

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE DISC LARGE (DLG) EN LA  
FISIOLOGIA SINAPTICA DE LA UNION  
NEUROMUSCULAR DE LARVA DE DROSOPHILA**

**CESAR ANDRES ASTORGA AHUMADA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Directora de Tesis: Prof. Dra. Jimena Sierralta**

**Co-Tutor: Prof. Dr. Ricardo Delgado**

**2015**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE DISC LARGE (DLG) EN LA  
FISIOLOGIA SINAPTICA DE LA UNION  
NEUROMUSCULAR DE LARVA DE DROSOPHILA**

**CESAR ANDRES ASTORGA AHUMADA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Directora de Tesis: Prof. Dra. Jimena Sierralta**

**Co-Tutor: Prof. Dr. Ricardo Delgado**

**2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

**CESAR ANDRES ASTORGA AHUMADA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Marzo del 2015.

**Prof. Dra. Jimena Sierralta**  
Directora de Tesis  
Dpto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
**Prof. Dr. Ricardo Delgado**  
Co-Director de Tesis

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DRA. BRIGITTE VAN ZUNDERT**

**PROF. DR. JOHN EWER**

**PROF. DR. JOSE LUIS VALDES**

**PROF. DRA. CECILIA HIDALGO**  
Presidente Comisión de Examen

Dedico este trabajo a mis padres

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Jimena Sierralta por su incesante apoyo, infinita paciencia y por su cuidadosa supervisión y guía. A Ramón Jorquera por su apoyo intelectual, teórico y visión crítica en el desarrollo de los experimentos. A Ricardo Delgado por su apoyo teórico y por ayudarme a dar mis primeros pasos en el estudio de la fisiología sináptica.

Agradezco a todas las fuentes de financiamiento de este trabajo: la Iniciativa Científica Milenio (ICM, número de proyecto P09-015-F), el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt, número de proyecto 1090272). Al convenio para estudiantes de doctorado de la ICM P09-015-F. Agradezco también a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Conicyt), de la cual fui beneficiario de la beca para estudios de doctorado en Chile.





## INDICE DE CONTENIDOS

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE DOCTORADO .....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
INDICE DE CONTENIDOS .....	vii
INDICE DE FIGURAS .....	x
INDICE DE TABLAS .....	xii
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. La sinapsis .....	1
1.2. Sinapsis eléctricas .....	1
1.3. Sinapsis químicas .....	2
1.4. Modelo cuántico de la liberación de neurotransmisor.....	3
1.5. Mecanismo de liberación de neurotransmisor .....	6
1.6. Plasticidad sináptica .....	8
1.7. Mecanismos de la STP .....	10
1.8. Las sinapsis requieren de una organización espacial precisa de sus componentes .....	14
1.9. Proteínas MAGUK-DLG .....	15
1.10. Unión neuromuscular de la larva de <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio.....	19
1.11. MAGUK-DLGs en la unión neuromuscular de la larva de <i>Drosophila</i> .....	23
1.12. Planteamiento del problema .....	28
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	30
2.1. Hipótesis .....	30
2.2. Objetivo general .....	30
2.3. Objetivos específicos .....	30

3. MATERIALES Y METODOS .....	31
3.1. Materiales .....	31
3.1.1. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	31
3.1.2. Material de disección.....	31
3.1.3. Set-up de electrofisiología .....	31
3.1.4. Pipetas de registro y estimulación.....	32
3.1.5. Electroodos .....	32
3.1.6. Solución de registro.....	32
3.1.7. Anticuerpos .....	32
3.1.8. Reactivos para inmunohistoquímica .....	33
3.1.9. Reactivos para inmunoprecipitación y Western blot .....	34
3.2. Métodos .....	35
3.2.1. Cultivo y obtención de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	35
3.2.2. Registro de corrientes post-sinápticas miniatura .....	35
3.2.3. Registro de corrientes post-sinápticas evocadas.....	36
3.2.4. Plasticidad sináptica .....	37
3.2.5. Curva de $Ca^{+2}$ .....	40
3.2.6. Análisis de registros electrofisiológicos.....	41
3.2.7. Inmunohistoquímica .....	43
3.2.8. Inmunohistoquímica con amplificación.....	44
3.2.9. Microscopía .....	45
3.2.10. Análisis de imágenes .....	45
3.2.11. Inmunoprecipitación .....	46
3.2.12. Western blot .....	46
3.2.13. Rescates, interferencia de <i>dlg</i> y sobre-expresión del canal de $Ca^{+2}$ “Cacophony” .....	47
3.2.14. Presentación de los datos .....	49
4. RESULTADOS .....	51
4.1. Los mutantes de <i>dlg</i> <sup>XI-2</sup> y <i>dlgS97</i> <sup>5</sup> poseen un mayor tamaño cuántico y cinéticas de decaimiento de las mEJCs más lentas.....	51
4.2. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan eEJCs más pequeñas en baja	

concentración de $Ca^{+2}$ .....	56
4.3. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan alteraciones en las zonas activas y en los campos de receptores de glutamato .....	59
4.4. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan una mayor plasticidad sináptica inducida por estimulación tetánica .....	64
4.5. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan una mayor variación en la cinética de sus eEJCs durante el tétano .....	67
4.6. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan alteraciones en la plasticidad sináptica post-tétanica .....	69
4.7. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan pulsos pareados con una mayor facilitación y una menor depresión .....	72
4.8. La dependencia de $Ca^{+2}$ de las corrientes post-sinápticas evocadas se encuentra alterada en mutantes de <i>dlg</i> .....	76
4.9. La distribución del canal de $Ca^{+2}$ Cacophony se encuentra alterada en los mutantes <i>dlg</i> .....	78
5. DISCUSION.....	84
5.1. La isoforma <i>dlgS97</i> participa en la regulación del contenido cuántico por medio de la modificación del tamaño de los campos de receptores de glutamato y/o probablemente el tipo de receptor de glutamato presente .....	84
5.2. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan EJCs más pequeñas debido a alteraciones presinápticas .....	87
5.3. Los mutantes de <i>dlg</i> presentan alteraciones en distintos fenómenos de plasticidad de corta duración .....	89
5.4. El canal de $Ca^{+2}$ “Cacophony” presenta una alterada distribución en los mutantes <i>dlg</i> .....	94
6.CONCLUSIONES.....	98
7. REFERENCIAS .....	100

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Sinapsis químicas y eléctricas .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Proceso de fusión de las vesículas sinápticas .....	8
<b>FIGURA 3.</b> Plasticidad sináptica de corta duración .....	10
<b>FIGURA 4.</b> Complejos proteicos que organizan la maquinaria secretoria en la zona activa presináptica. ....	15
<b>FIGURA 5.</b> Miembros de las MAGUK-DLG presentes en mamíferos.....	17
<b>FIGURA 6.</b> Unión neuromuscular de la larva de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	21
<b>FIGURA 7.</b> Estructura del gen <i>dlg</i> y de los mutantes específicos para cada isoforma.....	25
<b>FIGURA 8.</b> Regulación de la distribución de DLG por parte de CaMKII .....	28
<b>FIGURA 9.</b> Disección de la larva y posicionamiento de los electrodos de registro... 36	
<b>FIGURA 10.</b> Paradigmas de estimulación.....	40
<b>FIGURA 11.</b> Sistema <i>UAS-Gal4</i> .....	48
<b>FIGURA 12.</b> Histogramas de frecuencia de las mEJCs en mutantes <i>dlg</i> . ....	52
<b>FIGURA 13.</b> Análisis de las mEJCs en mutantes <i>dlg</i> .....	53
<b>FIGURA 14.</b> Análisis de las eEJCs en mutantes <i>dlg</i> .....	57
<b>FIGURA 15.</b> Morfología de botones sinápticos en mutantes <i>dlg</i> .....	61
<b>FIGURA 16.</b> Análisis morfológico de botones sinápticos en mutantes <i>dlg</i> .....	63
<b>FIGURA 17.</b> Plasticidad sináptica por estimulación tetánica en mutantes <i>dlg</i> .....	65
<b>FIGURA 18.</b> Cambio de cinética de las eEJCs durante la estimulación tetánica en mutantes <i>dlg</i> . ....	68
<b>FIGURA 19.</b> Plasticidad sináptica post-tetánica en mutantes <i>dlg</i> .....	70
<b>FIGURA 20.</b> Facilitación por pulsos pareados en mutantes <i>dlg</i> .....	74
<b>FIGURA 21.</b> Depresión por pulsos pareados en mutantes <i>dlg</i> .....	75
<b>FIGURA 22.</b> Dependencia del Ca <sup>+2</sup> extracelular en las eEJCs en mutantes de <i>dlg</i> .77	
<b>FIGURA 23.</b> La distribución del canal de Ca <sup>+2</sup> cacophony esta alterada en los mutantes <i>dlg</i> y su sobre-expresión rescata parcialmente el fenotipo de las eEJCs .....	79
<b>FIGURA 24.</b> La sobre-expresión del canal de Ca <sup>+2</sup> cacophony rescata la	

PPF y PPD en los mutantes <i>dlg</i> .....	81
<b>FIGURA 25.</b> Modelo propuesto del rol de las isoformas de <i>dlg</i> en la UNM <sub>DL</sub> .....	99

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Sumario de las cepas de <i>Drosophila</i> utilizadas.....	50
<b>TABLA 2.</b> Sumario de variables electrofisiológicas para todas las cepas.....	82
<b>TABLA 3.</b> Sumario de variables morfológicas para todas las cepas .....	83

## ABREVIATURAS

AMPA: Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasol propiónico

AMPA: Receptor de AMPA

ATP: Trifosfato de adenosina

BSA: Albúmina de suero bovino

Ca<sup>+2</sup>: Ion calcio

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio

CaMKII: Cinasa dependiente de calcio y calmodulina II

CASK: Serina cinasa dependiente de calcio calmodulina

CDK5: Cinasa dependiente de ciclina 5

D<sub>1</sub>: Depresión 1

D<sub>2</sub>: Depresión 2

DgluR: Receptor de glutamato de Drosophila

DLG: Disc large

DPS: Densidad postsináptica

EGFP: Proteína fluorescente verde potenciada

eEJC: Corriente excitatoria de juntura evocada

F1: Facilitación 1

F2: Facilitación 2

FeSO<sub>4</sub>: Sulfato ferroso

GCPR: Receptor acoplado a proteína G

GDP: Guanosín bifosfato

GFP: Proteína fluorescente verde

GMP: Guanosín monofosfato

GluR: Receptor de glutamato

GUK: Guanilato cinasa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxido de hidrogeno

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazina-etano)sulfónico

HL3: Medio parecido a la hemolinfa

HRP: Peroxidasa del rabanito picante

Hz: Hercios  
iGluR: Receptor de glutamato ionotrópico  
IHQ: Inmunohistoquímica  
K<sup>+</sup>: Ion potasio  
KCl: Cloruro de potasio  
KHPO<sub>3</sub>: Fosfato acido de potasio  
LTD: Depresión de largo plazo  
LTP: Potenciación de largo plazo  
m= Contenido cuántico  
M: Moles  
MAGUK: Proteína de membrana asociada a guanilato cinasa  
MAGUK-DLG: Proteína MAGUK de la subfamilia DLG  
mEJC: Corriente excitatoria de juntura en miniatura  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio  
mGluR: Receptor de glutamato metabotrópico  
MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnesio  
mM: mili moles  
ms: mili segundos  
N: Numero de sitios de liberación  
Na<sup>+</sup>: Ion sodio  
NaCl: Cloruro de sodio  
NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sodio  
NaNO<sub>3</sub>: Nitrato de sodio  
NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico  
NMDAR: Receptor de NMDA  
PA: Potencial de acción  
PBS: Buffer fosfato salino  
PFA: Paraformaldehido  
PPD: Depresión por pulsos pareados  
PPF: Facilitación por pulsos pareados  
Pr: Probabilidad de liberación



PTA: Aumento post-tetánico  
PTD: Depresión post-tetánica  
PTP: Potenciación post-tetánica  
q: Tamaño cuántico  
RSS: Retículo subsináptico  
SNARE: Receptor de SNAP  
STP: Plasticidad de corta duración  
SXT: Saxitoxina  
UNM<sub>DL</sub>: Unión neuromuscular de larva de *Drosophila*  
VS: Vesícula sináptica  
ZA: Zona activa

## RESUMEN

La familia de proteínas de andamio MAGUK-DLG participa en la formación de complejos proteicos en uniones intercelulares y juega un importante papel en la fisiología sináptica particularmente en la plasticidad. En vertebrados se conocen 4 miembros de esta familia: SAP90/PSD95, SAP102/NEDLG, SAP97/hDLG y PSD93/Chapsyn-110. El papel *in vivo* de estas proteínas ha sido difícil de estudiar debido al alto grado de redundancia que poseen.

En *Drosophila melanogaster* solo existe un gen MAGUK-DLG, *dlg*. Este gen codifica 2 proteínas: DLGS97 y DLGA. Ambas se encuentran presentes en la unión neuromuscular de la larva de *Drosophila* (UNM<sub>DL</sub>) modelo de estudio de sinapsis glutamatérgicas que comparte componentes moleculares básicos con las sinapsis centrales de vertebrados.

