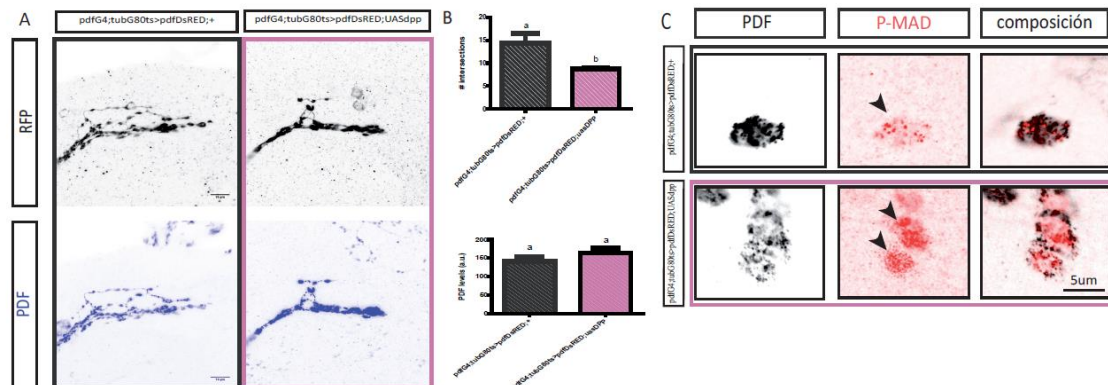


Figura 47. La sobreexpresión crónica de DPP activa la vía de BMP en las sLNvs y reduce la complejidad de sus proyecciones sin afectar los niveles de PDF. **A.** Imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs de individuos control (imágenes de la izquierda, recuadro negro) e individuos que sobreexpresan DPP (imágenes de la derecha, recuadro rosa). Las imágenes superiores muestran la señal citoplasmática de RFP para visualizar las proyecciones y las imágenes inferiores la señal de PDF. **B.** Gráficos de barra de la cuantificación del número de intersecciones (gráfico superior) y de los niveles de PDF (gráfico inferior) siguiendo el código de colores; letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. **C.** Imágenes confocales representativas de los somas de las sLNvs. Las imágenes superiores son de individuos control y las inferiores de la sobreexpresión de DPP. En rojo se muestra la señal de p-MAD que permite identificar la activación de la vía. En negro se muestra la señal de PDF.

6.2.2 La sobreexpresión aguda de DPP es suficiente para afectar la morfología de las proyecciones de las sLNvs

Durante el desarrollo los mecanismos que se activan para coordinar el crecimiento han de activarse en tiempos cortos para permitir un correcto ensamblado de las estructuras y de su homeostasis, ya que activaciones prolongadas pueden disparar efectos compensatorios; nos preguntamos, entonces, si los efectos observados sobre la complejidad podrían deberse a la activación sostenida por varios días. Para examinar esta posibilidad se limitó la activación a 24 horas, y se evaluó a ZT02 para comparar el efecto con las inducciones anteriores de mayor duración (7 días). Llamativamente, la sobreexpresión acotada de DPP generó una reducción en la complejidad de las proyecciones de las sLNvs y se observó una leve elongación (#intersecciones: *Mann-Whitney test* $U= 55,5$, $n1 =18$, $n2 = 14$, $p= 0,0063$, *two-tailed*) (Figura 48), tal como se había observado bajo una inducción más prolongada (Figura 47). Asimismo no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de PDF (Niveles de PDF: *Mann-Whitney test* $U= 112$, $n1 =18$, $n2 = 14$, $p= 0,1837$, *two-tailed*) (Figura 48).

A pesar de que la inducción fue acotada, este tiempo fue suficiente para detectar activación de la vía por traslocación de p-MAD en el núcleo de las sLNvs (Figura 48 C). La menor intensidad de la señal reflejaría el efecto de la concentración del ligando sobre la activación de la vía.

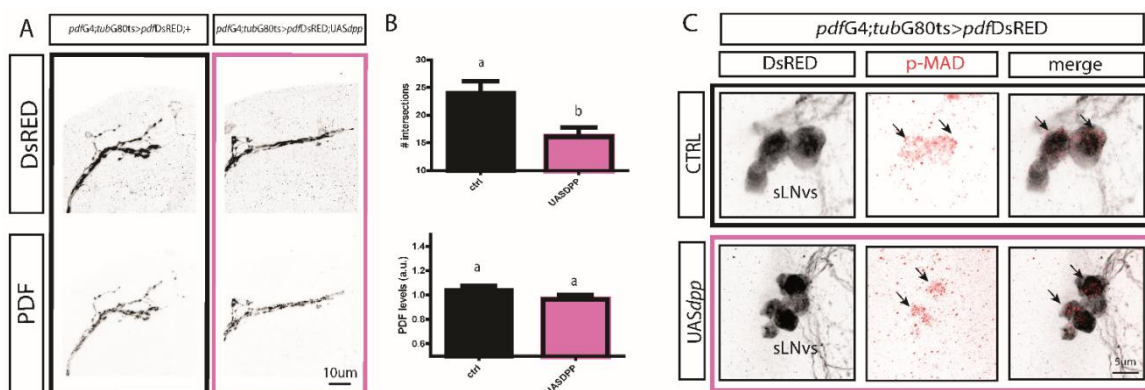


Figura 48. La sobreexpresión aguda de DPP por parte de las LNvs generó proyecciones de las sLNvs menos complejas. **A.** Imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs de individuos control (recuadro negro) y con sobreexpresión de DPP (panel derecho, recuadro rosa); a la izquierda se muestra el marcador de membrana DsRED y a la derecha el canal de PDF. **B.** Gráficos de barra mostrando la cuantificación de la complejidad de las proyecciones (gráfico superior) entre controles (barra negra) y tratados (barra rosa). El gráfico inferior muestra la cuantificación de los niveles de PDF (gráfico inferior) entre control

(barra negra) y tratado (barra rosa). **C.** Imágenes confocales representativas de los somas de las sLNvs de individuos control (CTRL, superior, recuadro gris) y con la sobreexpresión de DPP (UAS*dpp*, inferior, recuadro rosa). Los gráficos muestran los resultados de dos experimentos independientes. *Unpaired t test*.

6.3 La activación aguda de la vía de BMP afecta los niveles de una proteína del reloj molecular

Puesto que una activación aguda de la vía (a través de la expresión de DPP acotada a 24h) afecta la morfología de las terminales, proceso de DPP controlado por el reloj molecular en forma autónoma de célula (Herrero et al., 2017), se evaluó el estado si la proteína PER que forma parte constitutiva del reloj molecular, a través de la podía estar afectada en sus niveles o localización de la señal de PER. Resultados del trabajo de Beckwith et al. (2013) se demostraron que la activación sostenida en el tiempo afectaba los niveles de la proteína reloj PER y esto podía explicar los cambios observados de período.

Para analizar si los efectos sobre la morfología de las proyecciones a ZT02 podían deberse a cambios en los niveles o localización de la proteína PER en las LNvs, realizamos inducciones de 24 horas de DPP y realizamos inmunohistoquímica para observar la localización y los niveles de la proteína. La sobreexpresión de DPP tuvo efectos significativos sobre los niveles de PER sin afectar la localización, que se detectó en el núcleo al igual que en el control (Figura 49 A-B) (Niveles de PER: *Mann-Whitney test* $U= 40$, $n1 =9$, $n2 = 18$, $p= 0,0343$, *two-tailed*). De esta manera demostramos que los efectos observados sobre la morfología de las proyecciones de las sLNvs, podrían deberse, a afectar los niveles de PER. Para abordar el impacto de un pulso (24h) de DPP sobre el paso de las oscilaciones moleculares se planea realizar una curva temporal en condiciones de libre curso.

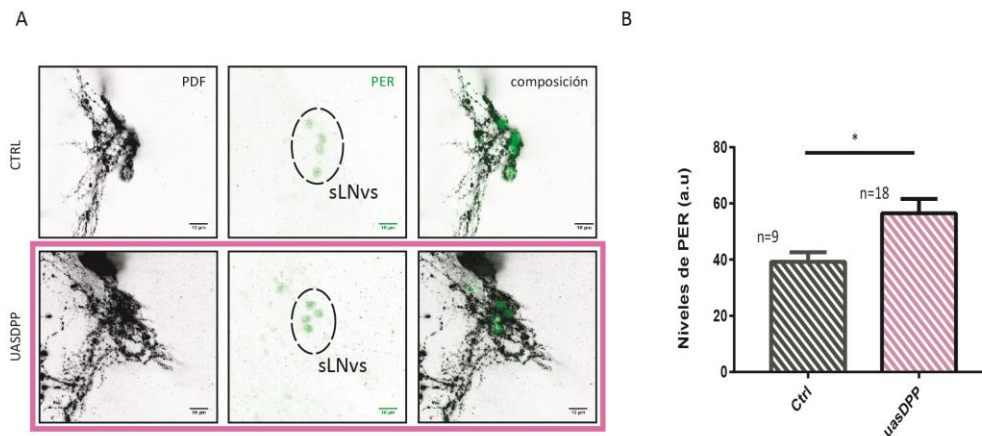


Figura 49. **Los niveles de PER en las sLNvs se modifican levemente por la activación aguda de la vía de BMP.** **A.** Se muestran imágenes confocales representativas de los somas de las sLNvs para controles (CTRL, imágenes superiores) y sobreexpresión de DPP (recuadro rosa). En escala de grises se muestra la señal de PDF y en verde la señal para la proteína PER; los círculos punteados demarcan la posición de las LNvs. La señal de PER es nuclear. **B.** El gráfico de barras muestra la cuantificación y análisis de los niveles de PER nuclear de los cerebros analizados para cada genotipo. (*) Diferencias estadísticamente significativas.

6.4 La sobreexpresión de DPP genera pérdida de la plasticidad circadiana sin cambios en la oscilación en los niveles de PDF

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la complejidad de las proyecciones de las sLNvs cambia a lo largo del día, siendo más complejas al inicio del día, a ZT02, coincidente con mayores niveles de PDF, y menos complejas al comienzo de la noche, a ZT14, coincidiendo con niveles bajos de PDF (Fernández et al., 2008). En el presente trabajo, en los resultados de la Figura 9, demostramos que con sólo 24 horas de activación, la vía de BMP es capaz de afectar la morfología de las proyecciones sin afectar los niveles de PDF.

Nos preguntamos entonces, si también era capaz de afectar la plasticidad estructural, modificando no sólo la complejidad si la plasticidad estructural circadiana. Para esto realizamos inducciones adulto-específicas en dos momentos del día (a ZT 02 y ZT 14), en ambos casos acotados a 24 horas. Observamos nuevamente que las inducciones acotadas por sobreexpresión de DPP genera circuitos cerrados a ZT02 y

también a ZT14, sin cambios a lo largo del día en la complejidad de las proyecciones; el número de intersecciones (medida de la complejidad) fue significativamente diferente entre el control y la línea con sobreexpresión de DPP en las LNvs (*Two-way ANOVA*: Interacción: $F(1, 65) = 4,702$, $p=0,0338$; Genotipo: $F(1, 65) = 7,802$, $p=0,0069$; ZT: $F(1, 65) = 7,099$, $p=0,0097$; *Sidak's multiple comparisons test*: ZT02:*pdfG4;tubG80ts;tubG80ts>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14:*pdfG4;tubG80ts;tubG80ts>pdfDsRED*;+, $p=0,0032$; ZT02:*pdfG4;tubG80ts;tubG80ts>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14:*pdfG4;tubg80ts>pdfDsRED*;+, $p=0,0083$; ZT 02:*pdfG4;tubG80ts;tubG80ts>pdfDsRED*;UAS*dpp* vs. ZT 14:*pdfG4;tubG80ts;tubG80ts>pdfDsRED*; UAS*dpp*UAS*dpp*, $p=0,9995$) (Figura 50).

En cuanto a los niveles de PDF, no se observaron diferencias a ZT02 entre el control y la sobreexpresión de DPP. Sin embargo, se observó una diferencia significativa en los niveles a ZT14, mayor que los del control, que de todos modos no impidió detectar los cambios a lo largo del día. La oscilación se mantuvo aunque de una menor amplitud (Niveles de PDF: *Two-way ANOVA*: Interacción: $F(1, 72) = 9,359$, $p=0,0031$; Genotipo: $F(1, 72) = 1,738$, $p=0,1916$; ZT: $F(1, 72) = 52,16$, $p<0,001$; *Sidak's multiple comparisons test*: ZT02:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*;+, $p<0,0001$; ZT 02:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*;+ vs. ZT 02:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*;UAS*dpp*, $p=0,6088$; ZT02:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*; UAS*dpp* vs. ZT 14:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p=0,0199$; ZT 14:*pdfG4;tubg80ts>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14:*pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p=0,0146$).