En este trabajo con el propósito de tener una mejor comprensión de la función de las MAGUK-DLGs, se hizo uso de mutantes específicos para cada isoforma (*dlgS97<sup>5</sup>* y *dlgA<sup>40.2</sup>*) y se combinó estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos con herramientas genéticas. De esta manera se demostró que solo la ausencia postsináptica de DLGS97 se asocia con un incremento en las corrientes excitatorias de juntura en miniatura (mEJCs) y a un mayor tamaño de los campos de receptores de glutamato. La ausencia presináptica de ambas isoformas presenta alteraciones en las corrientes excitatorias de juntura evocadas (eEJCs) y en distintos procesos de plasticidad sináptica, sugiriendo una menor probabilidad de liberación, la que, se pudo demostrar que correlaciona con una pérdida de la distribución normal del canal de Ca<sup>+2</sup> dependiente de voltaje “Cacophony”.

## ABSTRACT

The DLG-MAGUK family of scaffolding proteins participates in the formation of multiprotein complexes in cell-cell interaction domains and plays an important role in the synaptic physiology, particularly in synaptic plasticity. In vertebrates this family has four members: SAP90/PSD95, SAP102/NEDLG, SAP97/hDLG y PSD93/Chapsyn-110. The *in vivo* role of these proteins has been difficult to study due to their high degree of redundancy.

In *Drosophila melanogaster* there is only one DLG-MAGUK, *dlg*. This gene encodes two proteins: DLGS97 and DLGA. Both are at the *Drosophila* larvae neuromuscular junction (UNM<sub>DL</sub>) a glutamatergic synapse that shares the basic molecular components with the synapses of the central nervous system of vertebrates.

In order to get a better understanding of the role of the DLG-MAGUKs using specific isoform mutants (*dlgS97<sup>5</sup>* y *dlgA<sup>40.2</sup>*) we combined the use of electrophysiology, immunohistochemistry and genetic tools to show that only the postsynaptic absence of DLGS97 can be associated with an increase in the miniature excitatory junction currents (mEJCs), due to a bigger size in the glutamate receptor fields; moreover, the lack of both *dlg* isoforms affects the evoked excitatory junction currents (eEJCs) and synaptic plasticity, suggesting a smaller probability of release, which can be attributed to an abnormal distribution of the voltage dependant Ca<sup>+2</sup> channel cacophony.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. La sinapsis

El termino sinapsis proviene de las palabras griegas *syn*, (juntos) y *haptain*, (abrochar) y fue acuñado a comienzos del siglo pasado por el fisiólogo ingles Charles Sherrington para describir las zonas de contacto especializadas que permiten la comunicación entre neuronas (Johnston y Miao-Sin Wu, 1995). Durante largo tiempo fue tema de debate la forma en que las sinapsis transmiten la información, existiendo principalmente dos posturas, una de ellas liderada por John Eccles, que proponía un mecanismo de transmisión eléctrica, en el cual la diferencia de voltaje generada por un potencial de acción (PA) generaría una corriente que pasaría pasivamente a través de la sinapsis a la neurona siguiente (Kandel et al., 2000). Por otro lado estaban los que proponían un mecanismo de transmisión químico, liderados por Henry Dale, en el cual el PA en la neurona presináptica induciría la liberación de una sustancia química que a su vez generaría un flujo de corriente en la neurona postsináptica (Kandel et al., 2000). Actualmente sabemos que ambos mecanismos existen en los distintos organismos, recibiendo el nombre de sinapsis eléctricas y químicas respectivamente (Purves et al., 2004). (Fig 1)

## 1.2. Sinapsis eléctricas

Las sinapsis eléctricas se encuentran presentes en el sistema nervioso de todos los animales estudiados, permitiendo el flujo pasivo y directo de corriente eléctrica de una neurona a otra, en este tipo de sinapsis las membranas plasmáticas

neuronales se conectan a través de un tipo de unión intercelular especializada llamada unión en hendidura (Gap junction) (Fig 1B) (Pereda, 2014). Cada unión en hendidura esta formada por el alineamiento entre un hemicanal o conexón de la neurona presináptica y uno de la neurona postsináptica, los que a su vez están constituidos por seis unidades de proteínas llamadas conexinas (Bennet, 2000). Estas uniones en hendidura sirven como poros de baja resistencia eléctrica entre citoplasmas neuronales lo que daría cuenta del paso de corriente en forma pasiva de una neurona a otra lo que además le da la característica a las sinapsis eléctricas de permitir el paso de información de manera bidireccional y extraordinariamente rápida lo que las hace especialmente útiles para sincronizar la actividad eléctrica en poblaciones neuronales ( Relá y Szczupak, 2005; Ohla et al., 2010).

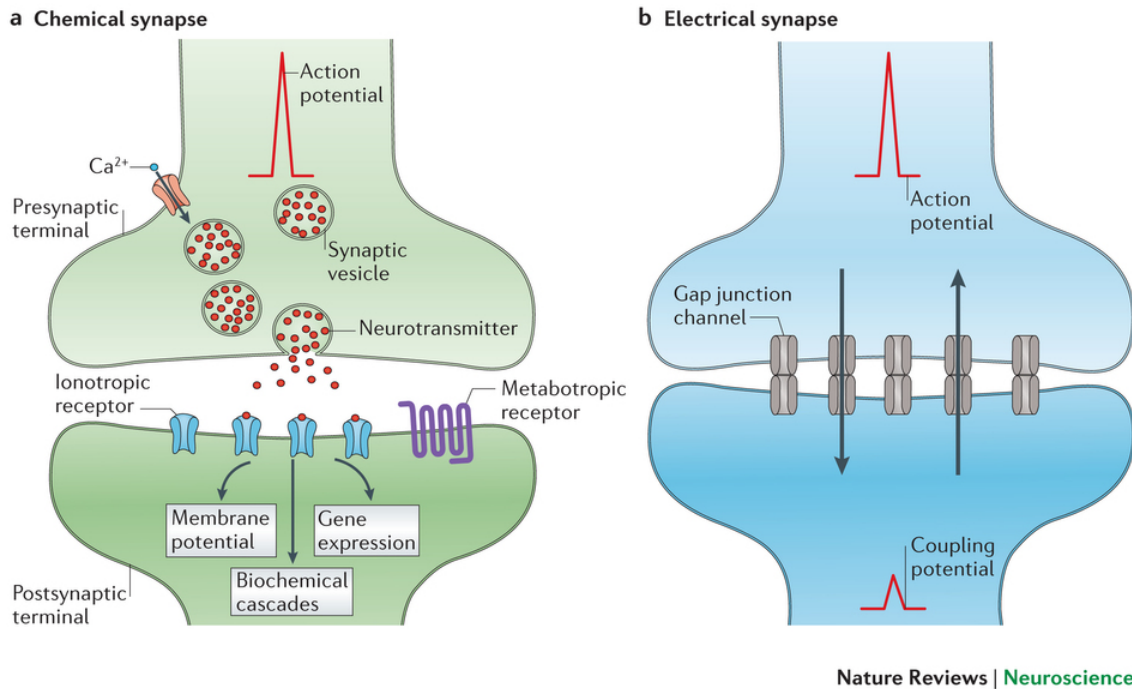
### **1.3. Sinapsis químicas**

Las sinapsis químicas a diferencia de las sinapsis eléctricas, no corresponden a continuidades entre los citoplasmas neuronales, sino que son estructuras complejas en las cuales la neurona presináptica, en respuesta a la despolarización del terminal presináptico por la llegada de uno o varios potenciales de acción (PA), libera una sustancia química llamada neurotransmisor (DelCastillo y Katz, 1954) (Fig 1A) (Pereda, 2014). La liberación del neurotransmisor ocurre en cuantos o paquetes que corresponden a vesículas almacenadas en el terminal presináptico llenas con cantidades muy similares del neurotransmisor. Estas vesículas son llamadas vesículas sinápticas (VS) (Estable et al., 1954; De Robertis y Franchi, 1956; De Robertis et al., 1962). El neurotransmisor luego de ser liberado difunde en el espacio

entre la neurona presináptica y postsináptica llamado hendidura sináptica y se une a receptores específicos presentes en la membrana postsináptica. La unión del neurotransmisor a los receptores postsinápticos puede inducir la apertura directa de canales iónicos generando un incremento transitorio y rápido en la conductancia de la membrana postsináptica. Este aumento de la conductancia permite el paso de iones y el consecuente cambio en el potencial de membrana, ya sea despolarizante o hiperpolarizante dependiendo del potencial de equilibrio de las especies iónicas permeantes. Este tipo de respuesta es característico de las llamadas sinapsis rápidas, en las cuales los receptores postsinápticos están directamente acoplados a canales iónicos que reciben el nombre de receptores ionotrópicos. Por otro lado, existen las llamadas sinapsis lentas en las cuales los receptores postsinápticos pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GCPR) y reciben el nombre de receptores metabotrópicos. En este tipo de sinapsis la unión del neurotransmisor al receptor induce la producción de un segundo mensajero que es el encargado de la apertura o cierre de canales en la membrana postsináptica de forma que las respuestas son mucho más lentas y sostenidas y tienen un rol principalmente modulador (Nicoll, 1988; Jan y Jan, 1997; Marder, 1998).

#### **1.4. Modelo cuántico de la liberación de neurotransmisor**

Una de las principales contribuciones a la neurofisiología realizadas en la década de los 50, fue el descubrimiento de que la liberación de neurotransmisor dependía del ión  $Ca^{+2}$  en el medio extracelular (DelCastillo y Stark, 1952). Estudios posteriores documentaron, que la liberación de neurotransmisor era un mecanismo



**FIGURA 1. Sinapsis químicas y eléctricas.**

**A)** Representación de los principales mecanismos involucrados en la transmisión sináptica química. **B)** Representación de los principales mecanismos involucrados en la transmisión sináptica eléctrica. (Pereda, 2014)

que dependía de manera cooperativa del Ca<sup>+2</sup> extracelular, proponiéndose con esto, que la maquinaria de secreción poseería un sensor con más de un sitio de unión a este ión (Dodge y Rahamimoff, 1967). Contemporáneamente a este trabajo, se determinó que luego del arribo del PA al terminal nervioso, la liberación de neurotransmisor dependía del influjo de Ca<sup>+2</sup> al citosol (Katz y Miledi, 1967). Para que esto tenga lugar, la conductancia de Ca<sup>+2</sup> se encuentra en las vecindades de los sitios activos mediada por la apertura de los canales de calcio activados por potencial (Llinas, 1977). Al elevarse la concentración de Ca<sup>+2</sup> extracelular incrementa el influjo de este ión durante el arribo del PA al terminal y con esto se favorece la posibilidad que se liberen cuantas con neurotransmisor o, dicho de otra manera, que aumente la probabilidad de liberación (Pr). Gracias a esta propiedad, reduciendo la

concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular fue posible disminuir la Pr hasta un nivel en que la respuesta evocada disminuía de manera que residía en una o dos unidades distinguibles. Con esto fue posible describir estadísticamente la probabilidad de que ocurra la liberación de neurotransmisor (DelCastillo y Katz, 1954a). Esta teoría supone la existencia de un número de sitios de liberación disponibles ( $n$ ) que se mantiene constante los cuales se comportan de manera uniforme e independiente y poseen en promedio una probabilidad de liberación  $p$ . El contenido cuántico de una eEJC (corrientes excitatoria de juntura evocada) se define como:

$$m = \frac{c}{q}$$

donde  $c$  representa la carga transferida durante el desarrollo de la eEJC y  $q$  es el tamaño cuántico o la carga transferida producto de la fusión de una vesícula. En promedio el contenido cuántico puede ser expresado como:

$$m = n \cdot p$$

En esta expresión  $n$  representa el número de sitios ocupados con una vesícula en un total de  $N$  sitios de liberación. Así es posible expresar la probabilidad de ocupancia de los  $N$  sitios ( $P_o$ ) como:

$$P_o = n/N$$

Si suponemos que  $p$  representa la probabilidad de fusión de una vesícula ocupada en el sitio de liberación ( $P_F$ ), es posible expresar el contenido cuántico como:

$$m = N \cdot P_o \cdot P_F$$

con lo que en promedio y por sitio la probabilidad de liberación (Pr) es proporcional a:



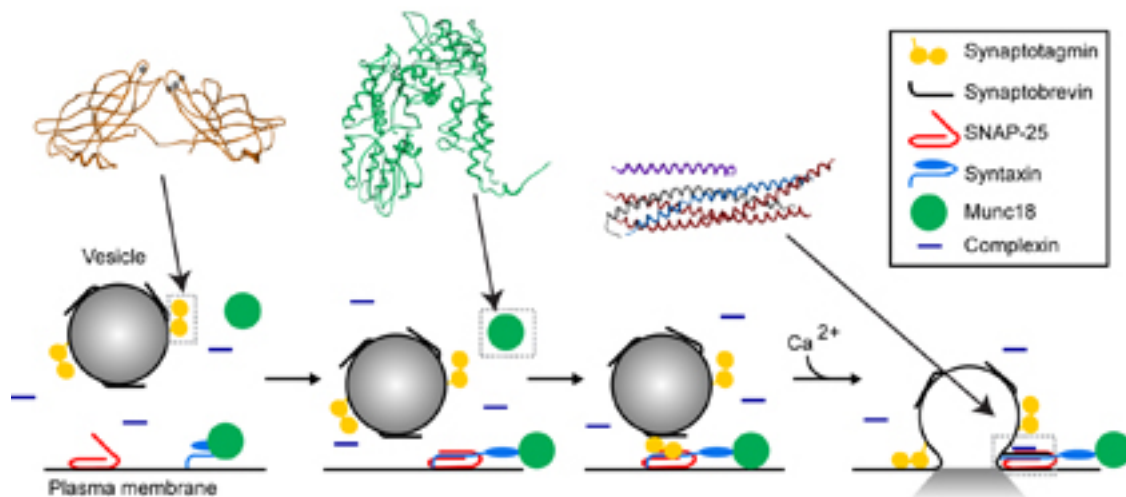
$$Pr \approx m/N \approx P_o \cdot P_F$$

### **1.5. Mecanismo de liberación de neurotransmisor**

Hoy se sabe que el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo la fusión de las VS y por ende la liberación de neurotransmisor se debe a la actividad de proteínas SNAREs (SNAP receptors). Las proteínas de la familia SNARE participan en la fusión de membranas intracelulares y se caracterizan por la presencia de un motivo proteico de 70 aminoácidos comúnmente llamado motivo SNARE. El complejo de fusión se forma cuando cuatro de estos motivos interactúan forzando de esta forma a las membranas para que interactúen entre si iniciando la fusión de estas. Existen cuatro tipos diferentes de motivos SNARE (R, Qa, Qb y Qc ) y es necesaria la presencia de estos cuatro motivos para el ensamblaje de la maquinaria de fusión (Jahn et al., 2003).

La exocitosis de las vesículas sinápticas es mediada por tres proteínas SNARE: Sinaptobrevina, presente en las vesículas sinápticas; SNAP 25 y Sintaxina presentes en la membrana plasmática del terminal presináptico (Sollner et al., 1993) (Fig 2). De esta forma el complejo se forma al interactuar el motivo SNARE-R de la Sinaptobrevina, el Qa de la Sintaxina y los motivos Qb y Qc de SNAP 25. Con esto se genera una fusión incompleta e inestable de la membrana de la vesícula y la membrana plasmática, la que es estabilizada por otra proteína que interactúa con el complejo de fusión llamada Complexina (McMahon et al., 1995) (Fig 2). Esta proteína Complexina además es responsable de mediar la interacción del complejo con otra proteína llamada Sinaptotagmina. Como se mencionó anteriormente a mediados del

siglo pasado se determinó que la liberación del neurotransmisor es dependiente del ion  $\text{Ca}^{+2}$ . La dependencia a este ion está dada por la proteína Sinaptotagmina que es la que en último termino induce la fusión de la vesícula sináptica con la membrana del terminal permitiendo la liberación del neurotransmisor. La proteína Sinaptotagmina esta formada por una corta secuencia N-terminal intravesicular, un segmento transmembrana de paso único y dos dominios C2 citoplasmáticos C2A y C2B (Geppert et al., 1991) los que pueden unir iones  $\text{Ca}^{+2}$  y cuya afinidad a este ión se ve dramáticamente afectada por la interacción con fosfolípidos cargados negativamente (Fernández-Chacón et al. 2001) (Fig 2). El motivo C2A une 3 iones  $\text{Ca}^{+2}$  y el C2B 2 iones  $\text{Ca}^{+2}$  (Fernández et al., 2001) lo que estaría parcialmente de acuerdo con el modelo propuesto en base a los estudios fisiológicos que proponía la interacción cooperativa de 4 átomos de  $\text{Ca}^{+2}$  para inducir la liberación del neurotransmisor errando solo por un ion (Dodge y Rahamimoff, 1967). El mecanismo exacto por el cual la unión de  $\text{Ca}^{+2}$  a Sinaptotagmina induce la fusión de las vesículas y la consecuente liberación del neurotransmisor aún es desconocido, pero se piensa que la interacción con  $\text{Ca}^{+2}$  podría inducir la unión de los dominios C2 con los fosfolípidos de la membrana y una parcial inserción de aminoácidos hidrofóbicos de la Sinaptotagmina en ésta lo que llevaría a un estrés mecánico que desestabilizaría el estado de fusión intermedio formado por el complejo de SNARES y Complexina induciendo una fusión completa (Sudhof, 2004) (Fig 2).



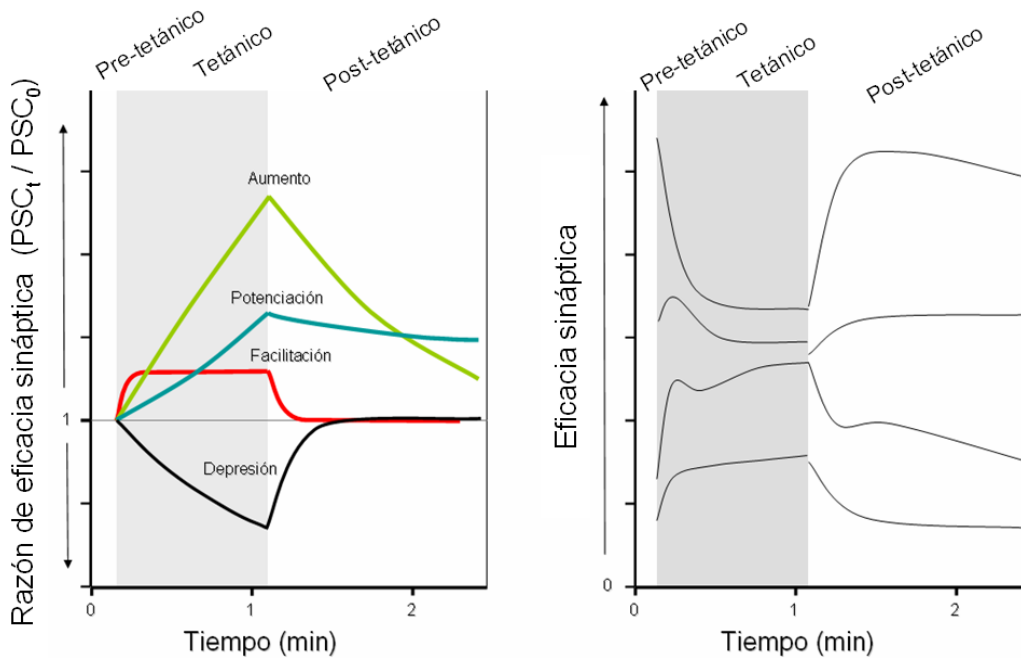
**FIGURA 2. Proceso de fusión de las vesículas sinápticas.**

Modelo representativo de los distintos pasos y de los elementos moleculares básicos (SNAREs y proteínas accesorias) que participan durante la fusión de las vesículas sinápticas.

## 1.6. Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica se refiere al cambio en la magnitud o eficacia de la transmisión sináptica dependiente de la actividad (Zucker y Regehr, 2002). Esta puede ser de tipo positiva y aumentar la eficacia de la transmisión sináptica lo que recibe el nombre de mejoramiento sináptico, dentro del cual encontramos fenómenos como la facilitación (Mallart y Martin, 1967), el aumento tetánico (Magleby y Zengel, 1975), la potenciación post-tetánica y la potenciación de largo plazo (Bliss y Lomo, 1973). O también puede ser negativa y disminuir la eficacia sináptica llamado decremento sináptico como en el caso de la depresión y la depresión de largo plazo. La plasticidad sináptica puede ser dividida según el tiempo de duración del cambio de eficacia en; memoria sináptica de larga duración (LTM) memoria sináptica de corta duración (STM) y plasticidad sináptica de corta duración (STP). La primera no será tema de este trabajo pero podemos decir que dependen de la dinámica con que

se expresan los receptores post-sinápticos, así como también, del establecimiento de nuevas conexiones sinápticas. Ésta puede ser dividida en potenciación de largo plazo (LTP) y depresión de largo plazo (LTD). Por otro lado la STM también conocida como plasticidad post-tetánica está compuesta por distintos fenómenos de mejoramiento y decremento con distinta duración que se producen después de una estimulación tetánica. Los tipos STM que incrementan la eficacia sináptica en órdenes de tiempo de milisegundos, segundos y minutos, respectivamente, son la facilitación post-tetánica, el aumento post-tetánico y la potenciación post-tetánica (PTP). Los tipos de STM que disminuyen la eficacia sináptica en órdenes de tiempo de milisegundos y segundos son la depresión post-tetánica rápida y lenta (Magleby, 1987; Fisher et al., 1997). Por último tenemos la STP que ocurre durante la estimulación tetánica y que al igual que la STM no sólo posee diferentes direcciones de cambio, sino que además ocurre en diferentes escalas de tiempo. Las formas de incremento sináptico rápidas, intermedias y lentas que ocurren durante milisegundos, segundos y minutos, respectivamente son; la *facilitación tetánica*, el aumento tetánico y la *potenciación tetánica*. La STM observada como una disminución en la eficacia sináptica también posee formas de tipo rápida, intermedia y lenta y son denominadas respectivamente como la *depresión tetánica rápida*, la *depresión tetánica intermedia* y la *recuperación de la depresión* (Zucker y Regehr, 2002).



**FIGURA 3. Plasticidad sináptica de corta duración.**

Panel izquierdo. Esquema que muestra los diferentes componentes o tipos de plasticidad sináptica de corta duración inducida durante un episodio tetánico y post-tetánico como se indica sobre la figura. La plasticidad sináptica de corta duración es estudiada como un razón de eficacia sináptica (eje izquierdo) calculada como la razón entre la respuesta post-sináptica a un tiempo  $t$  respecto a una condición inicial (pre-tetánica) o tiempo 0. Un valor  $>1$  indica mejoramiento en la eficacia en cambio un valor  $<1$  indica una disminución. Durante el episodio tetánico se inducen los distintos tipos de plasticidad (rotulado sobre cada línea de color en el cuadro gris) con un curso temporal característico. Luego de cesado el episodio tetánico o episodio post-tetánico, la razón de eficacia sináptica retorna desde el nivel alcanzado al nivel inicial o control con un curso temporal también característico. La coexistencia diferencial de estos componentes de plasticidad de corta duración en diferentes grados da origen a cursos temporales de eficacia sináptica tetánica y post-tetánica complejos (panel derecho).

### 1.7. Mecanismos de la STP

Cuando la investigación sobre la transmisión sináptica se encontraba en sus inicios, tres mecanismos fundamentales fueron propuestos para explicar la STP. Estas fueron las teorías de: el agotamiento de vesículas con neurotransmisor en la

depresión (Liley y North, 1953; DelCastillo y Katz, 1954b; Elmqvist y Quastel, 1965), la del calcio residual en la facilitación (Katz y Miledi, 1968) y la de la desensibilización de los receptores post-sinápticos (Katz y Thesleff, 1957). La teoría del calcio residual emerge luego del descubrimiento de que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el PA posee un lapso determinado de acción que decrece en el tiempo (Katz y Miledi, 1967). Así, con el efecto del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la facilitación, se propuso que parte del  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al terminal permanecería de manera residual unido a la maquinaria de liberación durante un estímulo sucesivo, produciéndose un efecto aditivo que promueve la liberación (Katz y Miledi, 1968). De esta forma, si la frecuencia de estimulación es más rápida que la velocidad de disociación del calcio, el PA facilitará la liberación en los consecutivos estímulos (Magleby, 1987; Zucker et al., 1991; Kamiya y Zucker, 1994). La teoría del agotamiento de vesículas, en cambio, propone que cuando la velocidad con que se fusionan las VSs supera la velocidad de relleno de los sitios de liberación, ocurriría una disminución en el número de sitios de liberación ocupados con una VS. Esto tendría lugar, por ejemplo, cuando la probabilidad de liberación es alta o cuando ocurre una estimulación sostenida del nervio por un largo período (Liley y North, 1953; DelCastillo y Katz, 1954b). Esta teoría cobraría más fuerza luego que se determinara que la depresión ocurriría como un cambio en el número de cuantas liberados y no en el tamaño cuántico (Elmqvist y Quastel, 1965). Estudios posteriores apoyaron esta hipótesis al observar, mediante microscopía electrónica, que luego de un extenso período de estimulación del nervio, los terminales sinápticos presentaban una disminución en el número de VSs (Ceccarelli et al., 1972). La teoría de la desensibilización, en tanto, propone que los receptores post-sinápticos, luego de unir el agonista, podrían entrar en un estado de

menor respuesta al neurotransmisor denominado desensibilizado. Esto tendría lugar si la cantidad de neurotransmisor que se libera es alta y la velocidad con que disminuye el transmisor de la hendidura sináptica es baja. De esta manera, en un corto tiempo, una nueva liberación de neurotransmisor podría activar a sólo un porcentaje de receptores aun sensibles, lo que disminuirá la respuesta post-sináptica (Katz y Thesleff, 1957). Actualmente, estas tres teorías continúan siendo motivo de estudio en diversas sinapsis.