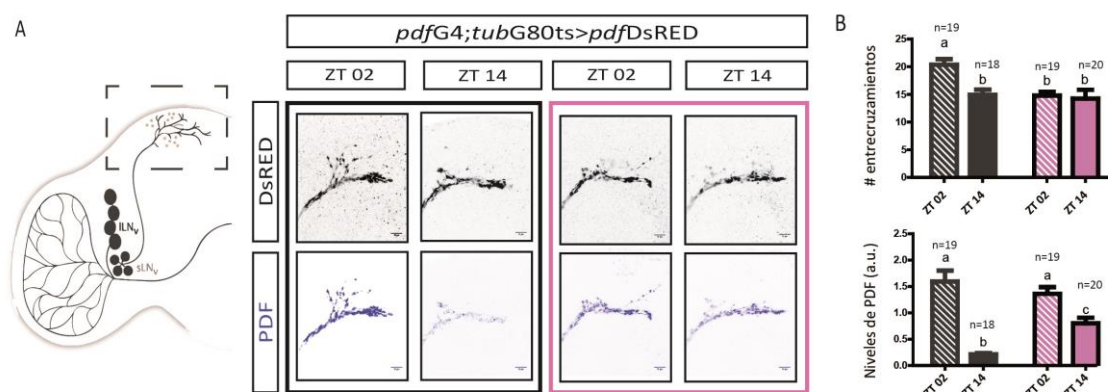


Figura 50. La activación de la vía de BMP afecta la plasticidad estructural sin afectar groseramente las oscilaciones en los niveles de PDF. A. Esquema de un hemiserebro de *Drosophila*, en negro se resaltan los grupos a los que dirige la expresión el driver

pdfG4. El recuadro con líneas punteadas muestra las proyecciones de las sLNvs, región donde se analizó la plasticidad y los niveles de PDF. **B.** Imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs en dos momentos del día (ZT02 y ZT14) en controles (panel izquierdo, recuadro gris) y por sobreexpresión de DPP (panel derecho, recuadro rosa); ambos; ambos grupos presentan el marcador citoplasmático *pdfDsRED* (imágenes superiores) y PDF (imágenes inferiores). **C.** Panel Superior: Cuantificación del número de entrecruzamientos (número de intersecciones, gráfico superior) entre los controles (barras grises) y tratados (barras rosas) en dos momentos del día ZT02 (barras rayadas) y ZT 14 (barras lisas). Panel inferior: Cuantificación de los niveles de PDF (gráfico inferior) entre los controles (barras grises) y tratados (barras rosas) en dos momentos del día ZT02 (barras rayadas) y ZT 14 (barras lisas). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. Las barras muestran la media +/- SEM

6.5 La liberación de DPP desde las sLNvs o las ILNvs tiene efectos diferentes sobre la complejidad de las proyecciones, la plasticidad estructural y los niveles de PDF

En el segundo capítulo demostramos que la expresión de DPP en las sLNvs o las ILNvs tiene efectos diferenciales sobre la actividad locomotora circadiana; parte de estas diferencias podrían deberse a que DPP es liberado en diferentes regiones (el protocerebro dorsal o la médula accesoria, respectivamente) dependiendo de si es liberado por uno u otro grupo, activando la vía en diferentes grupos de neuronas. Teniendo esto presente postulamos la hipótesis de que la liberación de DPP por cada grupo separadamente, podría tener efectos diferentes sobre la morfología de las proyecciones, la plasticidad estructural y niveles de PDF. Para comprobarlo, realizamos inducciones agudas de 24 horas a ZT02 y ZT14 específicamente en las sLNvs y en las ILNvs en adultos.

De manera similar a lo que habíamos observado en cuanto a la actividad locomotora, la liberación de DPP afectó diferencialmente la morfología de las proyecciones. La sobreexpresión desde las ILNvs (ILNvG4) recapituló lo observado con el *driver* común a ambos grupos de LNvs: proyecciones menos complejas tanto a ZT02 como a ZT14, perdiéndose la plasticidad estructural y sin efectos sobre los niveles ni la oscilación de PDF (# intersecciones: *Two-way ANOVA*: Interacción: $F(1, 38) = 15,91$, $p=0,0003$; Genotipo: $F(1, 38) = 4,851$, $p=0,0069$; ZT: $F(1, 65) = 7,099$,

$P=0,0338$; *Sidak's multiple comparisons test*: ZT02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+ vs. ZT02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p= 0,0005$; ZT 02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+, $p= 0,0172$; ZT 02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp* vs. ZT 14: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p= 0,5949$ (Figura 51).

(Niveles de PDF: *Two-way ANOVA*: Interacción: $F(1, 39) = 10,69$, $p=0,0023$; Genotipo: $F(1, 39) = 46,45$, $p<0,0001$; ZT: $F(1, 39) = 70,74$, $p<0,0001$; *Sidak's multiple comparisons test*: ZT02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+, $p= 0,0061$; ZT 02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+ vs. ZT 02: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p <0,0001$; ZT 02 *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp* vs. ZT 14: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p <0,0001$; ZT 14: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*;+ vs. ZT 14: *tubG80ts;ILNvsG4>pdfDsRED*; UAS*dpp*, $p= 0,1179$) (Figura 51). Resultados similares se observaron utilizando otra línea que permite desregular la expresión en las ILNvs (*c929G4*); los resultados se muestran en el ANEXO II (Figura 63).

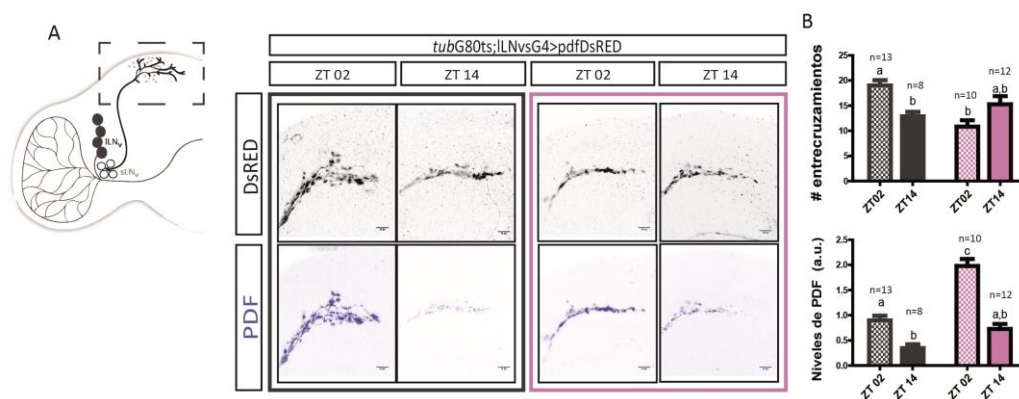


Figura 51. La liberación de DPP a cargo de las ILNvs afecta la plasticidad estructural. A. Esquema de un hemiserebro de adulto de *Drosophila*; en negro se resaltan los grupos a los que dirige la expresión a través de la línea ILNvsG4. El recuadro con líneas punteadas muestra las proyecciones de las sLNvs, región donde se analizó la plasticidad y los niveles de PDF. Se muestran a la derecha imágenes representativas de las proyecciones de las sLNvs a ZT02 y ZT14 de un control (recuadro negro) y con la sobreexpresión de DPP (recuadro rosa); ambos genotipos presentan el marcador citoplasmático *pdfDsRED* (imágenes superiores) y la señal de PDF (en las imágenes inferiores). **B.** Cuantificación del número de entrecruzamientos (número de intersecciones; gráfico superior) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de DPP (barras rosas) en dos momentos del día ZT02 (barras

Resultados

cuadriculadas) y ZT 14 (barras lisas) y cuantificación de los niveles de PDF (gráfico inferior) con el mismo código de colores que el gráfico superior. Las barras indican la media +/- SEM. Promedio de dos experimentos independientes.

Sorprendentemente, la liberación de DPP por parte de las sLNvs no tuvo efecto sobre la morfología de las proyecciones a ZT02 pero aumentó la complejidad de las mismas a ZT14, con respecto al control, lo que también generó pérdida de la plasticidad estructural. (# intersecciones: *Two-way ANOVA*: Interacción: $F(1, 72) = 4,52$, $p=0,0369$; Genotipo: $F(1, 72) = 10,58$, $p=0,0017$; ZT: $F(1, 72) = 3,117$, $p=0,0817$; *Sidak's multiple comparisons test*: ZT02:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+ vs. ZT02:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp, $p=0,9474$; ZT 02:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+ vs. ZT 14:pdfG4;tubG80ts>pdfDsRED;+, $p= 0,0441$; ZT 02: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp vs. ZT 14:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp, $p>0,9999$; ZT14:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+ vs. ZT14: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp, $p=0,0043$) (Figura 52).

La oscilación de PDF se mantuvo, si bien la amplitud de la oscilación fue menor a la del control; particularmente, los niveles de PDF durante a ZT02 fueron significativamente menores (Niveles de PDF: *Two-way ANOVA*: Interacción: $F(1, 60) = 32,59$, $p<0,0001$; Genotipo: $F(1, 60) = 39,19$, $p<0,0001$; ZT: $F(1, 60) = 306,6$, $p<0,0001$; *Sidak's multiple comparisons test*: ZT02: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+ vs. ZT 14: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+, $p<0,0001$; ZT 02:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+ vs. ZT 02: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp, $p <0,0001$; ZT 02: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp vs. ZT 14:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp, $p <0,0001$; ZT 14:sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED;+ vs. ZT 14: sLNvsG4;tubG80ts>pdfDsRED; UASdpp, $p<0,0001$) (Figura 52 B).

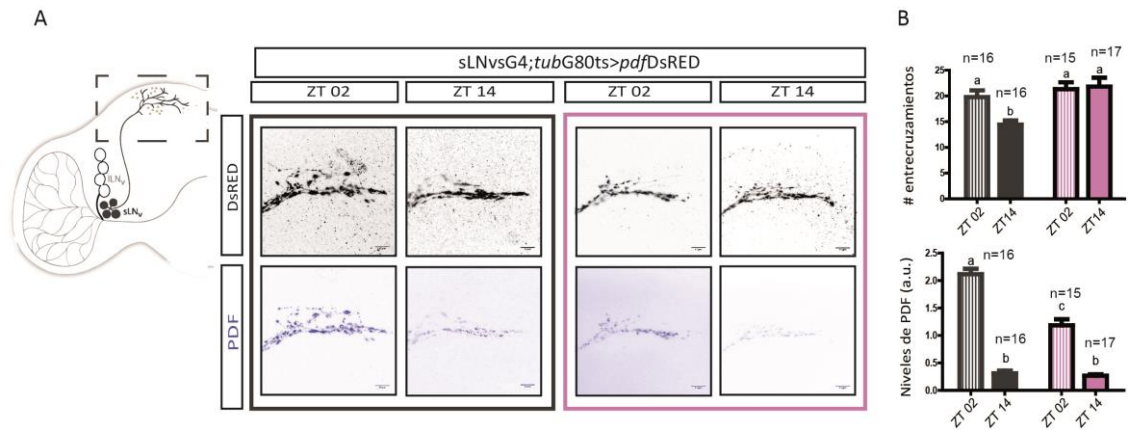


Figura 52. La liberación de DPP desde las sLNvs afecta la plasticidad estructural. A. Esquema de un hemicerebro de adulto de *Drosophila*, en negro se resaltan los grupos a los que dirige la expresión el driver sLNvsG4. El recuadro con líneas punteadas muestra las proyecciones de las sLNvs. Se muestran imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs en dos momentos del día ZT02 y ZT14 de un control (recuadro negro) y con la sobreexpresión de DPP (recuadro rosa), tanto el control como el grupo con sobreexpresión presentan el marcador citoplasmático *pdfDsRED* (imágenes superiores) en las imágenes inferiores se muestra el anticuerpo para PDF. **B.** Cuantificación del número de entrecruzamientos (número de intersecciones, gráfico superior) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de DPP (barras rosas) en dos momentos del día ZT02 (barras rayadas) y ZT 14 (barras lisas) y cuantificación de los niveles de PDF (gráfico inferior) el código de colores es igual que en el gráfico superior. Las barras indican el promedio de individuos de dos experimentos independientes +/-SEM.

7 Discusión y conclusiones

La regulación de la fisiología y del comportamiento es un proceso complejo que requiere de una coordinación y comunicación precisa entre los distintos grupos neuronales que participan de su control. La actividad locomotora circadiana, dentro de estos comportamientos, requiere que los distintos grupos de neuronas que forman parte de la red, coordinen sus relojes de manera tal de aportar al sistema coherencia y a la vez flexibilidad. Esta flexibilidad, dada por las diferencias existentes entre los osciladores moleculares de los diferentes grupos circadianos, es la que permite que la actividad locomotora pueda acomodarse a los cambios ambientales de temperatura, fotoperíodo, etc. En condiciones constantes (poco variables), donde la cantidad de horas de luz y oscuridad permanecen sin alterarse, la utilización de determinados mecanismos de comunicación, por ejemplo la expresión de algunos neuropéptidos o neurotransmisores, puede ser más frecuente que la de otros. Sin embargo, en determinadas condiciones donde el sistema requiere de ajustes más finos, o donde las condiciones ambientales fuercen la comunicación, distintas vías pueden verse implicadas, se sabe que bajo estas condiciones la jerarquía entre los distintos osciladores puede alterarse.

Varios trabajos se han dedicado a estudiar los mecanismos que subyacen a la comunicación entre neuronas circadianas (Albus et al., 2005; Beckwith et al., 2013; Fernández et al., 2007; Frenkel et al., 2017; Gorostiza et al., 2014; Lear et al., 2009) y al rol de los distintos grupos en el control de aspectos particulares de la actividad locomotora; la anticipación de la mañana, de la tarde, sueño, etc (Benito et al., 2008; Fujii and Amrein, 2010; Guo et al., 2016; Hamasaka et al., 2010; Zhang et al., 2010c). Hace algunos años nuestro laboratorio demostró que la vía de BMP, una vía implicada en el desarrollo temprano y en particular en la comunicación entre la motoneurona y el músculo de la larva de *Drosophila*, podía ser reclutada por neuronas circadianas para regular el reloj molecular en las LNvs, afectando el comportamiento (Beckwith et al., 2013).

El objetivo del presente trabajo fue el de indagar en esta comunicación para comprender qué grupos particulares de neuronas circadianas utilizan regularmente esta vía y cuáles eran los ligandos más relevantes. Por otro lado nos propusimos evaluar otras repuestas que pudieran estar siendo reguladas a través de esta comunicación.

Dado que la mayoría de los trabajos se han focalizado en la utilización de neuropéptidos y neurotransmisores, este trabajo es uno de los pocos que demuestra que la comunicación a través de otras proteínas, como péptidos pequeños, que actúan a través de

cascadas de señalización, también son importantes en la regulación de respuestas que requieran la activación de diferentes genes blanco.

Por otro lado los resultados aquí presentados ponen de manifiesto que los mecanismos que sirven para activar procesos durante el desarrollo pueden mantenerse en la vida adulta y ser reclutados para cumplir funciones distintas, manteniendo los elementos originales; sin embargo las respuestas reguladas no necesariamente han de ser las mismas, dado que pueden variar dependiendo del contexto biológico (tejido, momento del desarrollo).

7.1 Las neuronas circadianas expresan distintos ligandos de la vía de BMP y todos son relevantes para la consolidación de la actividad locomotora

Distintas herramientas genéticas nos permitieron identificar los patrones de expresión de los ligandos de la vía (Figura 17). A pesar de que varios de estos ligandos no se expresan en simultáneo ni en el mismo tejido a lo largo del desarrollo (Arora et al., 1996), detectamos la presencia de varios de ellos en grupos de neuronas circadianas en el cerebro adulto. Esta expresión sumada a los resultados previos (Beckwith et al., 2013), sugiere que la comunicación a través de estos ligandos podría cumplir un rol en el control de la actividad locomotora circadiana.

Un aspecto a destacar es que en la mayoría de los casos la desregulación generó una desconsolidación de la actividad locomotora, tanto cuando se desregularon de manera crónica, durante todo el desarrollo, como cuando se hizo de manera adulto-específica. Sólo se observó un efecto sobre el período de la actividad locomotora al aumentar la liberación de algunos ligandos por sobreexpresión.

Estos resultados, junto con los obtenidos por inmunohistoquímica para detectar la actividad de la vía, nos hacen pensar que la vía está altamente regulada, dado que afectar los niveles tiene un impacto directo sobre la actividad locomotora. La detección citoplasmática de p-Mad en el residuo fosforilado por SGG avala esta hipótesis; sólo cuando el sistema se ve sobrepasado por el aumento en la liberación de ciertos ligandos, o porque la fosforilación de MAD se hace independiente de ellos (por sobreexpresión de TKV^A y SAX^A), fue posible detectar el ingreso de p-MAD al núcleo, lo que sugiere una regulación activa. En la placa neuromuscular, MAD puede ser fosforilada en una región “*linker*” (Figura 9), y esta fosforilación es otra forma de regular la actividad de la vía.

Discusión y conclusiones

Por otro lado, a pesar de no lograr detectar la presencia de los receptores Tipo I y II por inmunohistoquímica, la presencia de p-MAD nuclear en otros grupos de neuronas circadianas en contexto de la sobreexpresión de los receptores constitutivamente activados (TKV^A y SAX^A) corrobora la presencia de los elementos necesarios para la activación de la vía en todas (o la mayoría de) las neuronas circadianas (Figura 17 B).

Llama particularmente la atención que las large LNvs presente una gran diversidad en cuanto a la expresión de ligandos, y que su desregulación tenga un impacto directo sobre la actividad locomotora en condiciones de libre curso. De hecho, se ha reportado que el reloj molecular de las ILNvs deja de oscilar cuando los animales se transfieren a condiciones de libre curso (Shafer et al., 2002), mientras que se les adjudica un rol preponderante dentro del control del sueño (Sheeba et al., 2008a). Sin embargo, los resultados descritos en a lo largo de este trabajo (Figura 33, Figura 35 y Figura 37) ponen de relevancia no sólo la importancia de la comunicación a través de esta vía, sino que las ILNvs pueden afectar directamente el comportamiento rítmico, probablemente a través de la modulación de la actividad de las sLNvs.

Asimismo, algunos de los ligandos se expresan en la glía (Ver ANEXO I, Figura 54, Figura 55), lo cual concuerda con otros trabajos realizados en la placa neuromuscular de la larva, donde tanto MAV, DAW como SCW son expresados y liberados por la glía para comunicarse y regular la homeostasis de la sinapsis motoneurona-músculo (Fuentes-Medel et al., 2012; Gesualdi and Haerry, 2007; Nguyen et al., 2000). Experimentos utilizando *drivers* específicos de glía (Ej: pangliales, o en grupos funcionales específicos –como los astrocitos o la glia de recubrimiento-) permitirían evaluar la importancia de la comunicación a través de esta vía; trabajos en nuestro laboratorio han demostrado que desregular el reloj de la glía afecta la plasticidad estructural circadiana (Herrero et al., 2017).

Entre los ligandos expresados por las neuronas circadianas Act β fue el único común a todas ellas; su desregulación generó la desconsolidación de la actividad sólo al ser desregulado por un *driver* pan-circadiano (*dCik856G4*) (Figura 30), lo cual sugiere que su función es requerida en la mayor parte de los grupos circadianos, probablemente mediando su comunicación. Dado que el *driver* *dCik856G4* tiene una expresión más fuerte que otros puede ser que desregule de una manera más eficiente y que por ello no observamos diferencias en la desregulación por separado en grupos más específicos de neuronas circadianas. Sin embargo en su trabajo Beckwith et al. (2013) demostró que la desregulación constitutiva con otro *driver* pan-circadiano (*timG4*), no tiene efectos sobre la consolidación de la actividad. Ya que pueden existir mecanismos compensatorios en desregulaciones crónicas, el efecto observado en nuestro trabajo resalta la importancia del ligando en una

situación en la que el sistema no puede compensar, por ejemplo con otros ligandos. Por otro lado Act β parece cumplir una función más específica en regular el aumento de la actividad en las anticipaciones de la tarde. Esto no se había observado en condiciones de luz-oscuridad 12:12, pero se vio que afectaba diferencialmente en experimentos donde la duración del día fue de 16:8h, simulando condiciones más similares a un fotoperiodo de verano. Entonces, a pesar de que el ligando no fue esencial para ajustar la fase luego de un retraso, podría ser que cumpla una función en permitir al reloj ajustarse a nuevos fotoperiodos, retrasando el pico de la tarde; para poder asegurar esto último se requieren más experimentos que permitan demostrar que efectivamente hay un retraso además de una disminución en la actividad.

Más allá de Act β , las LNvs expresan DPP y GBB, ambos ligandos pertenecientes a la misma rama de la vía, “*BMP like*”. Teniendo en cuenta tanto los experimentos de desregulación crónica como los adulto-específicos podemos decir que DPP parece ser el ligando más importante dentro del grupo de las ILNvs, ya su desregulación genera desconsolidación de la actividad y afecta, en menor medida, parte de la capacidad de anticipación de la tarde (Figura 37). GBB también contribuye a la consolidación de la actividad, tanto cuando se lo desreguló de manera crónica cómo adulto-específica. De hecho, ambos ligandos cumplen un papel relevante para la red circadiana de modo que aun en condiciones de ciclos de luz/oscuridad su desregulación altera el patrón esperado. Sorprendentemente, el efecto de cada desregulación es diferente; la falta de DPP en las ILNvs afectó preferencialmente la actividad anticipatoria de la mañana, mientras que la falta de GBB afectó la actividad anticipatoria de la tarde. Estos resultados sugieren que la ILNvs podrían estar utilizando diferentes ligandos en distintos momentos del día para ajustar aspectos de la actividad locomotora. Experimentos por qPCR e inmunohistoquímica nos permitirán evaluar si existen diferencias en las transcripción de *dpp* y *gbb* y de las sus proteínas, respectivamente, a lo largo del día.

En el caso de las sLNvs sólo DPP tuvo un efecto en la consolidación de la actividad cuando fue desregulado de manera crónica y adulto-específica, mientras que GBB no tuvo efecto en ninguno de los dos casos. Sin embargo, ambos ligandos parecen contribuir a la actividad anticipatoria de la mañana; tanto la desregulación de DPP cómo la de GBB disminuyeron notablemente la actividad previa al encendido de las luces, “*morning peak*”.

Estas evidencias, junto con los resultados de las desregulación conjunta en las LNvs (sLNvs y ILNvs) avalan la hipótesis que la comunicación a través de estos ligandos es direccional, predominante desde las ILNvs a las sLNvs, y que son las ILNvs las que comunican información a través de ellos hacia el reloj central. Por otra parte, las sLNvs

podrían utilizar a DPP para sincronizarse entre ellas, y la falta de un fenotipo claro podría explicarse por haber afectado la expresión en todas a la vez; experimentos para demostrar que la falta de DPP en las sLNvs genera cambios en el reloj molecular entre éstas son necesarios para probar lo anterior.

Otros resultados que confirman que la vía es importante para la comunicación entre las LNvs son los de sobreexpresión tanto de DPP como de GBB, donde demostramos que puede afectar el período de la actividad locomotora al igual que lo que ocurría con la sobreexpresión de SHN (Beckwith et al., 2013). Las diferencias sobre el período observadas cuando la sobreexpresión de DPP se realizó de manera específica para cada grupo por separado (ILNvs y sLNvs) plantean distintas posibilidades

Por un lado, asumiendo que la liberación de DPP por parte de cada grupo tiene lugar en distintas regiones del cerebro (la médula accesoria, en el caso de las ILNvs o el protocerebro dorsal, en el caso de las sLNvs), las diferencias de respuesta podrían ser el resultado de la formación de distintos gradientes recibidos por las mismas neuronas reloj, y esas diferencias en concentración de DPP ser las responsables de disparar respuestas diferentes (tal como ocurre durante el desarrollo). Experimentos de inmunohistoquímica en líneas con sobreexpresión de DPP tanto en las sLNvs y en ILNvs mostraron que la liberación de DPP en particular en las sLNvs genera acumulación de p-MAD en las proyecciones dorsales y en menor medida en el núcleo, mientras que en para las ILNvs la presencia de p-MAD parece ser predominantemente nuclear tanto en las sLNvs como en las sLNvs (Ver ANEXO III).

Otra alternativa es que, dependiendo de si el ligando es liberado por las sLNvs o por las ILNvs, los grupos donde la vía se está activando sean diferentes, y el impacto de cada uno de ellos sobre el patrón comportamental de por resultado las respuestas diferenciales. Asimismo, los genes blanco de la vía dentro de cada grupo podrían ser diferentes, tal como sucede entre diferentes tejidos (Kim and Marques, 2010), y que esto explicara los distintos efectos sobre el período. Experimentos para evaluar los grupos donde se está activando la vía, como por ejemplo por inmunohistoquímica y detección de p-MAD, nos permitirán responder a la primera alternativa. En el segundo caso se podría evaluar mediante qPCR las diferencias entre genes blancos cuando la vía se activa en diferentes grupos.

Estos resultados en conjunto revelan parte de la complejidad de la comunicación a través de la vía de BMP: las ILNvs emplean a DPP y en menor medida a GBB como señal retrógrada hacia las sLNvs contribuyendo al ajuste fino del control de la actividad locomotora. Las ILNvs se han propuesto como centros integradores de información dado que son capaces de recibir señales ambientales, como señales lúminicas desde grupos

particulares de neuronas en el lóbulo óptico, por ejemplo se sabe que tiene conexiones con el *H-B eyelet* (Shang et al., 2008; Stoleru et al., 2004) y que estos reciben la información de la luz y a través de las ILNvs pueden comunicarle la información a las sLNvs y afectar finalmente la actividad de la mañana. Dado que aún no se conocen muchos de los mecanismos por los cuales las ILNvs podrían comunicar esta información a las sLNvs, los resultados de este trabajo podrían aportar a la comprensión de esta comunicación.

7.2 La activación crónica de la vía afecta los niveles de PDF

La coherencia en la organización temporal de la actividad locomotora es el resultado de la coordinación de muchos osciladores presentes en diferentes grupos de neuronas. La red circadiana de *Drosophila* está comprendida por aproximadamente 150 neuronas, entre las cuales sólo 6 expresan el neuropéptido PDF, las LNvs. Se sabe que el neuropéptido PDF cumple un rol esencial en este aspecto, dado que mutantes nulos para este péptido son arrítmicos en condiciones de oscuridad constante (Lin et al., 2004; Mezan et al., 2016; Renn et al., 1999; Shafer and Yao, 2014; Shang et al., 2008; Sheeba et al., 2008b; Tomioka et al., 2008; Yoshii et al., 2009; Zhang et al., 2010a). Varios trabajos han demostrado que la oscilación de los niveles de PDF en las terminales de las sLNvs es la que aporta en mayor medida a la coordinación de otros grupos de neuronas circadianas, permitiendo una coherencia en la actividad locomotora (Guo et al., 2014; Im et al., 2011; Im and Taghert, 2010; Li et al., 2014; Lin et al., 2004; Mezan et al., 2016; Sheeba et al., 2008b). Sin embargo otros trabajos postulan que aunque es necesaria dicha oscilación no es suficiente para conseguir un correcto *output* (Abruzzi et al., 2015; Kula et al., 2006; Prakash et al., 2017).