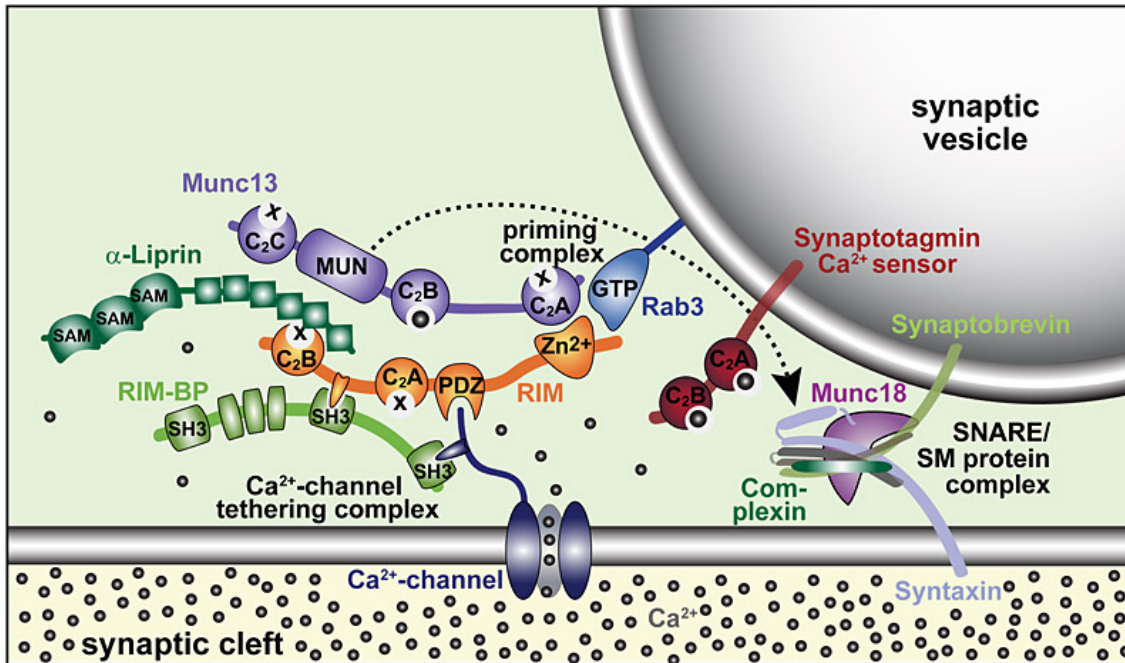
Como se describió anteriormente, un episodio de estimulación del nervio a alta frecuencia puede conducir a diferentes formas de incremento en la transmisión sináptica. Los mecanismos por los cuales ocurren estos fenómenos también dependen del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante el desenjaulado de quelantes de calcio en el terminal sináptico, fue posible determinar que la facilitación tetánica rápida no se afecta por esta maniobra, dependiendo esencialmente del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . En cambio, el aumento y la potenciación tetánica dependerían de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal (Zucker et al., 1991; Kamiya y Zucker, 1994; Regehr et al., 1994). Con estos antecedentes, fue posible observar que el fenómeno del aumento tetánico, se debería a un aumento en el proceso exocítico (Stevens y Wesseling, 1999). Los fenómenos post-tetánicos de facilitación y aumento, han sido relacionados con el decaimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  residual (Magleby, 1987; Zucker et al., 1991; Zucker y Regehr, 2002). En cambio, en el desarrollo de la potenciación post-tetánica se ha propuesto la participación de la mitocondria (Tang y Zucker, 1997; Zhong et al., 2001). Esto ocurriría ya que durante la potenciación tetánica la mitocondria acumularía el calcio proveniente del influjo. Luego al episodio tetánico, la mitocondria mantendría una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  que sostendría la PTP. Para la depresión sináptica en cambio, la

movilización de VSs operaría impidiendo el agotamiento de la transmisión sináptica (Elmqvist y Quastel, 1965; Wu y Betz, 1998). En este mecanismo denominado recuperación de la depresión, se ha propuesto también la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Dittman y Regehr, 1998; Wang y Kaczmarek, 1998; Weis et al., 1999; Dittman et al., 2000). Siendo la recuperación de la depresión, además un proceso dependiente de temperatura (Dinkelacker et al., 2000; Kushmerick et al., 2006). Por otra parte, también se ha propuesto que durante la estimulación repetida del terminal los canales de calcio dependientes de voltaje podrían inactivarse promoviendo la depresión (Forsythe et al., 1998; Xu y Wu, 2005a). No obstante, estos canales también podrían aumentar su activación y promover la facilitación (Borst y Sakmann, 1998; Inchauspe et al., 2004). Estos cambios en la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  regulan la secreción de transmisor y dependen de las propiedades biofísicas que controlan la activación e inactivación de cada tipo de canal de calcio presente. El curso temporal o “timing” del PA orquesta el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con lo cual, cambios en el PA modifican la eficacia sináptica mediante el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto puede tener cierta dirección y cambiar la eficacia sináptica durante un tétano (Sabatini y Regehr, 1997; Sabatini y Regehr, 1999; Borst y Sakmann, 1999) y con el desarrollo de la sinapsis (Reyes y Sakmann, 1999; Fedchyshyn y Wang, 2005). En esta orquesta que dirige el PA, el influjo de calcio disminuye el retardo sináptico y acelera además la cinética de fusión de las VSs, determinando en esencia la demanda de VSs requerida en un episodio de estimulación.



## **1.8. Las sinapsis requieren de una organización espacial precisa de sus componentes**

Para que el proceso de transmisión sináptica descrito anteriormente ocurra de forma apropiada debe existir una organización espacial adecuada tanto de los elementos que participan en los procesos presinápticos de liberación de neurotransmisor como en los postsinápticos. Un ejemplo claro de esto es el hecho de que la exocitosis de las vesículas sinápticas no ocurre en cualquier región del terminal presináptico, si no que éste sólo se lleva a cabo en regiones especializadas llamadas zonas activas (ZA) las que están compuestas por muchas proteínas, dentro de las cuales podemos encontrar; Munc13s (Brose et al. 1995), RIMs (Rab3-interacting molecules) (2000; Wang & Sudhof 2003), Piccolo y Bassoon, (Cases-Langhoff et al. 1996, tom Dieck et al. 1998), ERCs (ELKS/Rab3-interacting molecule/CAST) (Ohtsuka et al. 2002), RIM-BPs (Wang et al. 2000) y  $\alpha$ -liprinas (Schoch et al. 2003) (Fig 4). Todas estas proteínas tienen la cualidad de interactuar entre ellas y además ligar las proteínas necesarias para la exocitosis de las vesículas sinápticas como las proteínas SNAREs, sinaptotagmina y canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje (Fig 4). De esta forma al reunir todos los elementos que participan en la liberación del neurotransmisor en las ZA, se logra una transmisión sináptica más eficiente. En la membrana postsináptica también encontramos regiones especializadas llamadas densidades postsinápticas (DPS), las que se encuentra en directa oposición a las zonas activas y en las cuales se encuentra una alta densidad de receptores postsinápticos lo que también incrementa la eficiencia de la transmisión.



**FIGURA 4. Complejos proteicos que organizan la maquinaria secretora en la zona activa presináptica.**

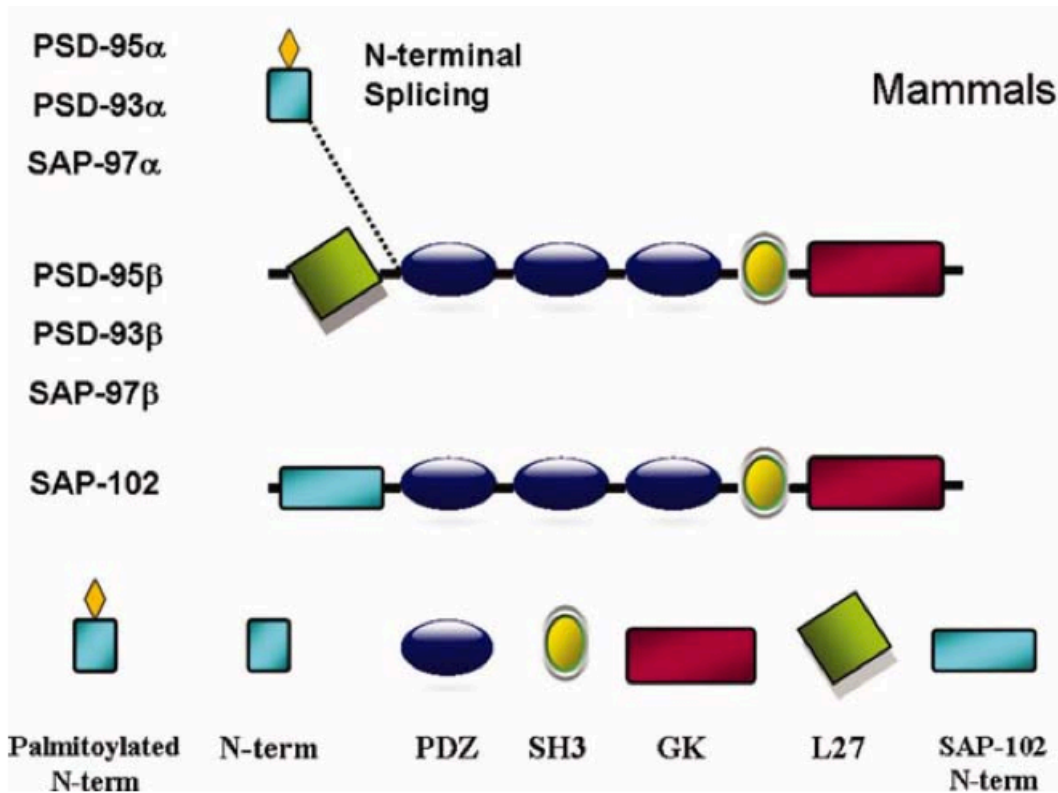
Proteínas involucradas en la localización de los canales de calcio dependientes de voltaje en proximidad con la maquinaria de fusión de vesículas sinápticas. (Kaesler et al., 2011)

### 1.9. Proteínas MAGUK-DLG

Un tipo particular de proteínas que cumplen esta importante función de organizar complejos multiproteicos en regiones especializadas de la célula son las llamadas proteínas de andamiaje. La familia de proteínas de membrana asociadas a guanilato quinasa (MAGUK) pertenecen a este grupo y participan en la formación de complejos de proteínas involucradas en adhesión y señalización celular en regiones de interacción célula-célula. Esta familia de proteínas se caracteriza por la presencia de una región de 300 amino ácidos con homología a la guanilato quinasa (GUK) de levadura, que cataliza la fosforilación ATP dependiente de GMP a GDP. Sin embargo el dominio GUK de las MAGUK es catalíticamente inactivo (Olsen y Bredt, 2003). Estas proteínas además suelen presentar múltiples dominios de interacción proteína-

proteína tales como dominios SH3 (Src- homology-3), PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1), WW y L27 (Fig 5) (Oliva et al., 2011).

Un grupo particular de proteínas pertenecientes a esta familia son las proteínas asociadas a sinapsis de la subfamilia Discs large (DLG o MAGUK-DLG). En vertebrados se han descrito 4 proteínas pertenecientes a esta familia: SAP97/hDLG (human DLG) o DLG1, PSD93/Chapsyn-110 o DLG2, SAP102/ NEDLG (neuroendocrine-Discs large) o DLG3, y. SAP90/PSD 95 (postsynaptic density 95) o DLG4. Cada una de éstas esta constituida básicamente por tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GUK (Fig 5) (Oliva et al., 2011). Además todas ellas poseen 2 isoformas dependiendo del tipo de modificación N-terminal que presenten. La isoforma  $\alpha$  que posee dos sitios de palmitoilación y la isoforma  $\beta$  que posee un dominio L27 en las proteínas PSD93, PSD95 y SAP97 y un dominio diferente para SAP102 (Fig 5) (Oliva et al., 2011; Chetkovich et al., 2002). Estos dominios de interacción proteína-proteína permiten a las MAGUK-DLG agrupar receptores de glutamato, elementos del citoesqueleto, moléculas de adhesión celular y señalización (Fanning y Anderson, 1999; Garner et al., 2000). Por esta razón estas proteínas han sido ampliamente involucradas en el ensamblaje de complejos sinápticos, plasticidad sináptica, la formación y mantención de las sinapsis.



**FIGURA 5. Miembros de las MAGUK-DLG presentes en mamíferos.**  
 Variantes de splicing y organización de dominios en las proteínas MAGUK-DLG.  
 (Oliva et al., 2011)

La expresión de las MAGUK-DLG en cerebro de mamífero se superpone regionalmente con excepción de las neuronas de Purkinje del cerebelo que sólo poseen PSD93 (McGee et al., 2001). En la sinapsis PSD95, PSD93 y SAP102 poseen una distribución mayoritariamente postsináptica, en cambio SAP97 se localiza tanto presinápticamente como postsinápticamente (Aoki et al., 2001) al igual que DLGS97 su homólogo en *Drosophila*.

Existen diversas evidencias de la participación de las MAGUK-DLG en la formación de agregados de receptores de glutamato. Por ejemplo SAP97 ha sido identificada como una de las proteínas que se une a la subunidad GluR1 de los receptores AMPA, los que han sido implicados en los cambios dinámicos de la

eficacia sináptica durante la LTP (long term potentiation) y LTD (long term depression) (Malenka y Nicoll, 1999). Por otro lado SAP102 y PSD95 se encuentran asociadas a receptores de glutamato de tipo NMDA (Muller et al., 1996) (Kornau et al., 1995). PSD95 se sabe que además participa en la distribución de receptores tipo AMPA (Schnell et al., 2002). Como se mencionó anteriormente, estas proteínas también participan como moduladores de cascadas de transducción de señales. Un ejemplo bien estudiado es la organización de los complejos formados por PSD95 asociados al receptor de tipo NMDA (Craven y Brecht, 1998; Brenman et al., 1996). Otro papel de las MAGUK-DLG es regular la distribución de canales de  $K^+$  como Kv1, Kv4.2, Kir3.1 (Ogawa et al., 2008; Vikstrom et al., 2008; Gardoni et al., 2007), los que juegan un importante papel en la fisiología sináptica.

Se han descrito distintos mecanismos de regulación postraduccional de las MAGUK-DLG como palmitoilación y fosforilación. Por ejemplo PSD95 es fosforilada por Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) que inhibe el agrupamiento de canales iónicos (Morabito et al., 2004). SAP97 también se ha descrito que es fosforilada por CaMKII ( $Ca^{+2}$  / Calmodulin-dependent protein kinase II) lo que también afecta la distribución de canales iónicos (Gardoni et al., 2007).

La participación de las MAGUK-DLG en fenómenos de plasticidad sináptica ha sido extensamente estudiado (Montgomery et al., 2004). Sin embargo el foco de investigación ha estado centrado en el rol de estas proteínas en LTP (Carroll et al., 2001) sin considerar la posible participación de estas en plasticidad sináptica de corta duración (STP, Short Term Plasticity). Además la atención ha estado puesta en el papel postsináptico de estas sin prestar mucha atención al componente presináptico, a pesar de que se sabe que todas la MAGUK-DLG también se

expresan en mayor o menor medida en éste compartimento. Esto se puede explicar por dificultades técnicas que significa el tratar de alterar sólo un componente (presináptico o postsináptico) de la sinapsis. Por otro lado el estudio *in vivo* del papel de estas proteínas es complejo y escaso debido a la redundancia funcional entre estas.

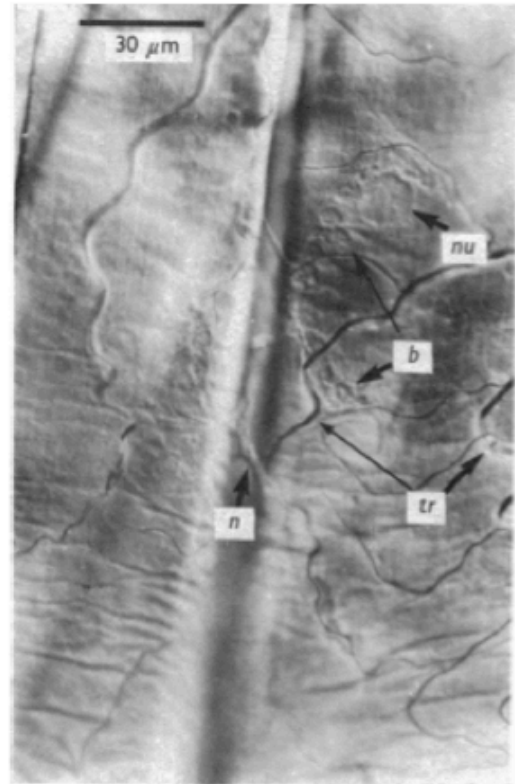
### **1.10. Unión neuromuscular de la larva de *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

La pared muscular de las larvas de *Drosophila melanogaster* y especialmente su unión neuromuscular (UNM<sub>DL</sub>) se ha convertido en uno de los modelos de estudio más populares para abordar distintas preguntas básicas en neurociencia, dentro de las que se incluye el funcionamiento de canales iónicos, mecanismos de liberación de neurotransmisor, fisiología sináptica, plasticidad sináptica funcional y estructural y el estudio de los procesos tempranos que llevan a la formación de la sinapsis. (Budnik et al., 2006). Esto se debe en parte a las ventajas características de trabajar con *Drosophila* como el bajo costo, el rápido ciclo de vida y las potentes herramientas genéticas desarrolladas, las que nos permiten manipular este modelo de formas que difícilmente se logran en otros modelos. Todo esto sumado a la relativa facilidad con la cual la preparación puede ser obtenida, cosa que en manos expertas puede tomar menos de 10 minutos por larva hacen de la UNM<sub>DL</sub> una excelente herramienta .

La pared muscular de las larvas de *Drosophila* está compuesta por siete segmentos abdominales los que pueden ser divididos en dos hemisegmentos, cada uno formado por 30 músculos esqueléticos de gran tamaño dispuestos en un patrón

característico que se repite en cada segmento abdominal (Fig 6A) (Jan y Jan, 1976; Crossley, 1978). La innervación de cada hemisegmento esta dada por 30 motoneuronas que emergen desde el ganglio ventral correspondiente a cada segmento. Esta innervación es de forma estereotipada de manera que cada neurona inerva músculos específicos con un alto grado de reproducibilidad (Keshishian and Chiba, 1993). Este patrón casi invariante permite el estudio de un mismo músculo en distintos animales sin mayor error lo que facilita estudios comparativos; además, al ser estas células musculares de gran tamaño se puede fácilmente introducir microelectrodos con los que se puede hacer estudios electrofisiológicos incluso por horas (Fig 6B) (Jan y Jan, 1976) .

Las motoneuronas que inervan la pared muscular de la larva de *Drosophila* pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: las tipo I que son glutamatérgicas excitatorias y las encargadas de inducir la contracción muscular (Jan y Jan, 1976; Johansen et al, 1989); las tipo II que liberan octopamina como neurotransmisor y presentan características neuromodulatorias (Monastirioti et al, 1995) y las tipo III que son menos frecuentes, y utilizan como neurotransmisor diferentes neuropéptidos como por ejemplo el péptido parecido a insulina (Landgraf et al., 2003). Las motoneuronas tipo I a su vez se pueden clasificar dependiendo del tamaño de los botones sinápticos en Ib (grandes), las que son de mayor tamaño con diámetros de 3-5  $\mu\text{m}$ , y las tipo Is (pequeñas) cuyos diámetros son de 1-1,5  $\mu\text{m}$  (Atwood et al ,1993). Las neuronas tipo Ib además de poseer botones más grandes presentan un retículo subsináptico (RSS), que corresponde a múltiples plegamientos de la membrana muscular asociados a ribosomas que rodean el botón,(Sigrist et al., 2000) más grande y más densamente empaquetado que los

**A****B**

**FIGURA 6. Unión neuromuscular de la larva de *Drosophila melanogaster*.**

**A)** Disección de la pared muscular de larva de *Drosophila*. **B)** Rama sináptica músculo #6 segmento abdominal A3. n (nervio), nu (nucleo), b (boton), tr (traquea). (Jan y Jan, 1976)

terminales tipo Is además de mayor número de mitocondrias en el terminal (Atwood et al , 1993).

En la UNM de *Drosophila* encontramos los dos tipos de receptores glutamatergicos, los ionotropicos (iGluR) y los metabotropicos (mGluR). Los primeros son los encargados de la transmisión sináptica rápida y de la despolarización del músculo, mientras que los segundos parecen jugar un rol neuromodulatorio, regulando la eficacia de la plasticidad sináptica de corta duración (Bogdanik et al., 2004). Hasta hoy se han identificado 5 genes codificantes para subunidades del receptor de glutamato en el músculo. Estas subunidades son



DGluRIIA (IIA), DGluRIIB (IIB), DGluRIII (III), DGluRIID (IID) y DGluRIIE (IIE) (DiAntonio et al 1999; Marrus et al 2004; Qin et al 2005). Cada iGluR esta formado por cuatro de estas subunidades de las cuales la III, IID y IIE son esenciales para la transmisión sináptica, y la mutación de cualquiera de estas subunidades genera moscas inviábiles (Marrus et al 2004; Featherstone et al 2005). Por otro lado las subunidades IIA y IIB no son esenciales para la transmisión sináptica pero al menos una de ellas debe estar presente, ya que los doble mutantes son letales (DiAntonio et al 1999; Yoshihara et al 2005). La existencia de dos tipos de iGluR en la UNM<sub>DL</sub>, aquellos que contienen IIA y aquellos que contienen IIB, da un sustrato molecular para fenómenos de plasticidad postsináptica en la UNM<sub>DL</sub>, ya que regulando la razón entre estos dos tipos de iGluR se puede alterar la eficiencia sináptica. De hecho estos dos tipos de receptores poseen cinéticas dramáticamente diferentes poseyendo aquellos formados por la subunidad IIB una desensibilización 10 veces mas rápida que los IIA (DiAntonio et al, 1999). En mutantes que expresan solo la subunidad IIB la constantes de tiempo de decaimiento para los mEJCs es mucho más rápida y poseen amplitudes menores (Pawlu et al 2004). Experimentos en los cuales se sobre-expresa la subunidad IIA se ve un aumento dosis-dependiente del tamaño cuántico, mientras que con la sobre-expresión de la subunidad IIB se ve una disminución dosis dependiente del tamaño cuántico (DiaAntonio et al 1999; Peterson et al 1997).

En la UNM<sub>DL</sub> se han descrito distintos fenómenos de plasticidad de corta duración (STP) (Jan y Jan, 1978), además se ha visto que la actividad es un potente inductor de cambios plásticos estructurales en las sinapsis tipo I. Por ejemplo se ha determinado que mutantes para canales de K<sup>+</sup>, que presentan hiperexcitabilidad,

poseen un mayor número de ramificaciones y botones sinápticos (Budnik et al., 1990), mientras que en mutantes hipoexcitables se observa lo contrario (Budnik et al., 1990). Otro aspecto importante es que durante el desarrollo el área de los músculos de la pared muscular de la larva aumente más de 100 veces en un periodo de 4 días (Schuster et al., 1996) lo que nos dice que la UNM<sub>DL</sub> es extremadamente plástica, cosa que la hace un excelente modelo de estudio para entender esta clase de fenómenos.

Sabiendo que la mayoría de los genes que participan en la transmisión sináptica de mamífero poseen genes ortólogos en *Drosophila* (Lloyd et al., 2000) y que la UNM<sub>DL</sub> es una sinapsis glutamatérgica al igual que la gran mayoría de las sinapsis del sistema nervioso central de mamíferos podemos concluir que la UNM<sub>DL</sub> es un excelente modelo para estudiar este tipo de sinapsis en un modelo *in vivo*.

### **1.11. MAGUK-DLGs en la unión neuromuscular de la larva de *Drosophila***

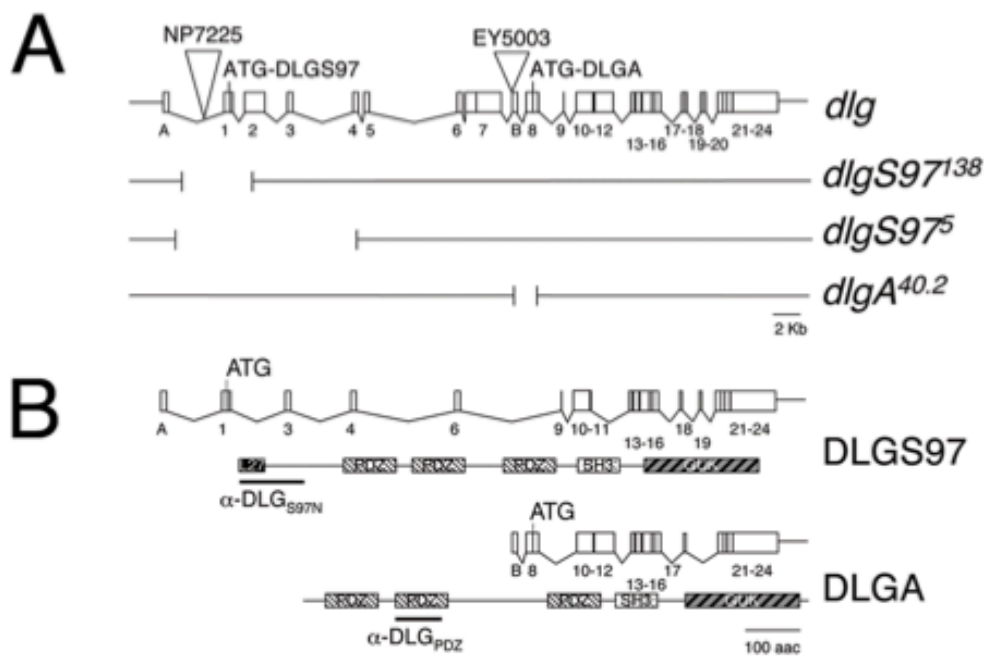
En *Drosophila* se conoce un solo gen codificante para proteínas de la familia MAGUK-DLG, *dlg* (discs large). Este fue el primer gen descrito de esta familia, por esta razón las proteínas homologas de vertebrados SAP97, PSD93, SAP102 y PSD95 fueron también llamadas DLG1, DLG2, DLG3 y DLG4 respectivamente. Se han descrito distintas funciones para este gen dentro de las que encontramos; desarrollo epitelial (Woods et al., 1996), división celular asimétrica (Ohshiro et al., 2000), función y desarrollo de la UNM<sub>DL</sub> (Lahey et al., 1994; Budnik et al., 1996; Tejedor et al., 1997; Thomas et al., 1997).