Puesto que tanto cambios en la desconsolidación como en el período de la actividad locomotora podrían estar asociados a cambios en los niveles o en la oscilación de PDF, nos preguntamos si la activación de la vía de BMP, cuyo fenotipo por sobreexpresión genera períodos largos y por defecto desconsolidación de los patrones comportamentales, podía afectar también otros *outputs* del reloj, por ejemplo, los niveles de PDF. Llamativamente, la inducción por algunos días (7) no provocó diferencias en los niveles de PDF (Figura 45); sin embargo, la inducción más prolongada (por 20 días) provocó una disminución bastante drástica de los niveles (Figura 46). Esto sugiere que en principio los fenotipos de actividad locomotora detectables desde el primer día de condiciones de oscuridad no pueden atribuirse a la comunicación defectiva a través de PDF. Con más tiempo de actividad de la vía además del efecto sobre el reloj molecular (Beckwith et al., 2013) es probable que empiece a sumarse el efecto de la falta de PDF.

Para corroborar este punto son necesarios otros experimentos que permitan evaluar el estado del reloj en los grupos de neuronas que reciben la señal de PDF (neuronas PDFR), y verificar si en el contexto de la sobreexpresión prolongada en el tiempo, los relojes de estos grupos se encuentran desfasados en relación al de las sLNvs.

7.3 La vía de BMP afecta los contactos sinápticos de las sLNvs

Varios trabajos han mostrado que los factores de crecimientos pertenecientes a la vía de BMP regulan el desarrollo de la placa neuromuscular de la larva (NMJ) de *Drosophila* (Aberle et al., 2002; Baines, 2004; Ball et al., 2015; Ballard et al., 2010; Boulanger et al., 2012; Ellis et al., 2010b; Goold and Davis, 2007; Kim and O'Connor, 2014; Marques et al., 2002; McCabe et al., 2003) y que la activación de la vía tanto en la motoneurona como en el músculo conlleva una cascada de eventos que finalmente se traduce en un aumento en la inervación y número de contactos sinápticos (Aberle et al., 2002; Ball et al., 2015).

Los resultados que obtenidos a lo largo de este trabajo nos convencieron de que la vía es activamente reclutada por las LNvs y que al menos dos de los ligandos (GBB y DPP), que pueden actuar de manera sinérgica y cuya desregulación afecta el comportamiento, se expresan en ellas. Teniendo en cuenta lo que se sabe del modelo de la placa neuromuscular y de cómo la comunicación entre los dos elementos que la conforman (motoneurona y músculo) se traduce en modificación de los axones y sinápsis (Fuentes-Medel et al., 2012); exploramos si la comunicación entre neuronas reloj (por el momento, las LNvs) podía tener un correlato estructural.

La activación de la vía por sobreexpresión del factor de transcripción SHN a través de inducciones adulto-específicas acotadas a las LNvs, afectó diferencialmente el número de contactos sinápticos dependiendo del tiempo/grado de inducción. A tiempos más cortos, pero igualmente crónicos, (7 días), similar a lo que ocurre en la placa neuromuscular, la sobreexpresión de SHN generó un aumento en el número de contactos sinápticos. Esto también había sido observado por Beckwith et al. (2013) pero el efecto no había sido significativo luego de dos días de inducción. Sin embargo, la inducción prolongada (por 20 días) resultó en una reducción en el número de contactos sinápticos de las proyecciones de las sLNvs.

Parte de este efecto podría explicarse argumentando que la activación prolongada de la vía puede encender mecanismos de retroalimentación negativa que controlen la actividad. En otros tejidos, por ejemplo en el disco imaginal del ala, el efecto de la vía de BMP es regulado por la inhibición a través de una I-SMAD (DAD) que comienza a transcribirse luego de un aumento en la actividad (Raftery and Umulis, 2012). Por otro lado

podrían aparecer mecanismos compensatorios que pasado un tiempo ejerzan un efecto contrario para compensar el exceso de activación, y ésto podría traducirse en una disminución en el número de contactos sinápticos. Por ejemplo, en el embrión en desarrollo, la activación prolongada de la vía por DPP aumenta la transcripción del gen *brk* (*brinker*) que actúa como represor sobre los genes blanco de DPP (Marty et al., 2000; Yao et al., 2008). En nuestro trabajo también reportamos la presencia de BRK en las LNvs (Ver ANEXO I Figura 58).

Estos resultados, en su conjunto, muestran que no sólo los elementos de la vía están presentes en las LNvs, si no que su funcionalidad se mantiene aún en estadios adultos, pudiendo utilizarse como un medio más de comunicación entre este grupo para modular la conectividad de las sLNvs.

7.4 La activación de la vía de BMP afecta la plasticidad estructural

Nuestro laboratorio describió hace unos años cambios a lo largo del día en la morfología de las proyecciones de las sLNvs, fenómeno que se denominó "plasticidad estructural circadiana" (Fernández et al., 2008). Hoy en día se sabe que este fenómeno de plasticidad estructural involucra varios mecanismos (Sivachenko et al., 2013, Depetris-Chauvin et al., 2011 y 2014, Petsakou et al., 2015) y que es posible que el reloj molecular reclute distintos procesos celulares para llevar a cabo la remodelación estructural.

Entre los mecanismos celulares subyacentes se ha mostrado que la plasticidad estructural circadiana depende de un reloj funcional (Fernández et al., 2008; Herrero et al., 2017), es sensible a cambios de excitabilidad de la membrana (Depetris-Chauvin et al., 2011; Depetris-Chauvin et al., 2014) a través de la actividad del factor de transcripción MEF2, cuya expresión depende del reloj circadiano y de la actividad neuronal; MEF2 a su vez regula la expresión de genes efectores responsables de parte de los cambios estructurales, por ejemplo de Fasciclin II (Sivachenko et al., 2013). Como parte del proceso de remodelación también se recluta a una metaloproteasa de matriz extracelular llamada MMP1, quien a su vez modula los niveles del neuropéptido PDF, el cual, a través de un mecanismo aún desconocido, afecta el proceso de la remodelación (Depetris-Chauvin et al., 2014). Este fenómeno recluta mecanismos involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina (Petsakou et al., 2015) y en este punto la vía de BMP también podría mediar estas modificaciones. En la placa neuromuscular, la vía de BMP modula la fuerza de conexión y crecimiento sináptico regulando la expresión de la proteína RhoGEF conocida como TRIO, que finalmente ejerce su efecto sobre el citoesqueleto de actina

(Awasaki et al., 2000; Ball et al., 2010). Partiendo de esta idea examinamos si activar la vía en las LNVs podría afectar la morfología de las proyecciones de las sLNVs y finalmente sobre la plasticidad estructural circadiana.

Debido a que la vía de BMP puede actuar a través de diferentes factores de transcripción, y dependiendo del contexto celular puede o no hacer uso del factor SHN, se eligió abordar esta pregunta por medio de la desregulación de los ligandos, particularmente, DPP, empleando la línea utilizada para los experimentos de actividad locomotora. Contrariamente a lo que sucede con la morfología de la motoneurona en la placa neuromuscular (Ball et al., 2010), y desvinculando el aumento de contactos sinápticos a los cambios en la complejidad de las proyecciones, la activación (tanto aguda (24h) como crónica (7 días) resultó en una menor complejidad de las terminales. Este efecto sobre la morfología de las sLNVs fue inesperado; tanto las inducciones agudas como crónicas generaron proyecciones menos desfasciculadas y más elongadas, en definitiva, menos complejas, al comienzo del día. Estas modificaciones en la morfología no estuvieron asociadas a cambios en los niveles de PDF siendo uno de los pocos trabajos que desacoplan estos dos fenómenos.

Trabajos sobre la vía de señalización a través de DPP en cultivos celulares, han mostrado que la liberación de este morfógeno hacia otras células puede generar la formación de estructuras tipo filopodio en las células blanco (Roy et al., 2014). En particular, en este trabajo encontramos que tanto la liberación de DPP como la de GBB afectan la morfología de las proyecciones, observándose también una elongación de las neuritas, recapitulando el efecto que tiene la vía en otros tejidos o estadios de desarrollo.

Así como la morfología se vio afectada por la activación de la vía, la plasticidad estructural también, perdiéndose la oscilación dado que las proyecciones se mantuvieron en una configuración poco elaborada tanto de día como de noche. Estos cambios tampoco se asociaron a cambios en PDF, ni en sus niveles, ni en su oscilación, que permaneció similar al control. Trabajos anteriores en nuestro laboratorio han demostrado que efectos sutiles sobre los niveles de PDF son suficientes para generar pérdida de la plasticidad (Herrero et al., 2017); en este caso la vía de BMP estaría afectando la plasticidad por un mecanismo independiente de PDF.

Sorprendentemente, la liberación de DPP por las ILNVs y por las sLNVs tuvo efectos diferenciales, y esto concuerda con lo observado en los experimentos de actividad locomotora donde también se observó que DPP podía generar período largo o corto dependiendo si era liberado por las ILNVs o por las sLNVs. Trabajos recientes han demostrado que al menos una de las ILNVs proyecta hacia la médula accesoria cerca del

soma de las sLNvs (Schubert et al., 2018). La liberación de DPP en esa zona podría estar activando la vía en las sLNvs y ser la responsable de los cambios observados en las proyecciones, activando mecanismos que podrían traducirse en modificaciones del citoesqueleto de actina (Ball et al., 2010). La capacidad de las ILNvs de modificar la conectividad de las sLNvs y el comportamiento demuestra que este grupo es un nexo importante entre las señales externas como la luz, que permiten entrenar al reloj, y el marcapaso central. De hecho, se ha reportado que en condiciones de un fotoperíodo de verano las ILNvs son capaces de modular otro grupo de neuronas circadianas para retrasar la anticipación de la tarde (Schlichting et al., 2016). Nuestros resultados podrían aportar en este sentido a la comprensión del mecanismo a través del cual se lleva a cabo esta regulación; por ejemplo, una menor conectividad de las sLNvs con otros grupos circadianos responsables de la anticipación de la tarde podría verse reflejada en un retraso del pico de la tarde. La menor desfasciculación generada por la liberación de DPP desde las ILNvs podría conducir a una menor conectividad y esta comunicación podría verse co-optada entonces para ajustar la actividad locomotora en días más largos.

La liberación de DPP en la región dorsal, donde proyectan las sLNvs, podría activar la vía en otros grupos circadianos, como por ejemplo las DN1s (en los resultados del primer capítulo demostramos que la vía puede activarse potencialmente en este grupo) y de una manera indirecta afectar la plasticidad de las sLNvs y la morfología de las proyecciones, que en este caso se mantuvieron arborizadas y complejas tanto de día como de noche. En ambas condiciones (la liberación forzada de DPP desde las ILNvs o desde las sLNvs), p-Mad se localizó en el núcleo y en distintas regiones (Ver ANEXO III, Figura 65) avalando la hipótesis anterior.

Teniendo en cuenta por un lado el efecto sobre la plasticidad y por otro sobre la organización temporal de la actividad locomotora, es tentador proponer que las ILNvs modulan la plasticidad de las sLNvs a través de la vía de BMP; al perderse dicha plasticidad los osciladores que se comunican y contactan con las sLNvs pierden parte de esa conexión (Gorostiza et al., 2014), tanto porque las proyecciones están menos elaboradas como porque el número de contactos sinápticos es menor. De hecho, en la literatura hay pocos ejemplos que muestren el impacto directo de cambios en la plasticidad estructural circadiana sobre el patrón de comportamiento rítmico.

Es interesante destacar las diferencias de los efectos tras la liberación de DPP desde ambos grupos. En el caso de las sLNvs, se observó el acortamiento del período y una mayor complejidad de las sLNvs, tal vez como resultado de la acción de la vía sobre las mismas sLNvs, asociada a aumentos en los niveles de PER (Ver Figura 49), lo que podría

Discusión y conclusiones

traducirse en un reloj más acelerado y por lo tanto en un período más corto; alternativamente, al contactar durante la noche a otros grupos de osciladores con relojes levemente más rápidos podrían ser éstos los que se encarguen del control de período.

En la Tabla 3 se resumen los principales resultados relacionados a la comunicación a través de DPP y GBB sobre el comportamiento, plasticidad y niveles de PDF.

Discusión y conclusiones

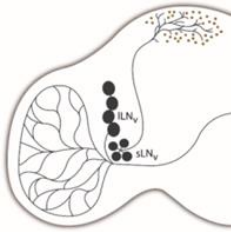


Grupo circadiano	Ligando	Desregulación	Efecto sobre la actividad locomotora	Efecto sobre la plasticidad estructural	Efecto sobre los niveles de PDF
	DPP	UAS ARNi <i>dpp</i>	Desconsolidación de la actividad locomotora	-	-
		UAS- <i>dpp</i>	Tendencia a período largo	Proyecciones cerradas, pérdida de la plasticidad	Sin efecto
	GBB	UASARNi <i>gbb</i>	Desconsolidación de la actividad locomotora	-	-
		UAS <i>gbb</i>	Período largo	Proyecciones cerradas y pérdida de la plasticidad	Sin efecto
	DPP	UAS- ARNi <i>dpp</i>	Desconsolidación de la actividad locomotora	-	-
		UAS- <i>dpp</i>	Período largo	Proyecciones cerradas, pérdida de la plasticidad	Sin efecto sobre la oscilación, niveles más alto de noche
	GBB	UASARNi <i>gbb</i>	Desconsolidación de la actividad locomotora	-	-
		UAS <i>gbb</i>	-	Proyecciones cerradas, pérdida de la plasticidad	Sin efecto sobre la oscilación
	DPP	UAS- ARNi <i>dpp</i>	Desconsolidación de la actividad locomotora	-	-
		UAS- <i>dpp</i>	Período corto	Proyecciones abiertas de noche, pérdida de la plasticidad	Sin efecto en la oscilación, niveles más bajos de día
	GBB	UASARNi <i>gbb</i>	Sin efecto	-	-
		UAS <i>gbb</i>	-	Proyecciones abiertas de noche, pérdida de la plasticidad	Sin efecto

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis para las desregulaciones de DPP y GBB en las LNvs. En la primer columna se muestran esquemas de hemicerebros mostrando los grupos donde se realizó la desregulación, de arriba hacia abajo las LNvs, ILNvs y sLNvs. Las celdas que contienen un guión representan experimentos que quedan por realizar.