*dlg* presenta múltiples productos proteicos debido a la presencia de distintos inicios de transcripción y a procesamiento alternativo (Mendoza et al., 2003). Sus principales productos son las proteínas DLGA y DLGS97. La proteína DLGA es más parecida a las isoformas  $\alpha$  de PSD95 y PSD93 y se encuentra presente en tejido epitelial y en la UNM<sub>DL</sub>. Al igual que estas DLGA esta formada por tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GUK. DLGS97 por otra parte se expresa principalmente en el tejido nervioso y en la UNM<sub>DL</sub> y corresponde al homólogo de la isoforma  $\beta$  de SAP97 poseyendo un dominio L27 N-terminal (Oliva et al., 2011).

En la UNM<sub>DL</sub> la expresión de DLG se presenta principalmente en los terminales tipo I, siendo más prominente en los botones tipo Ib (Lahey et al., 1994) y su distribución es tanto presináptica como postsináptica. Postsinápticamente DLG se encuentra enriquecida en el retículo subsinaptico (RSS) (Lahey et al., 1994)

Existen diversos estudios en cuales se evalúa el papel de DLG en la UNM<sub>DL</sub>. Para esto se han utilizado los alelos mutantes *dlg*<sup>XI-2</sup> y *dlg*<sup>m52</sup>. Los mutantes *dlg*<sup>XI-2</sup> los cuales no poseen ninguno de los 3 dominios PDZ (hipomorfos), presentan defectos estructurales en la UNM<sub>DL</sub> como por ejemplo incremento en el numero de botones sinápticos, alteraciones en el RSS además de mayor numero y tamaño de las zonas activas y las vesículas sinápticas (Karunanithi et al., 2002). Además se ha descrito que las mutantes *dlg*<sup>m52</sup>, que no poseen los dominios PDZ 1 y 2, tienen mayores amplitudes en las corrientes sinápticas evocadas (EJCs) y miniatura (mEJC) fenotipo que es rescatado solo por la expresion presinaptica de DLG (Budnik et al., 1996). Estos alelos mutantes afectan a ambos productos del gen sin que se pueda evaluar el papel específico de cada isoforma. Para hacer esto en nuestro laboratorio se

generaron mutantes nulos, específicos para las proteínas DLGA y DLGS97 por medio de la inserción y posterior movilización de elementos P en el gen *dlg* (Fig 7) (Mendoza-Topaz et al., 2008). Estos mutantes son respectivamente *dlgA*<sup>40.2</sup> y *dlgS97*<sup>5</sup>. Las mutantes *dlgA*<sup>40.2</sup> al igual que las mutantes *dlg*<sup>X1-2</sup> y *dlg*<sup>m52</sup> mueren durante el periodo larval debido al desarrollo de numerosos tumores en los discos imaginales. Las mutantes *dlgS97*<sup>5</sup> por otro lado son viables. Además las moscas mutantes adultas *dlgS97*<sup>5</sup> presentan defectos en conductas complejas como por ejemplo fototactismo, cortejo y ritmos circadianos, sin presentar alteraciones en la morfología cerebral, locomoción, olfacción o visión (Mendoza-Topaz et al., 2008).



**FIGURA 7. Estructura del gen *dlg* y de los mutantes específicos para cada isoforma.**

**A)** Mapa del gen *dlg* indicando los lugares de inserción de los elementos P utilizados para generar los mutantes (triángulos invertidos) y las regiones eliminadas en los mutantes *dlgS97*<sup>138</sup>, *dlgS97*<sup>5</sup>, y *dlgA*<sup>40.2</sup>. 1–24 son exones traducidos, A y B son exones no traducidos. **B)** Composición exonica y dominios proteicos de las variantes DLGS97 y DLGA. (Mendoza-Topaz et al., 2008)

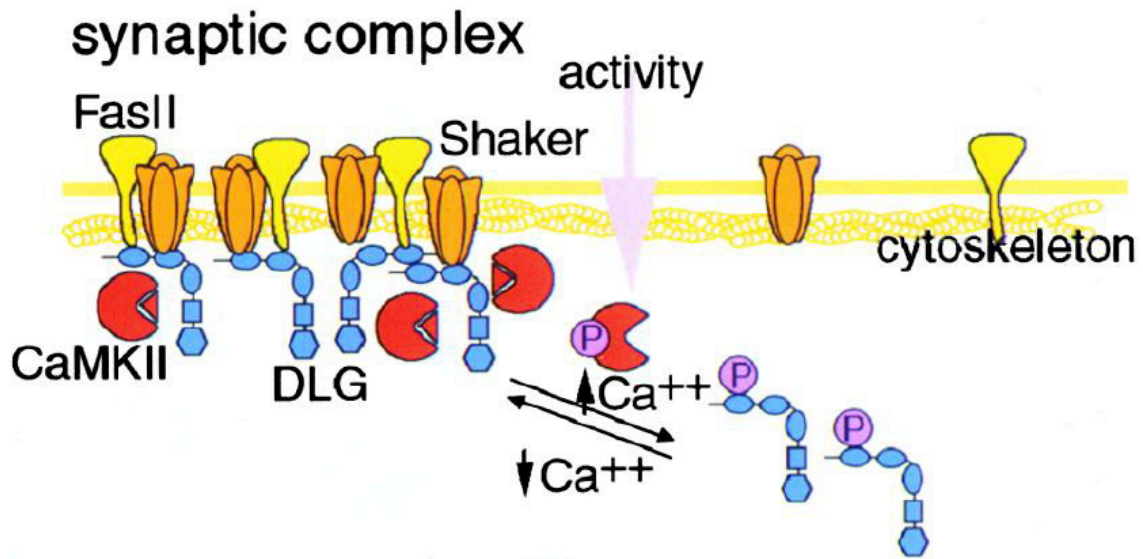
Actualmente se sabe que DLG se une a diferentes componentes clave en la fisiología sináptica como el canal de K<sup>+</sup> Shaker por medio de la interacción de los dominios PDZ1 y 2 con la región C-terminal del canal (Tejedor et al., 1997). El uso de mutantes DLG ha permitido determinar que esta interacción es esencial para la localización normal del canal Shaker en la sinapsis (Zito et al., 1997). Otra proteína que se une por medio de los dominios PDZ es Fasciclina II (FasII) (Thomas et al., 1997; Zito et al., 1997). FasII es un homólogo de las NCAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule), que se ha visto posee un importante papel en fenómenos de plasticidad sináptica regulando el tamaño de las UNM<sub>DL</sub> por medio de la inhibición del crecimiento (Schuster et al 1996). Otro componente sináptico regulado por DLG son los receptores de glutamato. Se ha visto que en embriones *dlg*<sup>XI-2</sup> hay una disminución en la cantidad de receptores glutamatérgicos que contienen la subunidad IIB en las UNM<sub>DL</sub> recién formadas (Chen y Featherstone , 2005). Lo que implica la participación de DLG en la regulación de los niveles relativos de receptores que contienen la subunidad IIA versus la IIB, lo que constituye un parámetro crítico en la funcionalidad y plasticidad sináptica (DiAntonio et al., 1999). Sin embargo aun no se conoce ninguna interacción física entre DLG y cualquiera de las 5 subunidades de GluR presentes en la UNM<sub>DL</sub>. Otro conocido interactivo de DLG es la proteína Scribble cuya localización es regulada por DLG. Mutantes para esta proteína presentan un claro incremento en el número de vesículas del pool de reserva y fallas en la recuperación del pool listo a ser liberado causando una pérdida de la facilitación y potenciación post-tetánica (Roche et al,2002). Otro posible interactivo de DLG es dCASK. dCASK es el homólogo de *Drosophila* de CASK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) la que se sabe interactúa con SAP97 en mamíferos

(Sanford et al., 2004). Aún no hay evidencias de una interacción entre DLG y dCASK, pero esto es altamente probable dada su interacción en mamíferos (Karnak et al., 2002): Actualmente en nuestro laboratorio esto se está tratando de comprobar. Moscas adultas mutantes para *dcask* presentan alteraciones locomotoras, un condicionamiento por cortejo alterado y defectos en la función sináptica (Martin y O'Lo., 1996; Zordan et al., 2005)

Como se mencionó anteriormente la isoforma DLGS97 posee un dominio L27, además de los 3 PDZ el SH3 y el GUK, elemento que le permite interacciones específicas distintas a las de DLGA. Una de las proteínas que se sabe que interactúa con DLGS97 es DLin-7. DLin-7 es una pequeña proteína de andamio constituida por un dominio L27 y un dominio PDZ (Bachmann et al., 2004), y estaría participando en la formación de un complejo con otra proteína de andamio, llamada METRO, que sería la mediadora entre la interacción de DLGS97 con DLin7 (Bachmann et al., 2010). METRO también pertenece a la familia MAGUK y está compuesta por 2 dominios L27, un dominio PDZ, un dominio SH3 y un dominio GUK. Este complejo DLGS97-METRO-DLin7 estaría participando en el control del tamaño y la adecuada organización de los botones sinápticos en la UNM<sub>DL</sub> regulando el tamaño de los clusters de receptores de glutamato postsinápticos (Bachmann et al., 2010). Sin embargo los mutantes de METRO no presentan alteraciones en la transmisión sináptica basal (Bachmann et al., 2010).

Un importante mecanismo que modula la función de DLG es la regulación de la localización de estas proteínas por CaMKII, un efector primario en las señales de Ca<sup>+2</sup> de la sinapsis. Se ha visto en estudios *in vitro* que CaMKII fosforila a DLG en una región conservada del primer dominio PDZ y que la expresión de una isoforma

constitutivamente activa de CaMKII (CaMKII-T287D) en motoneuronas y músculos altera la localización de DLG en la UNM<sub>DL</sub> imitando el fenotipo mutante incluyendo alteraciones en la localización de FasII ( Koh et al., 1999) (Fig 8).



**FIGURA 8. Regulación de la distribución de DLG por parte de CaMKII.**

Modelo en el cual un incremento en la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular debido a actividad sináptica intensa induce la activación de CaMKII. CaMKII una vez activa fosforila a DLG induciendo su retiro de la membrana plasmática lo que lleva a una deslocalización de las proteínas de unión a DLG Shaker y FasII. (Koh et al., 1999)

### 1.12. Planteamiento del problema

El estudio *in vivo* del papel de las MAGUK-DLGs en mamíferos es complejo debido a la presencia de numerosas proteínas pertenecientes a esta familia y a su redundancia. Por otro lado el foco de atención ha estado centrado en el papel postsinápticos de estas proteínas a pesar de que se sabe que hay elementos de esta familia que se expresan tanto post como presinápticamente (SAP97 principalmente). Esto se puede explicar debido a las dificultades técnicas que significa el tratar de alterar solo un componente de la sinapsis.

En *Drosophila* existe sólo un gen SAP-MAGUK que codifica para la expresión de DLGS97 y DLGA, ambas presentes en la UNM<sub>DL</sub> y para las cuales se han desarrollado mutantes específicos en nuestro laboratorio (*dlgS97*<sup>5</sup> y *dlgA*<sup>40.2</sup>). Así, es posible en este modelo el estudio *in vivo* del papel de estas proteínas de andamio, evitando la redundancia presente en mamíferos debido al mayor número de SAP-MAGUKs presentes. Además las potentes herramientas genéticas de este modelo permiten estudiar la contribución de estas proteínas en los componentes pre y postsinápticos por separado lo que significaría un aporte significativo al entendimiento del papel de esta familia proteica.



## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

Las proteínas DLGA y DLGS97 poseen funciones específicas en la fisiología sináptica de la unión neuromuscular de larva de *Drosophila melanogaster*.

### 2.2. Objetivo general

Determinar la contribución diferencial de ambas isoformas de la proteína DLG en la fisiología sináptica de la unión neuromuscular de larva de *Drosophila melanogaster* para así comprender mejor el papel de las proteínas MAGUK-DLG.