8 Conclusiones

El presente trabajo ha permitido caracterizar la vía de BMP en el cerebro del adulto de *Drosophila* y evaluar su importancia en la comunicación entre neuronas circadianas, determinando cuales son los ligandos más relevantes y en qué grupos de neuronas la vía se activa en condiciones normales. Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis ponen en evidencia la relevancia de este tipo de vías de señalización en el sistema nervioso adulto; pequeñas desregulaciones pueden tener efectos sobre la morfología de los axones de distintos grupos neuronales. En particular encontramos que la plasticidad estructural, un fenómeno muy controlado a nivel celular, se ve comprometida tan sólo por el aumento en corto tiempo de uno de los morfógenos.

Por otro lado éste es uno de los pocos trabajos que muestra que el grupo de las ILNvs puede modular *outputs* de la red circadiana tales como la plasticidad y actividad locomotora circadiana. Aunque la conectividad directa entre ILNvs y sLNvs ya ha sido demostrada, cuando al excitar específicamente las ILNvs (empleando la misma línea *c929-Gal4*) se observa un aumento de AMPc en las sLNvs, que estaría mediado por PDFR (Schlichting et al., 2016), aún se desconocen varios de los mecanismos a través de los cuales estos dos grupos coordinan su actividad. Los resultados de este trabajo plantean un nuevo mecanismo por el cual las ILNvs podrían realizar un ajuste fino sobre el reloj de las sLNvs modificando el comportamiento en momentos donde se requiera de cierta flexibilidad, como por ejemplo al ajustarse a cambios de fotoperíodo (Figura 53).

Experimentos que permitan demostrar en qué nivel la activación de la vía puede estar afectando el citoesqueleto de actina dentro de las sLNvs son necesarios para completar el entendimiento de los mecanismos que finalmente llevan a las modificaciones observadas en las proyecciones. Dado que TRIO parece ser un candidato, por sus efectos en la placa neuromuscular (Awasaki et al., 2000; Ball et al., 2010), nos proponemos evaluar si este factor está presente en las LNvs y si la sobreexpresión del mismo es capaz de generar fenotipos similares a los observados.

En resumen este trabajo contribuye a desentrañar parte de la complejidad de la comunicación entre los distintos grupos de neuronas, mostrando que en la diversidad se encuentra la clave que permite a toda la red hacer frente a los cambios ambientales de modo que los organismos adapten sus relojes endógenos y su fisiología para anticiparse y sobrevivir en un medioambiente variable.

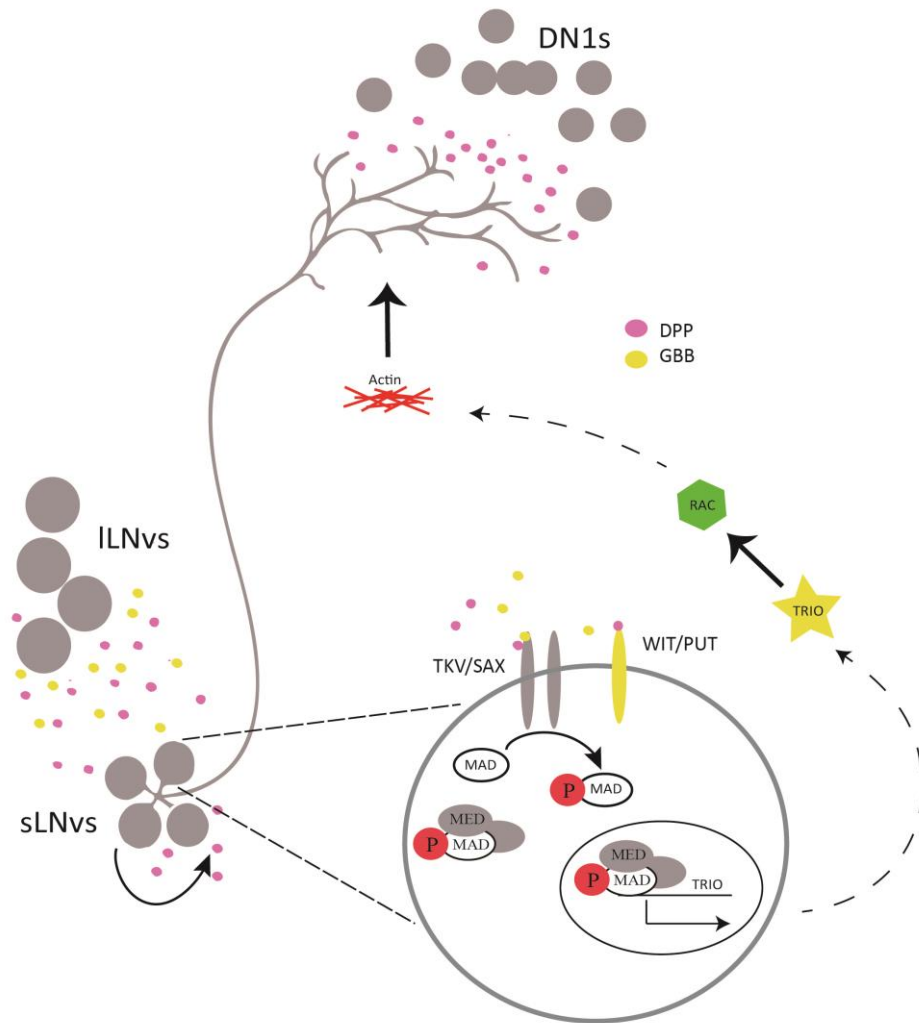


Figura 53. **Modelo propuesto de la comunicación entre las LNvs a través de la vía de BMP.** Las ILNvs liberan los ligandos DPP (rosa) y GBB (amarillo) y activan en las sLNvs la cascada de señalización de BMP que involucra la fosforilación de MAD. p-MAD se une a MED (gris) y a otros factores de transcripción como SHN y en conjunto traslocan al núcleo donde podrían regular la expresión del factor TRIO (amarillo) que luego a través de afectar al citoesqueleto de actina a través de RAC (verde), pueden modificar la morfología de las proyecciones de las sLNvs y la plasticidad estructural, afectando a su vez la comunicación con otros grupos de neuronas circadianas como las DN1s.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I

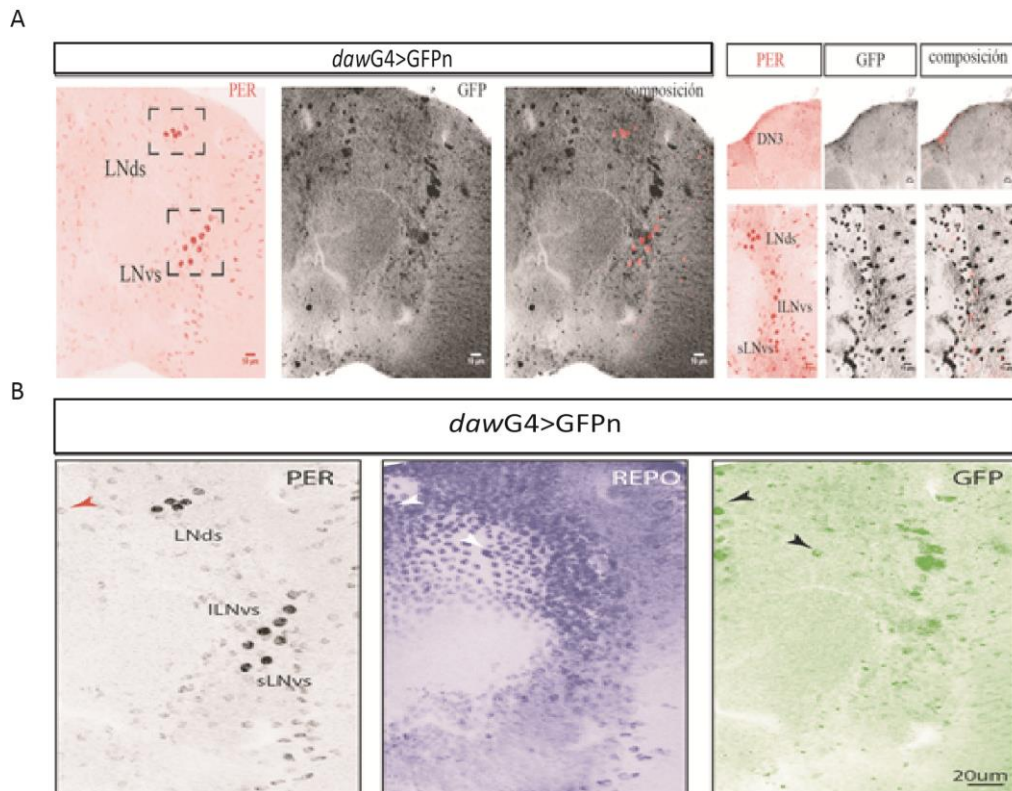


Figura 54. **DAW se expresa en la glía.** Imágenes confocales representativas del patrón de expresión de DAW, utilizando una línea “driver” (*dawG4*) dirigiendo la expresión de GFPn. **A.** La imagen de la derecha muestra un hemiserebro (el derecho) con la señal de PER nuclear identificando los grupos circadianos. La imagen del medio muestra la señal de GFPn y la de la derecha una composición entre las dos señales. Las imágenes de la derecha muestran un detalle de la zona donde se ubican los somas de las DN3, y de una zona más ventral y parte del lóbulo óptico donde se ve expresión de GFP. No hay colocalización entre ambas señales. **B.** Imágenes confocales representativas de un hemiserebro con anticuerpos para la glía (REPO, azul) de la línea reportera *dawG4*. Las flechas indican somas dónde se observó localización de GFP con REPO.

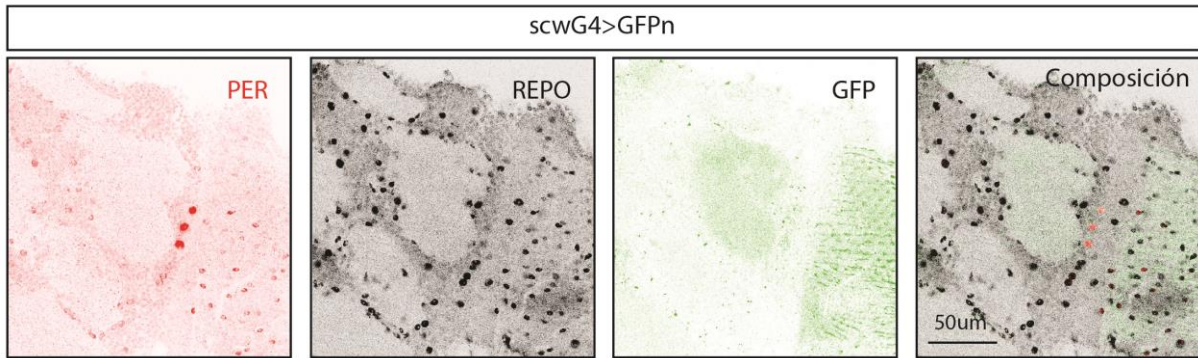


Figura 55. **Patrón de expresión de SCW.** Imágenes confocales representativas del patrón de expresión de SCW, utilizando una línea “*driver*” (*SCWG4*) dirigiendo la expresión de GFPn. La imagen de la derecha muestra un hemiserebro (derecho) con la señal de PER nuclear identificando los grupos circadianos. La imagen del medio muestra la señal de GFP, y la de la derecha una composición entre las dos señales. Las imágenes de la derecha muestran un detalle de la zona donde se ubican los somas de las LNvs y parte del lóbulo óptico donde se vio baja expresión de GFP.

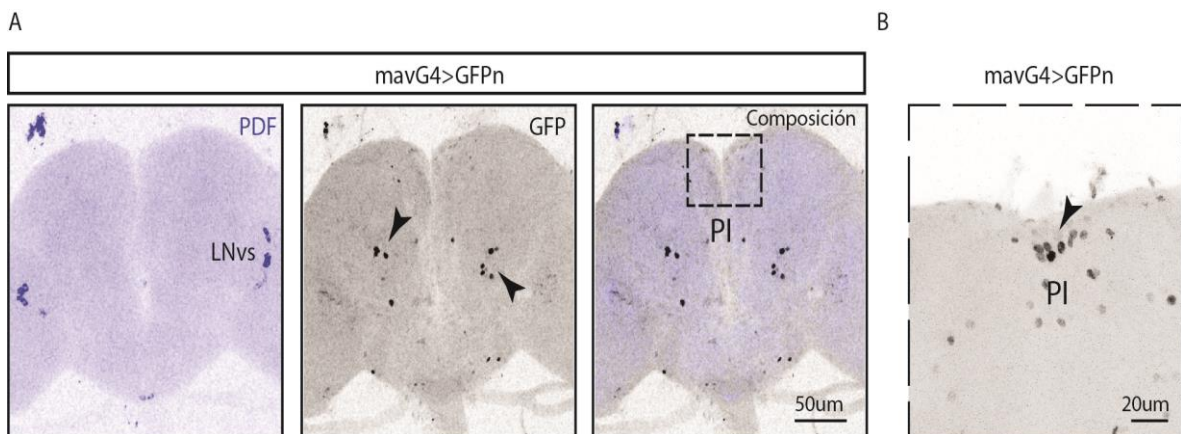


Figura 56. **Patrón de expresión de MAV.** **A.** Se muestran imágenes confocales representativas de un cerebro de la línea reportera *mavG4* expresando GFPn. En azul se muestra la señal para PDF y en negro la señal de GFP. El recuadro punteado detalla la zona de la PI. **B.** Detalle del protocerebro dorsal señalando la PI donde se vio expresión de MAV. Las flechas negras indican somas que fueron GFP+.

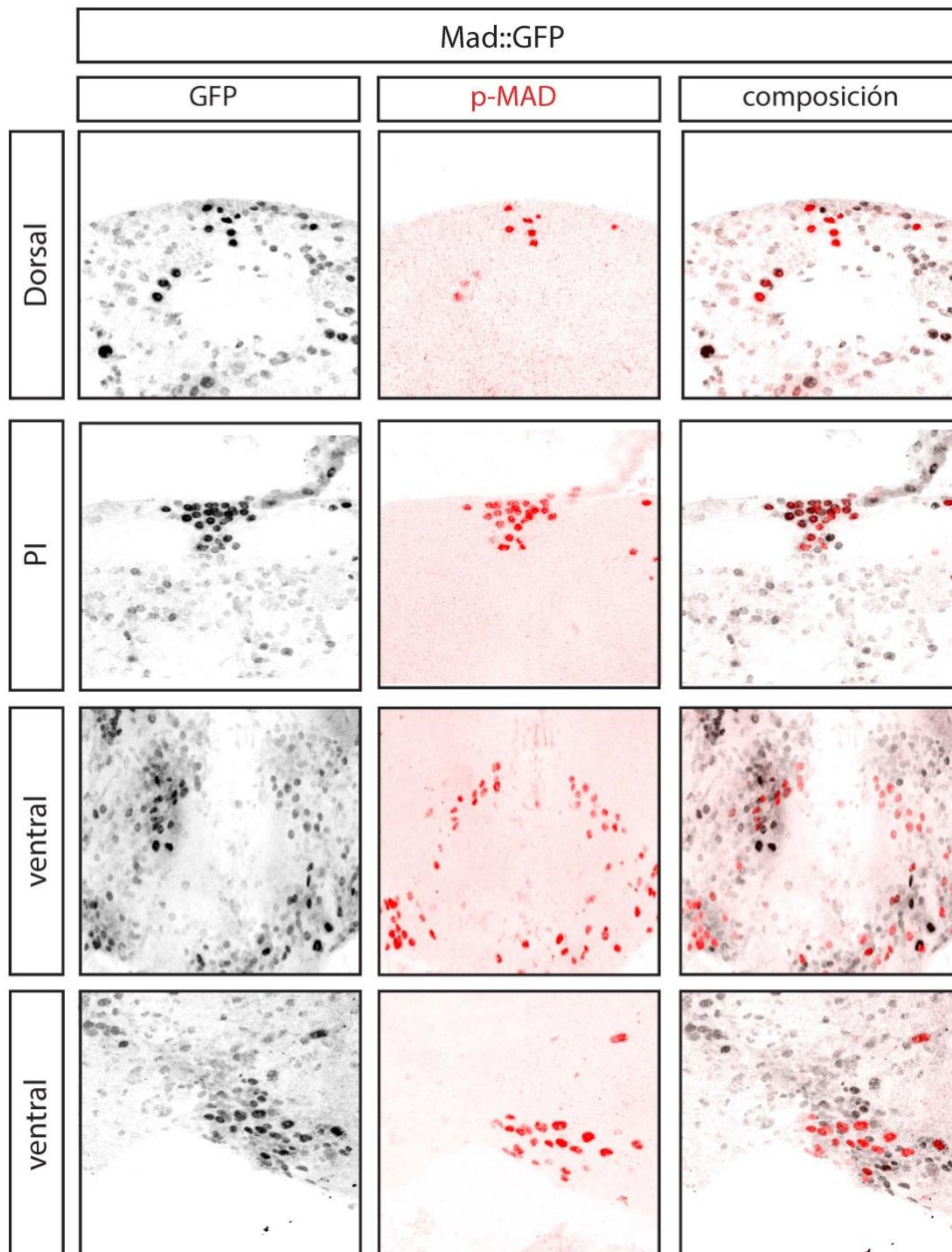


Figura 57. **Distintos grupos de neuronas que expresan MAD co-localizan con p-MAD.** Imágenes confocales representativas de distintas regiones de un cerebro de *Drosophila* donde se muestran somas MAD+ marcados en gris con GFP (imágenes de la derecha) y núcleos p-MAD+ (imágenes del centro); las imágenes de la derecha muestran la composición de ambas señales.

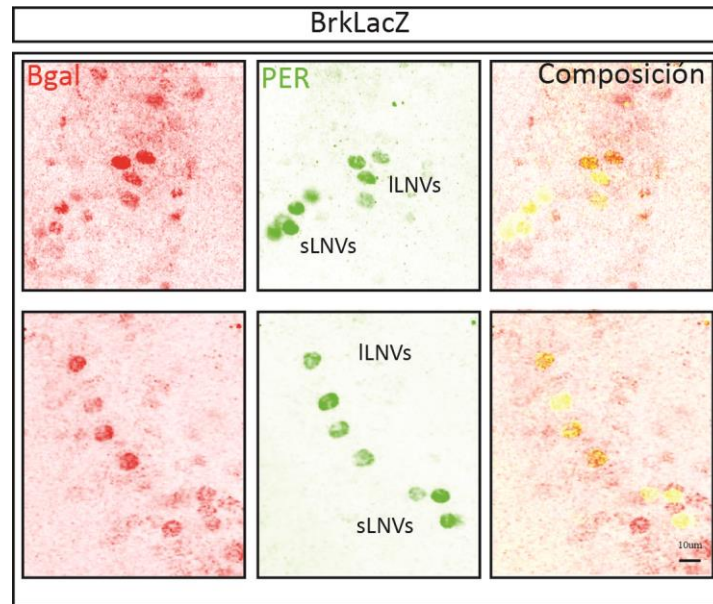


Figura 58. **BRK se expresa en las LNvs.** Imágenes confocales representativas de línea reportera *BrkLacZ*; en rojo se muestra la señal de β gal, en verde la señal de PER identificando los núcleos de las LNvs, y en las imágenes de la derecha una composición de ambas señales.

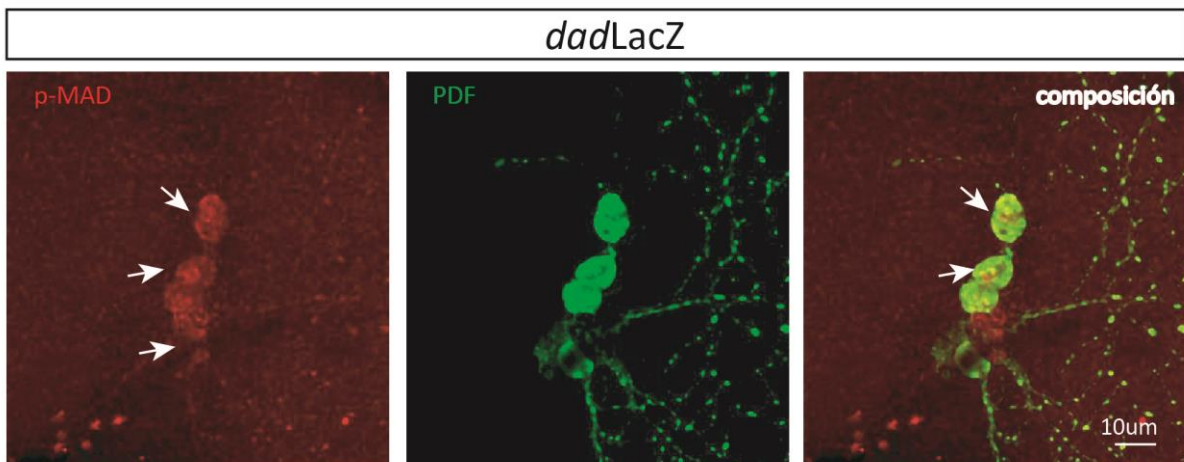


Figura 59. **DAD se expresa en las LNvs.** Imágenes confocales representativas de los somas de las LNvs de la línea reportera *dadLacZ*. Se muestra en rojo la señal de β gal indicando la expresión del gen *dad* y en verde la señal de PDF para identificar los somas. La imagen de la derecha es una composición de ambas señales.

9.2 ANEXO II

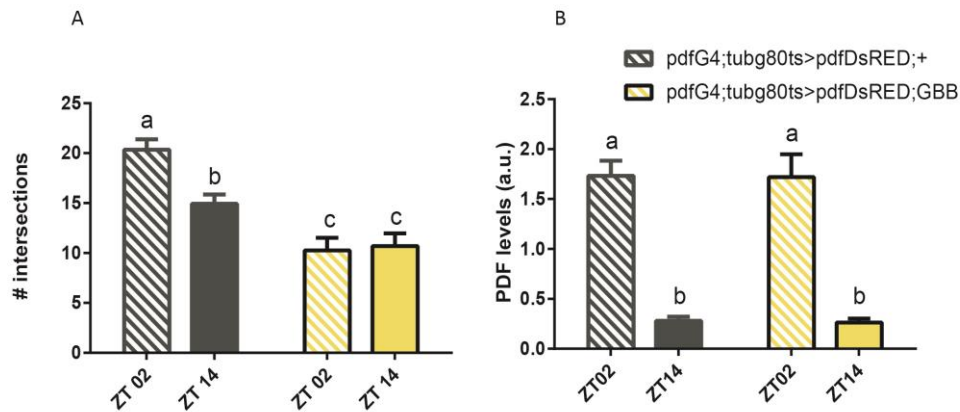


Figura 60. **La activación de la vía de BMP por GBB afecta la plasticidad estructural sin afectar las oscilaciones de PDF.** **A.** Gráfico de barras de la cuantificación del número de entrecruzamientos (número de intersecciones) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de GBB (barras amarillas) en dos momentos del día ZT02 (barras rayadas) y ZT 14 (barras lisas). **B.** Gráfico de barras de la cuantificación de los niveles de PDF entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de GBB (barras amarillas) en dos momentos del día ZT02 (barras rayadas) y ZT 14 (barras lisas). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. *Two-way ANOVA*. Las barras indican la media +/- SEM.

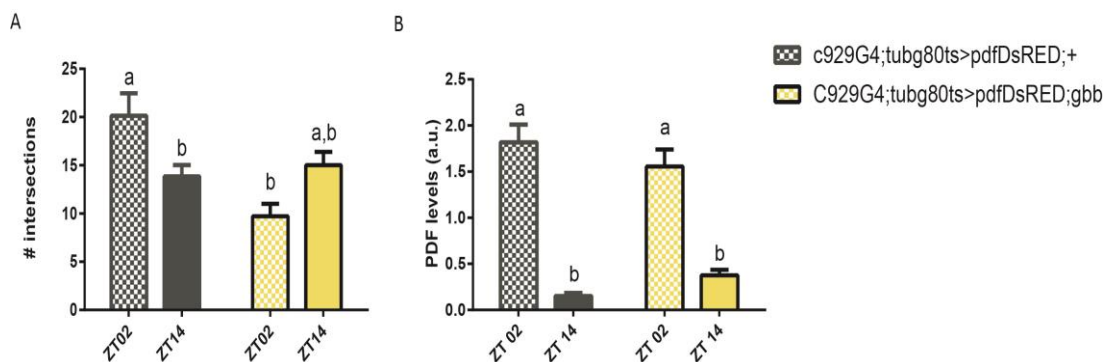


Figura 61. **La liberación de GBB por parte de las ILNs genera pérdida de la plasticidad sin afectar los niveles ni la oscilación de PDF.** **A.** Cuantificación del número de entrecruzamientos (número de intersecciones,) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de GBB (barras amarillas) en dos momentos del día ZT02 (barras rayadas) y ZT 14 (barras lisas). **B.** Cuantificación de los niveles de PDF entre los controles. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. *Two-way ANOVA*. Las barras indican la media +/- SEM.

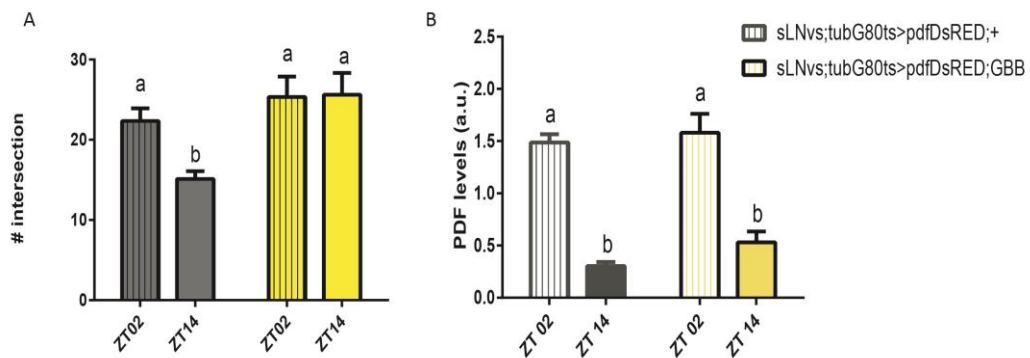


Figura 62. **La liberación de GBB por las sLNvs afecta la plasticidad estructural sin modificar los niveles ni la oscilación de PDF.** **A.** Gráfico de barras de la cuantificación del número de entrecruzamientos (número de intersecciones) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de GBB (barras amarillas). **B.** Gráfico de barras de la cuantificación de los niveles de PDF entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de GBB (barras amarillas). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. Two-way ANOVA. Las barras indican la media +/- SEM.