### 2.3. Objetivos específicos

1. Caracterizar usando registros electrofisiológicos la respuesta sináptica en las mutantes *dlgS97<sup>5</sup>*, *dlgA<sup>40.2</sup>* y el doble mutante *dlg<sup>XI-2</sup>*.
2. Evaluar por medio de inmunohistoquímica si se encuentran diferencialmente alterados los niveles y/o distribución de elementos claves para la fisiología sináptica en las mutantes *dlgS97<sup>5</sup>* y *dlgA<sup>40.2</sup>* y el doble mutante *dlg<sup>XI-2</sup>*.
3. . Determinar si la plasticidad sináptica de corta duración está alterada de forma diferencial en las mutantes *dlgS97<sup>5</sup>* y *dlgA<sup>40.2</sup>* y el doble mutante *dlg<sup>XI-2</sup>*.
4. Evaluar la contribución presináptica y postsináptica de ambas isoformas de la proteína DLG.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Líneas de *Drosophila melanogaster*

En este estudio se utilizaron las siguientes líneas: *dlgS97*<sup>5</sup>, *dlgA*<sup>40.2</sup>, *dlg*<sup>XI-2</sup>, *UAS-dlgA-EGFP*, *UAS-dlgS97-EGFP*, *UAS-cac1-EGFP*, *UAS-RNAi (dlg1)*, *Df(1)BSC288,w{1118}/BinSincy*, *C57-Gal4*, *Elav-Gal4* y *OK6-Gal4*. Todas con el background genético de la cepa *Canton-S (CS)*, logrado por la cruce con la cepa CS por 7 generaciones con las líneas mutantes y transgénicas. Por esta razón se utilizó esta cepa como control.

##### 3.1.2. Material de disección

Pinzas No 5 (A. Dumont & Fils, Suiza)

Microtijera 15000-02 (Fine Scientific Tools, Alemania)

Alfileres de acero de 1 mm de largo y 0.0125 mm de ancho (Fine Scientific Tools, Alemania)

Lupa estereoscópica (SMZ 1000, Nikon, Japón)

Cámaras de disección y registro fabricadas a partir de elipses de silicona líquida llenas con sylgard adherida a un portaobjeto.

##### 3.1.3. Setup de electrofisiología

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando un microscopio invertido (Olympus CKX41, USA), un equipo de Voltage clamp con dos electrodos

(OC-725C, Harvard Apparatus, USA), uno para medir el voltaje y otro para inyectar corriente. Además se uso un filtro de paso bajo de 8 polos (900, Frequency Devices Inc, USA) con el que se filtro la señal que fue observada continuamente en un osciloscopio (2205 20MHz, Tektronix, Inc, USA). La señal finalmente fue convertida de analógica a digital en un sistema de 16 bits (Digidata 1200, Axon Instrument, USA) y almacenada en el disco duro de un computador personal con Windows 2000NT mediante el Programa Axoscope 9.2 (Axon Instrument, USA). Para la estimulación de la motoneurona se utilizo un estimulador Master 8 (AMPI, Israel).

#### **3.1.4. Pipetas de registro y estimulación**

La fabricación de las pipetas de vidrio se realizo en un estirador de pipetas horizontal automático (P-87, Sutter Instrument Company, USA) utilizando capilares de vidrio de borosilicato con filamento interno (Kwik-Fill, World precision Instruments, USA). Posteriormente, las pipetas fueron llenadas con una solución de KCl 3 M, para lograr una resistencia de 3-5 M $\Omega$  para el electrodo de inyección de corriente y entre 5-10 M $\Omega$  para el electrodo de voltaje. Para la fabricación de la pipeta de estimulación se utilizaron capilares de borosilicato (KIMAX-51, Kimble Products, USA).

#### **3.1.5. Electroodos**

Los electrodos se fabricaron con alambre de plata (World precision Instruments, USA) recubiertos con cloruro de plata (Ag/AgCl). El recubrimiento se realizo de manera electrolítica sometiendo el alambre de plata durante toda la noche a una diferencia de potencial de 1.2 V en presencia de una solución de HCl 0.2 N.

### **3.1.6. Solución de registro**

La solución base para la disección de las larvas y registros electrofisiológicos fue HL3 modificado (HL3.1; 5 mM KCl, 70 mM NaCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM HEPES, 115 mM Sacarosa, 5 mM Trealosa, pH 7.2). A esta solución se le agrego CaCl<sub>2</sub> en las concentraciones requeridas para cada experimento.

### **3.1.7. Anticuerpos**

Rabbit anti-GlurIII 1:1000 (gentilmente donado por el Dr. Tobias Rasse y el Dr. David Fetherston)

Mouse anti-Bruchpilot monoclonal (nc82) 1:500 (Developmental Studies Hybridoma Bank)

Rabbit anti-GFP 1:2000 (Invitrogen, USA)

Goat anti-HRP conjugado con Cy5 1:200 (Jackson ImmunoResearch, USA)

Goat anti-Rabbit conjugado con HRP 1:200 (Invitrogen, USA)

Donkey anti-mouse conjugado con FITC 1:200 (Invitrogen, USA)

Goat anti-Rabbit conjugado con Texas Red 1:200 (Jackson ImmunoResearch, USA)

### **3.1.8. Reactivos para inmunohistoquímica**

Peróxido de hidrogeno técnico (TCL, Chile)

Albúmina de suero bovino (BSA) (Winkler, Chile)

Paraformaldehido (PFA) (Sigma Chemicals Co, USA)

Triton X-100 (Sigma Chemicals Co, USA)

Vectashield (Vector laboratories , USA)

Tyramide Signaling Amplification Kit (Invitrogen, USA)

### **3.1.9. Reactivos para inmunoprecipitación y Western blot**

Cuentas magnéticas conjugadas con GFP-Trap (Chromotek, EEUU)

Mezcla de inhibidores de proteasas 50X (Roche, Suiza)

Solución tampón para lisis celular (solución acuosa de Tris 50mM, SDS 0.1%)

Solución tampón de carga 5X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8; SDS 6%; glicerol 20%; beta-mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0.07%)

Acrilamida/bisacrilamida 30% (29/1) (Sigma, EE.UU)

Solución tampón de electroforesis: 125 mM, glicina 80 mM, SDS 1.7 mM, pH 8.3)

Estándar de peso molecular Page Ruler (Fermentas, Canadá)

Solución tampón PBST (PBS 1X/Tween-20 0.2%)

Papel filtro para transferencia (BioRad, EE.UU)

Almohadillas de fibra para transferencia (BioRad, EE.UU)

Membrana de nitrocelulosa (BioRad, EE.UU)

Metanol técnico (TCL, Chile)

Solución de bloqueo: Leche descremada Svelty 5% en PBST

Sistema comercial para detección quimioluminiscente, Super Signal West Pico (Pierce, EE.UU)

Persulfato de amonio (Winkler, Chile)

TEMED (Sigma, EE.UU)

Tween-20 (Sigma, EE.UU)

Placas fotográficas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, EE.UU)

## **3.2. Métodos**

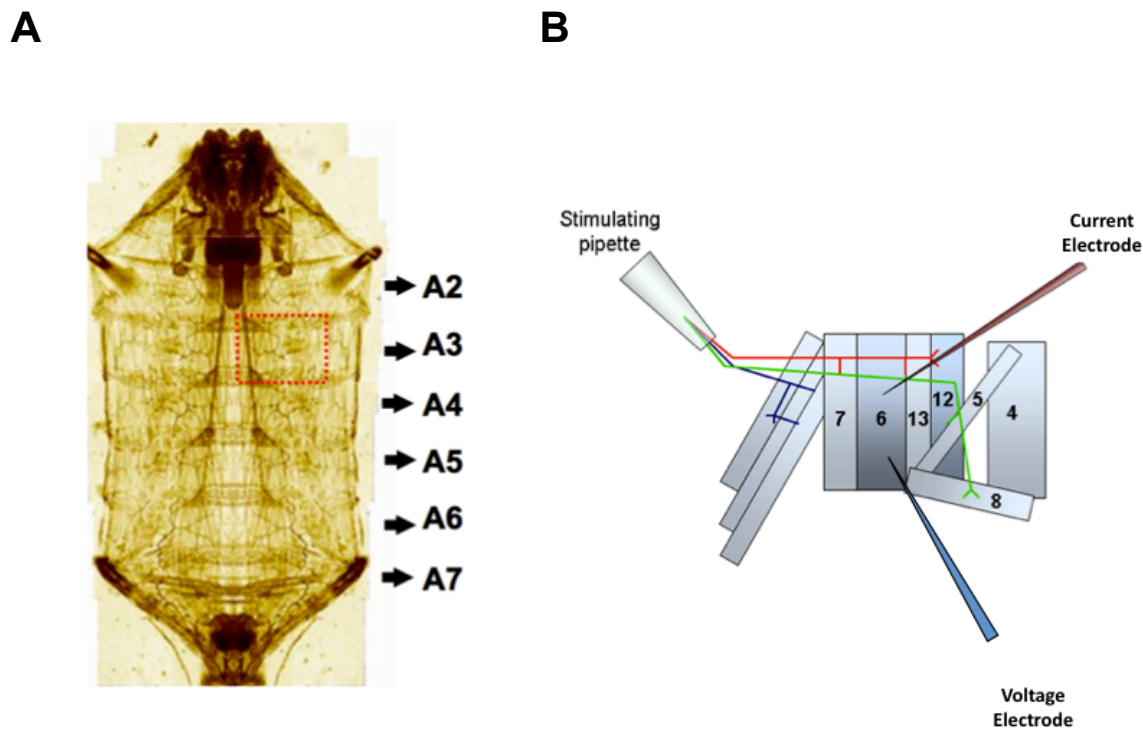
### **3.2.1. Cultivo y obtención de larvas de *Drosophila melanogaster***

Las líneas de moscas fueron crecidas en una habitación con temperatura controlada a 25°C, en un medio de harina de maíz estándar suplementado con levadura. El medio de cultivo contenía (en gramos): 10 agar, 60 sémola, 10 levadura, 43 sacarosa, 1.56 metil parabeno (nipagin), 4.2 NaNO<sub>3</sub>, 1.2 KHPO<sub>3</sub>, 0.57 KCl, 0.57 MgSO<sub>4</sub> y 0.0125 FeSO<sub>4</sub> por cada litro de agua bidestilada. Para la obtención óptima de larvas, se seleccionaron ~20 moscas con una semana de eclosión y se mantuvieron en un medio de cultivo fresco por una semana. Luego, las moscas fueron removidas al cabo de 1 semana. De cada vial se utilizaron las primeras larvas de tercer estadio por solo 2. Esto permitió obtener larvas saludables y libres de contaminación por excesiva sobrepoblación.

### **3.2.2. Registro de corrientes post-sinápticas miniatura**

Las corrientes excitatorias de juntura en miniatura (mEJCs) fueron registradas en los músculos longitudinales ventrales #6 del segmento abdominal A3 (Campos-Ortega y Hartenstein, 1985) (Fig 9A). Este músculo es uno de los más utilizados debido a su tamaño y accesibilidad, posee alrededor de 550 sitios activos contenidos sólo en tipos de terminales sinápticos Is y Ib (glutamatérgicos), entre los cuales no existen diferencias significativas en el tamaño cuántico (Atwood et al., 1993). Las larvas fueron disectadas en HL3 con 0.1 mM Ca<sup>+2</sup> y posteriormente puestas en HL3 0.2 mM Ca<sup>+2</sup> en presencia 100 nM del bloqueador de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje saxitoxina (SXT). Después de esto los nervios fueron cortados cerca del

ganglio ventral y se esperó 10 minutos antes de comenzar el registro. El potencial de reposo del músculo fue mantenido a  $-80$  mV. El electrodo de corriente se puso siempre en el centro de la fibra y el electrodo de Voltaje en el extremo a modo de mantener el máximo de control del potencial (Jan y Jan, 1976b) (Fig 9B). La duración de cada registro fue de 5 minutos



**FIGURA 9. Disección de la larva y posicionamiento de los electrodos de registro.**

**A)** Larva de *Drosophila* de tercer estadio. En la derecha se indican los segmentos. Se destaca en rojo la ubicación del músculo de trabajo. **B)** Posicionamiento de los electrodos de estimulación, corriente y voltaje para los registros electrofisiológicos en el músculo longitudinal ventral #6

### 3.2.3. Registro de corrientes post-sinápticas evocadas

Las corrientes excitatorias de junta evocadas (eEJCs) por la estimulación del nervio fueron registradas en los músculos longitudinales ventrales #6 del segmento abdominal A3 (Campos-Ortega y Hartenstein, 1985) (Fig 9A). Las larvas fueron

disectadas en HL3 con 0.1 mM  $\text{Ca}^{+2}$  y posteriormente puestas en HL3 0.2 mM  $\text{Ca}^{+2}$ . El potencial de reposo del músculo durante los registros fue mantenido a  $-80$  mV. El electrodo de corriente se puso siempre en el centro de la fibra y el electrodo de voltaje en el extremo a modo de mantener el máximo de control del potencial (Jan y Jan, 1976b) (Fig 9B). Para la estimulación, los nervios fueron cortados cerca del ganglio ventral 10 minutos antes de comenzar el registro. El nervio adecuado fue succionado con una pipeta de vidrio rellena con solución de registro. La estimulación se realizó dando 20 pulsos cuadrados de 0.1 ms de duración y 10 V de amplitud a una frecuencia de 0.5 Hz la que en estas condiciones no genera ningún tipo de plasticidad.