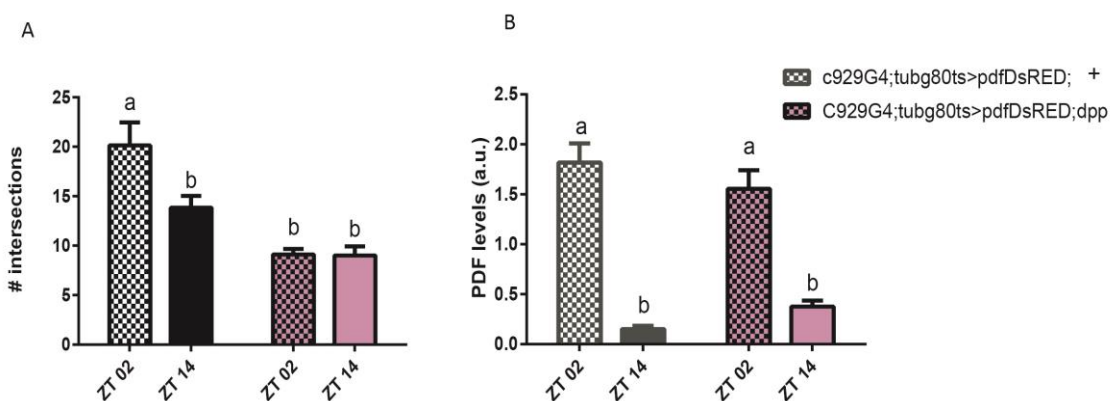


Figura 63. **La activación de la vía de BMP por DPP liberado por las ILNvs afecta la plasticidad estructural.** **A.** Cuantificación del número de entrecruzamientos) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de DPP (barras rosas). **B.** Gráfico de barras de la cuantificación de los niveles de PDF (gráfico inferior) entre los controles (barras grises) y con la sobreexpresión de DPP (barras rosas) en dos momentos del día ZT02 (barras cuadrículadas) y ZT 14 (barras lisas). Las barras indican la media +/- SEM.

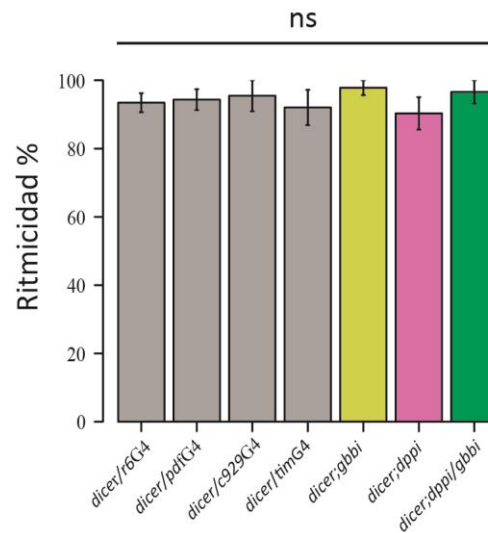


Figura 64. **Los controles para ARNis de *dpp* y *gbb* no fueron diferentes a los controles de las líneas *driver*.** Comparación del porcentaje de ritmicidad entre controles del experimento de la Figura 32, Figura 33 y Figura 34. Las barras grises indican controles para las líneas *drivers*, en amarillo control de ARNi de *gbb*, rosa ARNi de *dpp* y en verde la combinación de ambos.

9.3 ANEXO III

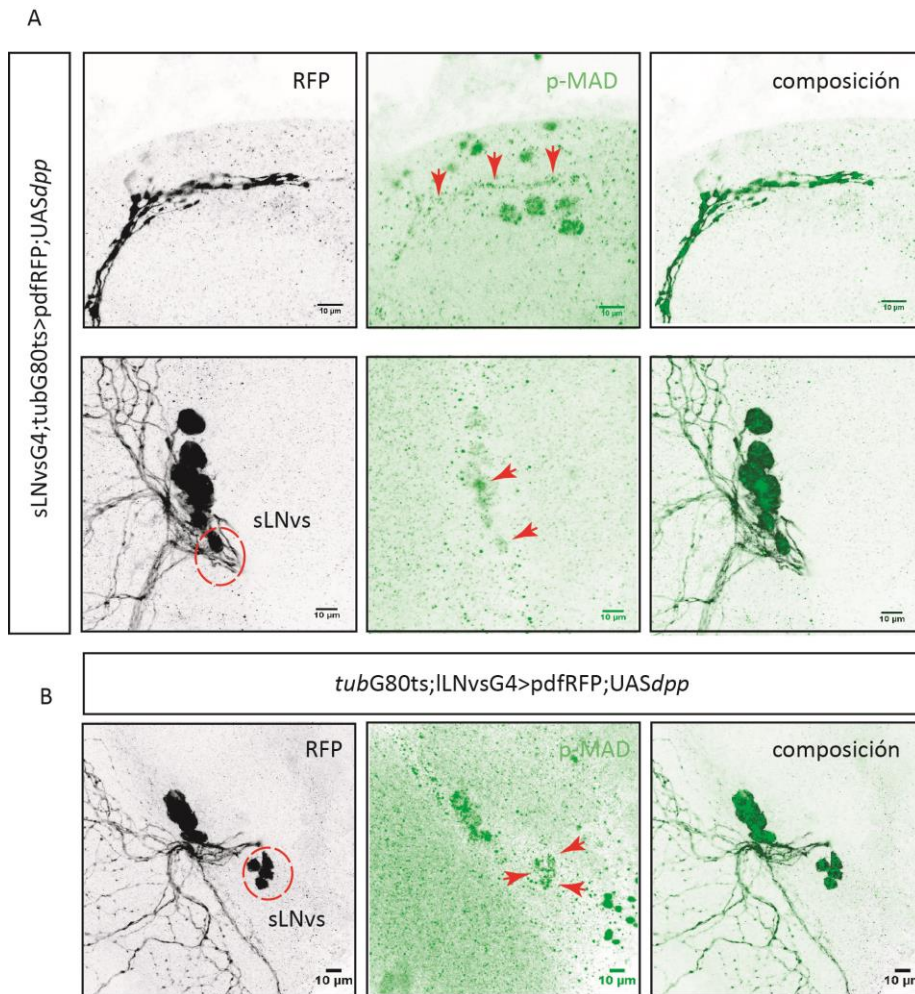


Figura 65. **Activación diferencial de la vía de BMP por la liberación de DPP desde las LNvs.** **A.** Imágenes confocales representativas de las proyecciones de las sLNvs (imágenes superiores) de la línea con sobreexpresión de DPP con el driver de sLNvs (*sLNvsG4;tubG80ts*) e imágenes representativas de los somas de las LNvs (imágenes inferiores). **B.** Imágenes confocales representativas de los somas de las LNvs de líneas con la sobreexpresión de DPP bajo el driver de ILNvs (*tubG80ts;ILNvsG4*). En escala de grises se muestra la señal para el marcador citoplasmático RFP (imágenes de la izquierda) en las imágenes del centro en color verde se muestra la señal de p-MAD y a la derecha una composición de ambas señales. Los círculos rojos indican algunos somas de las sLNvs y las flechas rojas, zonas donde se detectó señal de p-MAD.

10 Bibliografía

- Aberle, H., Haghghi, A.P., Fetter, R.D., McCabe, B.D., Magalhaes, T.R., and Goodman, C.S. (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 33, 545-558.
- Abruzzi, K., Chen, X., Nagoshi, E., Zadina, A., and Rosbash, M. (2015). RNA-seq profiling of small numbers of *Drosophila* neurons. *Methods Enzymol* 551, 369-386.
- Affolter, M., and Basler, K. (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 8, 663-674.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., and Meijer, J.H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol* 15, 886-893.
- Aleman, A., Rios, M., Juarez, M., Lee, D., Chen, A., and Eivers, E. (2014). Mad linker phosphorylations control the intensity and range of the BMP-activity gradient in developing *Drosophila* tissues. *Scientific reports* 4, 6927.
- Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93, 791-804.
- Arora, K., O'Connor, M.B., and Warrior, R. (1996). BMP signaling in *Drosophila* embryogenesis. *AnnNYAcad Sci* 785, 80-97.
- Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K., and Hama, C. (2000). The *Drosophila* trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron* 26, 119-131.
- Baines, R.A. (2004). Synaptic strengthening mediated by bone morphogenetic protein-dependent retrograde signaling in the *Drosophila* CNS. *JNeurosci* 24, 6904-6911.
- Ball, R.W., Peled, E.S., Guerrero, G., and Isacoff, E.Y. (2015). BMP signaling and microtubule organization regulate synaptic strength. *Neuroscience* 291, 155-166.
- Ball, R.W., Warren-Paquin, M., Tsurudome, K., Liao, E.H., Elazzouzi, F., Cavanagh, C., An, B.S., Wang, T.T., White, J.H., and Haghghi, A.P. (2010). Retrograde BMP signaling controls synaptic growth at the NMJ by regulating trio expression in motor neurons. *Neuron* 66, 536-549.
- Ballard, S.L., Jarolimova, J., and Wharton, K.A. (2010). Gbb/BMP signaling is required to maintain energy homeostasis in *Drosophila*. *DevBiol* 337, 375-385.
- Bangi, E., and Wharton, K. (2006). Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *DevBiol* 295, 178-193.

- Beckwith, E.J., Gorostiza, E.A., Berni, J., Rezaval, C., Perez-Santangelo, A., Nadra, A.D., and Ceriani, M.F. (2013). Circadian Period Integrates Network Information Through Activation of the BMP Signaling Pathway. *PLoS Biol* 11, e1001733.
- Benito, J., Houl, J.H., Roman, G.W., and Hardin, P.E. (2008). The blue-light photoreceptor CRYPTOCHROME is expressed in a subset of circadian oscillator neurons in the *Drosophila* CNS. *J Biol Rhythms* 23, 296-307.
- Benzer, S. (1971). From the gene to behavior. *Jama* 218, 1015-1022.
- Boulanger, A., Farge, M., Ramanoudjame, C., Wharton, K., and Dura, J.M. (2012). *Drosophila* motor neuron retraction during metamorphosis is mediated by inputs from TGF-beta/BMP signaling and orphan nuclear receptors. *PLoS one* 7, e40255.
- 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.
- Cao, G., and Nitabach, M.N. (2008). Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 6493-6501.
- Capovilla, M., and Botas, J. (1998). Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. *Development* 125, 4949-4957.
- Capovilla, M., Brandt, M., and Botas, J. (1994). Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in *Drosophila* midgut morphogenesis. *Cell* 76, 461-475.
- Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., Lin, M.C., Glossop, N.R., Hardin, P.E., Young, M.W., Storti, R.V., and Blau, J. (2003). vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112, 329-341.
- Chung, B.Y., Kilman, V.L., Keath, J.R., Pitman, J.L., and Allada, R. (2009). The GABA(A) receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in *Drosophila*. *Curr Biol* 19, 386-390.
- Dahdal, D., Reeves, D.C., Ruben, M., Akabas, M.H., and Blau, J. (2010). *Drosophila* pacemaker neurons require G protein signaling and GABAergic inputs to generate twenty-four hour behavioral rhythms. *Neuron* 68, 964-977.
- de Celis, J.F., Barrio, R., and Kafatos, F.C. (1996). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* 381, 421-424.
- 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.
- Depetris-Chauvin, A., Fernandez-Gamba, A., Gorostiza, E.A., Herrero, A., Castano, E.M., and Ceriani, M.F. (2014). Mmp1 Processing of the PDF Neuropeptide Regulates Circadian Structural Plasticity of Pacemaker Neurons. *PLoS genetics* 10, e1004700.
- Ellis, J.E., Parker, L., Cho, J., and Arora, K. (2010a). Activin signaling functions upstream of Gbb to regulate synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Dev Biol* 342, 121-133.

- Ellis, J.E., Parker, L., Cho, J., and Arora, K. (2010b). Activin signaling functions upstream of Gbb to regulate synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *DevBiol*.
- Fernandez, M.P., Berni, J., and Ceriani, M.F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biol* 6, e69.
- Fernández, M.P., Berni, J., and Ceriani, M.F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biol* 6, e69.
- Fernández, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 5650-5655.
- Ferraro, J.S., Fuller, C.A., and Sulzman, F.M. (1989). The biological clock of *Neurospora* in a microgravity environment. *Adv Space Res* 9, 251-260.
- Frenkel, L., Muraro, N.I., Beltran Gonzalez, A.N., Marcora, M.S., Bernabo, G., Hermann-Luibl, C., Romero, J.I., Helfrich-Forster, C., Castano, E.M., Marino-Busjle, C., *et al.* (2017). Organization of Circadian Behavior Relies on Glycinergic Transmission. *Cell reports* 19, 72-85.
- Fuentes-Medel, Y., Ashley, J., Barria, R., Maloney, R., Freeman, M., and Budnik, V. (2012). Integration of a Retrograde Signal during Synapse Formation by Glia-Secreted TGF-beta Ligand. *Curr Biol* 22, 1831-1838.
- Fuentes-Medel, Y., Logan, M.A., Ashley, J., Ataman, B., Budnik, V., and Freeman, M.R. (2009). Glia and muscle sculpt neuromuscular arbors by engulfing destabilized synaptic boutons and shed presynaptic debris. *PLoS Biol* 7, e1000184.
- Fujii, S., and Amrein, H. (2010). Ventral lateral and DN1 clock neurons mediate distinct properties of male sex drive rhythm in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10590-10595.
- Fuller, C.A., Murakami, D.M., and Sulzman, F.M. (1989). Gravitational biology and the mammalian circadian timing system. *Adv Space Res* 9, 283-292.
- Gesualdi, S.C., and Haerry, T.E. (2007). Distinct signaling of *Drosophila* Activin/TGF-beta family members. *Fly(Austin)* 1, 212-221.
- Glossop, N.R., Houl, J.H., Zheng, H., Ng, F.S., Dudek, S.M., and Hardin, P.E. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37, 249-261.
- Glossop, N.R., Lyons, L.C., and Hardin, P.E. (1999). Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286, 766-768.
- Goold, C.P., and Davis, G.W. (2007). The BMP ligand Gbb gates the expression of synaptic homeostasis independent of synaptic growth control. *Neuron* 56, 109-123.
- Gorostiza, E.A., and Ceriani, M.F. (2013). Retrograde bone morphogenetic protein signaling shapes a key circadian pacemaker circuit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 687-696.

- Gorostiza, E.A., Depetris-Chauvin, A., Frenkel, L., Pirez, N., and Ceriani, M.F. (2014). Circadian pacemaker neurons change synaptic contacts across the day. *Curr Biol* 24, 2161-2167.
- Guo, F., Cerullo, I., Chen, X., and Rosbash, M. (2014). PDF neuron firing phase-shifts key circadian activity neurons in *Drosophila*. *eLife* 3.
- Guo, F., Yu, J., Jung, H.J., Abruzzi, K.C., Luo, W., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2016). Circadian neuron feedback controls the *Drosophila* sleep--activity profile. *Nature* 536, 292-297.
- Hamaratoglu, F., Affolter, M., and Pyrowolakis, G. (2014). Dpp/BMP signaling in flies: from molecules to biology. *Semin Cell Dev Biol* 32, 128-136.
- Hamasaka, Y., Suzuki, T., Hanai, S., and Ishida, N. (2010). Evening circadian oscillator as the primary determinant of rhythmic motivation for *Drosophila* courtship behavior. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 15, 1240-1248.
- Hasson, P., Muller, B., Basler, K., and Paroush, Z. (2001). Brinker requires two corepressors for maximal and versatile repression in Dpp signalling. *EMBO J* 20, 5725-5736.
- 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., Yoshii, T., Wulbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., Bachleitner, W., Cusumano, P., and Rouyer, F. (2007). The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: new insights about their morphology and function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 517-525.
- 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*. *The Journal of comparative neurology* 520, 970-987.
- Herrero, A., Duhart, J.M., and Ceriani, M.F. (2017). Neuronal and Glial Clocks Underlying Structural Remodeling of Pacemaker Neurons in *Drosophila*. *Frontiers in physiology* 8, 918.
- Im, S.H., Li, W., and Taghert, P.H. (2011). PDFR and CRY Signaling Converge in a Subset of Clock Neurons to Modulate the Amplitude and Phase of Circadian Behavior in *Drosophila*. *PLoS one* 6, e18974.
- Im, S.H., and Taghert, P.H. (2010). PDF receptor expression reveals direct interactions between circadian oscillators in *Drosophila*. *The Journal of comparative neurology* 518, 1925-1945.
- Johard, H.A., Yoshii, T., Dirksen, H., Cusumano, P., Rouyer, F., Helfrich-Forster, C., and Nassel, D.R. (2009). Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *J Comp Neurol* 516, 59-73.
- Kadener, S., Menet, J.S., Schoer, R., and Rosbash, M. (2008). Circadian transcription contributes to core period determination in *Drosophila*. *PLoS Biol* 6, e119.
- Keshishian, H., and Kim, Y.S. (2004). Orchestrating development and function: retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends Neurosci* 27, 143-147.

- Kim, M.J., and O'Connor, M.B. (2014). Anterograde Activin signaling regulates postsynaptic membrane potential and GluRIIA/B abundance at the *Drosophila* neuromuscular junction. *PLoS one* *9*, e107443.
- Kim, N.C., and Marques, G. (2010). Identification of downstream targets of the bone morphogenetic protein pathway in the *Drosophila* nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *239*, 2413-2425.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 2112-2116.
- 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. *JBiolRhythms* *21*, 104-117.
- Lear, B.C., Zhang, L., and Allada, R. (2009). The neuropeptide PDF acts directly on evening pacemaker neurons to regulate multiple features of circadian behavior. *PLoS Biol* *7*, e1000154.
- Lee-Hoeflich, S.T., Zhao, X., Mehra, A., and Attisano, L. (2005). The *Drosophila* type II receptor, Wishful thinking, binds BMP and myoglianin to activate multiple TGFbeta family signaling pathways. *FEBS letters* *579*, 4615-4621.
- Li, Y., Guo, F., Shen, J., and Rosbash, M. (2014). PDF and cAMP enhance PER stability in *Drosophila* clock neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E1284-1290.
- Lin, Y., Stormo, G.D., and Taghert, P.H. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *JNeurosci* *24*, 7951-7957.
- Ma, J., and Ptashne, M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* *50*, 137-142.
- Marques, G., Bao, H., Haerry, T.E., Shimell, M.J., Duchek, P., Zhang, B., and O'Connor, M.B. (2002). The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron* *33*, 529-543.
- Marques, G., Musacchio, M., Shimell, M.J., Wunnenberg-Stapleton, K., Cho, K.W., and O'Connor, M.B. (1997). Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* *91*, 417-426.
- Marques, G., and Zhang, B. (2006). Retrograde signaling that regulates synaptic development and function at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* *75*, 267-285.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A.S., and Young, M.W. (2001). A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* *105*, 769-779.
- Marty, T., Muller, B., Basler, K., and Affolter, M. (2000). Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription. *Nat Cell Biol* *2*, 745-749.
- McCabe, B.D., Marques, G., Haghghi, A.P., Fetter, R.D., Crotty, M.L., Haerry, T.E., Goodman, C.S., and O'Connor, M.B. (2003). The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* *39*, 241-254.

- Mezan, S., Feuz, J.D., Deplancke, B., and Kadener, S. (2016). PDF Signaling Is an Integral Part of the *Drosophila* Circadian Molecular Oscillator. *Cell reports* 17, 708-719.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 136, 3699-3714.
- Murad, A., Emery-Le, M., and Emery, P. (2007). A subset of dorsal neurons modulates circadian behavior and light responses in *Drosophila*. *Neuron* 53, 689-701.
- Nguyen, M., Parker, L., and Arora, K. (2000). Identification of maverick, a novel member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila*. *Mechanisms of development* 95, 201-206.
- Park, S.K., Sedore, S.A., Cronmiller, C., and Hirsh, J. (2000). Type II cAMP-dependent protein kinase-deficient *Drosophila* are viable but show developmental, circadian, and drug response phenotypes. *J BiolChem* 275, 20588-20596.
- Petsakou, A., Sapsis, T.P., and Blau, J. (2015). Circadian Rhythms in Rho1 Activity Regulate Neuronal Plasticity and Network Hierarchy. *Cell*.
- Prakash, P., Nambiar, A., and Sheeba, V. (2017). Oscillating PDF in termini of circadian pacemaker neurons and synchronous molecular clocks in downstream neurons are not sufficient for sustenance of activity rhythms in constant darkness. *PLoS one* 12, e0175073.
- Raftery, L.A., and Umulis, D.M. (2012). Regulation of BMP activity and range in *Drosophila* wing development. *Curr Opin Cell Biol* 24, 158-165.
- 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. *AnnuRevPhysiol* 63, 647-676.
- Roy, S., Huang, H., Liu, S., and Kornberg, T.B. (2014). Cytoskeleton-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* decapentaplegic signaling protein. *Science* 343, 1244624.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.
- Salinas, P.C. (2003). Synaptogenesis: Wnt and TGF-beta take centre stage. *Curr Biol* 13, R60-62.
- Santibanez, J.F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121, 233-251.
- Schlichting, M., Menegazzi, P., Lelito, K.R., Yao, Z., Buhl, E., Dalla Benetta, E., Bahle, A., Denike, J., Hodge, J.J., Helfrich-Forster, C., *et al.* (2016). A Neural Network Underlying Circadian Entrainment and Photoperiodic Adjustment of Sleep and Activity in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36, 9084-9096.
- Schubert, F.K., Hagedorn, N., Yoshii, T., Helfrich-Forster, C., and Rieger, D. (2018). Neuroanatomical details of the lateral neurons of *Drosophila melanogaster* support their functional role in the circadian system. *The Journal of comparative neurology* 526, 1209-1231.

- Shafer, O.T., and Yao, Z. (2014). Pigment-Dispersing Factor Signaling and Circadian Rhythms in Insect Locomotor Activity. *Curr Opin Insect Sci* 1, 73-80.
- Shang, Y., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2008). Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19587-19594.
- Sheeba, V., Fogle, K.J., Kaneko, M., Rashid, S., Chou, Y.T., Sharma, V.K., and Holmes, T.C. (2008a). Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*. *Curr Biol* 18, 1537-1545.
- Sheeba, V., Sharma, V.K., Gu, H., Chou, Y.T., O'Dowd, D.K., and Holmes, T.C. (2008b). Pigment dispersing factor-dependent and -independent circadian locomotor behavioral rhythms. *JNeurosci* 28, 217-227.
- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87, 387-406.
- Sivachenko, A., Li, Y., Abruzzi, K.C., and Rosbash, M. (2013). The transcription factor *mef2* links the *Drosophila* core clock to *fas2*, neuronal morphology, and circadian behavior. *Neuron* 79, 281-292.
- Stoleru, D., Nawathean, P., Fernandez, M.L., Menet, J.S., Ceriani, M.F., and Rosbash, M. (2007). The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell* 129, 207-219.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., and Rosbash, M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* 431, 862-868.
- Sulzman, F.M., Ellman, D., Fuller, C.A., Moore-Ede, M.C., and Wassmer, G. (1984). *Neurospora* circadian rhythms in space: a reexamination of the endogenous-exogenous question. *Science* 225, 232-234.
- Taghert, P.H. (2001). How does the circadian clock send timing information to the brain? *Semin Cell Dev Biol* 12, 329-341.
- Tomioka, K., Miyasako, Y., and Umezaki, Y. (2008). PDF as a coupling mediator between the light-entrainable and temperature-entrainable clocks in *Drosophila melanogaster*. *Acta Biol Hung* 59 Suppl, 149-155.
- Vosshall, L.B. (2007). Into the mind of a fly. *Nature* 450, 193-197.
- Vuilleumier, R., Springhorn, A., Patterson, L., Koidl, S., Hammerschmidt, M., Affolter, M., and Pyrowolakis, G. (2010). Control of Dpp morphogen signalling by a secreted feedback regulator. *Nat Cell Biol* 12, 611-617.
- Weiss, A., Charbonnier, E., Ellertsdottir, E., Tsigos, A., Wolf, C., Schuh, R., Pyrowolakis, G., and Affolter, M. (2010). A conserved activation element in BMP signaling during *Drosophila* development. *Nat Struct Mol Biol* 17, 69-76.
- Wharton, K., and Derynck, R. (2009). TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* 136, 3691-3697.

- Wulbeck, C., Grieshaber, E., and Helfrich-Forster, C. (2008). Pigment-dispersing factor (PDF) has different effects on *Drosophila*'s circadian clocks in the accessory medulla and in the dorsal brain. *J Biol Rhythms* 23, 409-424.
- Yao, L.C., Phin, S., Cho, J., Rushlow, C., Arora, K., and Warrior, R. (2008). Multiple modular promoter elements drive graded brinker expression in response to the Dpp morphogen gradient. *Development* 135, 2183-2192.
- Yoshii, T., Funada, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., and Tomioka, K. (2004). *Drosophila cryb* mutation reveals two circadian clocks that drive locomotor rhythm and have different responsiveness to light. *Journal of insect physiology* 50, 479-488.
- Yoshii, T., Hermann-Luibl, C., Kistenpennig, C., Schmid, B., Tomioka, K., and Helfrich-Forster, C. (2015). Cryptochrome-dependent and -independent circadian entrainment circuits in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 6131-6141.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 2597-2610.
- Zhang, L., Chung, B.Y., Lear, B.C., Kilman, V.L., Liu, Y., Mahesh, G., Meissner, R.A., Hardin, P.E., and Allada, R. (2010a). DN1(p) circadian neurons coordinate acute light and PDF inputs to produce robust daily behavior in *Drosophila*. *Curr Biol* 20, 591-599.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bilodeau-Wentworth, D., Hardin, P.E., and Emery, P. (2010b). Light and Temperature Control the Contribution of Specific DN1 Neurons to *Drosophila* Circadian Behavior. *Current Biology* 20, 600-605.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bilodeau-Wentworth, D., Hardin, P.E., and Emery, P. (2010c). Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Curr Biol* 20, 600-605.
- Zhu, C.C., Boone, J.Q., Jensen, P.A., Hanna, S., Podemski, L., Locke, J., Doe, C.Q., and O'Connor, M.B. (2008). *Drosophila* Activin- and the Activin-like product Dawdle function redundantly to regulate proliferation in the larval brain. *Development* 135, 513-521.