#### **3.2.4. Plasticidad sináptica**

Para evaluar en mayor profundidad la fisiología sináptica de los mutantes de *dlg* utilizamos diferentes paradigmas de estimulación para generar distintos fenómenos de plasticidad y determinar si están afectados o no. Para todos los paradigmas se utilizaron pulsos cuadrados de 0.1 ms de duración y 10 V de amplitud. Todos los paradigmas fueron programados utilizando el programa MATLAB (Mathworks, USA) y cargados via USB en el estimulador Master 8 (AMPI, Israel).

La estimulación pareada evalúa el cambio de eficacia sináptica que se produce entre dos estímulos consecutivos (Feng, 1941) (Fig 10A). Para esto, se realizan diferentes ensayos con una frecuencia en que el primer estímulo no sufre cambios sostenidos en la eficacia sináptica en los sucesivos ensayos. Este paradigma supone que el primer estímulo es capaz de producir un condicionamiento en la sinapsis que desaparece en el tiempo. Así, con el segundo estímulo la eficacia

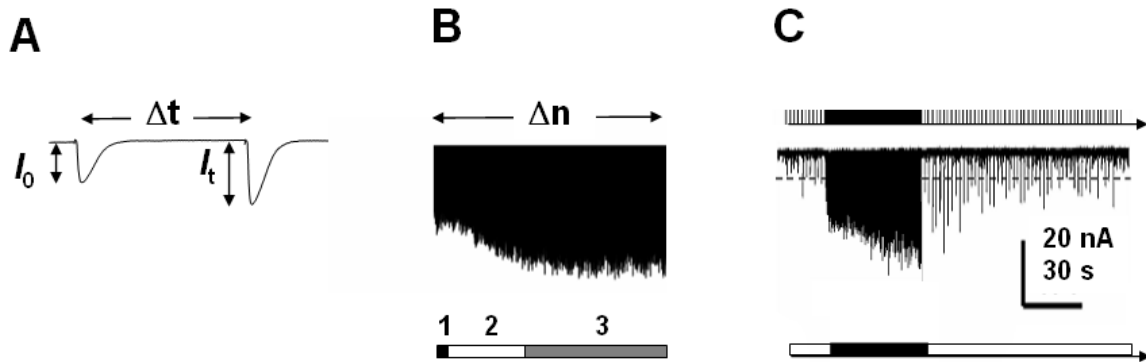


sináptica cambia si esta ocurre antes de que el condicionamiento sináptico desaparezca. Para investigar como desaparece este condicionamiento, se construyen diferentes ensayos variando el tiempo en que ocurre el segundo estímulo. Con esto es posible calcular el cambio de eficacia sináptica que ocurre en el segundo estímulo utilizando como control la respuesta al primer estímulo. Mediante la estimulación pareada es posible evaluar el curso temporal del condicionamiento sináptico que ocurre en una escala temporal entre milisegundos a segundos. Este paradigma constituye la forma más común de evaluar los fenómenos de plasticidad sináptica como facilitación y depresión. Para evaluar la plasticidad por pulsos pareados se estimuló el nervio en intervalos de 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 400, 800 y 1000 ms en solución HL3 modificado con 0.2 mM y 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$ , entre cada par de estímulos se espero 2 minutos para aplicar el siguiente. Se dieron 3 series completas de intervalos por registro.

La estimulación tetánica ha sido utilizada desde los inicios en la historia de la neurobiología. Su nombre se origina en el efecto de la toxina tetánica que produce una contracción sostenida del músculo de igual manera que cuando se estimula el nervio en la UNM, a alta frecuencia. La estimulación tetánica del nervio permite evaluar cambios de eficacia sináptica de manera sostenida desde el nivel inicial tales como: la facilitación tetánica rápida, lenta y de larga duración así como también, la depresión tetánica rápida, lenta y de larga duración. Es importante mencionar que algunos de estos cambios de eficacia sináptica son conocidos como *aumento* en el caso de la facilitación tetánica lenta, como *potenciación* en el caso de la facilitación de larga duración (Zucker y Regehr, 2002) (Fig 10B). Para la estimulación tetánica del nervio se aplicaron 150 estímulos a una frecuencia de 20 Hz en solución HL3

modificado con 0.2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  precedida por 10 estímulos a 0.5 Hz para determinar la amplitud basal de las EJC's.

Para determinar el grado de plasticidad sináptica post-tetánica es necesario determinar primero el nivel de eficacia pre-tetánica, es decir, antes del episodio condicionante. Para esto, se determina una frecuencia de estimulación de prueba definida como aquella que no produce cambios sostenidos en la eficacia sináptica. Con esto, comparando la respuesta pre-tetánica con la post-tetánica, es posible evaluar la *plasticidad sináptica post-tetánica*, definida como aquellos cambios de eficacia sináptica que perduran después de un período de estimulación prolongado . De esta manera es posible observar que la eficacia sináptica queda alterada durante un tiempo después del episodio de estimulación y que luego esta alteración retorna al nivel de prueba inicial (Zucker y Regehr, 2002) (Fig 10C). Para determinar el grado de plasticidad post-tetánica el paradigma de estimulación utilizado consto de 20 estímulos a una frecuencia de 0.5 Hz seguidos por 1000 estímulos a una frecuencia tetánica de 20Hz y finalmente 150 estímulos a 0,5 Hz en solución HL3 modificado con 0.2 mM  $\text{Ca}^{+2}$ .



**FIGURA 10. Paradigmas de estimulación.**

**A)** Protocolo de pulsos pareados variables. **B)** Estimulación prolongada para inducir los principales tipos de plasticidad sináptica de corta duración: facilitación tetánica rápida (1), lenta (2) y de larga duración (3) (panel superior) y depresión tetánica rápida (1), lenta (2) y de larga duración (3) (panel inferior). **C)** Paradigma de estimulación para inducir Potenciación Post-tetánica. El paradigma sobre cada registro se resume en el panel central compuesto por estímulos de 0.5Hz como frecuencia control (barra blanca) y de 20Hz como frecuencia condicionante (barra llena)

### 3.2.5. Dependencia de la liberación evocada al $\text{Ca}^{+2}$ extracelular

Siguiendo la huella de Katz y colaboradores, en la  $\text{UNM}_{\text{DL}}$  fueron establecidas las bases biofísicas de esta preparación, la naturaleza cuántica y su dependencia al  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (Jan y Jan, 1976b). Para evaluar si esta dependencia se ve diferencialmente afectada en los mutantes de ambas isoformas de DLG. Se midió la amplitud de los eEJCs para distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  en HL3. Para esto se estimuló la motoneurona a una frecuencia de 0.25 Hz y se registraron 10 EJCs para cada concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ . El cambio de las soluciones en la cámara de registro se realizó mediante un sistema de perfusión manual. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular que se utilizaron fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 y 2 mM en HL3 modificado.

### 3.2.6. Análisis de registros electrofisiológicos

Para la detección de los eventos sinápticos se utilizó el programa Clampfit 9.2 (Axon Instrument, USA). Para todos los registros antes del análisis se normalizó de forma manual la línea base para eliminar distorsiones por fluctuaciones. Posteriormente se aplicó un filtro digital de paso bajo Bessel de 8 polos con una frecuencia de corte de 600 Hz para eliminar ruidos indeseados. La detección de los mEJCs se hizo de forma manual y por inspección. La detección de las eEJCs se realizó de forma automática utilizando un criterio de selección umbral 5 veces mayor al ruido.

Para determinar el tamaño cuántico se realizaron histogramas de frecuencia según la amplitud de los mEJCs teniendo el cuidado de utilizar siempre el mismo tamaño de bin. Una vez hecho esto se promediaron los bin correspondientes para cada rango de amplitud y se generó un histograma promedio por cepa. Al histograma promedio se le ajustó una curva de distribución normal utilizando el programa Origin 7.5 (OriginLab, Corp, USA). El valor de la media de este ajuste se consideró como tamaño cuántico.

Para determinar el  $\tau$  de los mEJCs lo que se hizo fue seleccionar los mEJCs dentro del rango  $\mu \pm \sigma$  para cada cepa y calcular su  $\tau$  utilizando el programa Clampfit 9.2 los valores obtenidos fueron promediados.

Para calcular la facilitación y el aumento tetánico se utilizó el incremento sináptico fraccional ( $F_1$ ). Utilizando la siguiente fórmula (Zucker y Regehr, 2002):

$$F_1 = (I - I_0)/I_0$$

Donde ( $I_0$ ) es la amplitud basal de las EJC's a una frecuencia no condicionante (0.5 Hz) e ( $I$ ) corresponde a la amplitud de cada estímulo durante el tétano. Para determinar la facilitación y el aumento tetánico se ocupó un criterio de máximos relativos (segunda derivada) considerándose como facilitación y el aumento tetánico al primer y segundo máximo respectivamente. Una vez hecho esto se procedió a promediar 10 valores de  $F_1$  a partir de ese máximo.

Para determinar el aumento post-tetánico y la potenciación post-tetánica también se utilizó  $F_1$ . Los valores de  $F_1$  fueron ajustados a un modelo doble exponencial de la forma (Zucker y Regehr, 2002):

$$F_1 = PTA * \exp(-x/\tau_{PTA}) + PTP * \exp(-x/\tau_{PTP})$$

Para determinar los componentes de la facilitación por pulsos pareados se utilizó  $F_1$ . Pero en este caso el valor de  $F_1$  se calculó como (Zucker y Regehr, 2002):

$$F_1 = (I_2 - I_1)/I_1$$

Donde ( $I_1$ ) e ( $I_2$ ) corresponden a la amplitud del primer y segundo pulso respectivamente. Los valores de  $F_1$  fueron ajustados a un modelo doble exponencial de la forma (Zucker y Regehr, 2002):

$$F_1 = F_1 * \exp(-x/\tau_{F1}) + F_2 * \exp(-x/\tau_{F2})$$

Para determinar los componentes de la depresión por pulsos pareados se utilizó el decremento sináptico fraccional ( $F_D$ ). Utilizando la siguiente fórmula:

$$F_D = (I_1 - I_2)/I_1$$

Donde  $(I_1)$  e  $(I_2)$  corresponden a la amplitud del primer y segundo pulso respectivamente. Los valores de  $F_D$  fueron ajustados a un modelo doble exponencial de la forma:

$$F_D = D_1 * \exp(-x/\tau_{D1}) + D_2 * \exp(-x/\tau_{D2})$$

### 3.2.7. Inmunohistoquímica

Para las inmunohistoquímicas (IHQ) se utilizaron larvas de 3<sup>er</sup> estadio. Se tuvo cuidado de seleccionar aquellas que tuviesen movilidad, las que estaban quietas ya se consideraron en el estado de pre pupa por lo que fueron descartadas. Las larvas fueron cuidadosamente puestas en una placa de agar, luego se le agrego a esta PBS a 4°C para evitar la degradación del tejido. Se tomaron los pinchos y se colocaron en los extremos cefálico y caudal de la larva, dejándola bien estirada, luego con las tijeras se hizo un corte longitudinal entre las tráqueas. Después se dejaron solamente los músculos y el cerebro sacando todo lo que es sistema respiratorio y sistema digestivo. Una vez que la larva fue cortada se procedió a colocar cuatro pinchos adicionales, dos en la parte superior izquierda y derecha, y dos en la parte inferior izquierda y derecha, siempre se dejó la larva lo más estirada posible. Para finalizar con el proceso de disección se sacaron de manera meticulosa los restos de sistema digestivo, respiratorio que pudieran haber quedado pegados a los músculos.

Luego se procedió a fijar el tejido con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos, posteriormente se retiraron los pinchos y se colocaron las larvas en pocillos, se hicieron tres lavados cada 10 minutos con PT (PBS con Triton al 0.3%). El paso siguiente consistió en una incubación de 1 hora con 30 minutos a

temperatura ambiente en PT con BSA al 3% para bloquear interacciones inespecíficas del anticuerpo. La incubación con los anticuerpos primarios en PT, se realizó en constante agitación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se volvió a lavar con PT 3 veces por 10 minutos y se procedió a incubar con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo por dos horas a temperatura ambiente (23° C aprox.) y luego se volvió a lavar 3 veces por 10 minutos. Finalmente las larvas fueron montadas en un portaobjetos con Vectashield (Vector laboratories, USA) y guardadas a -20°C para la adquisición de las fotos.

### **3.2.8. Inmunohistoquímica con amplificación**

Para poder visualizar el canal de  $Ca^{+2}$  cacophony fue necesario utilizar un sistema de amplificación de la señal basado en tiramida. Para esto al protocolo antes descrito se le realizaron las siguientes modificaciones; después de la fijación se realizó una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente en PBS con  $H_2O_2$  al 3% para bloquear peroxidasas internas del tejido; la incubación con el anticuerpo primario se realizó en constante agitación durante 1 hora con 30 minutos a temperatura ambiente; se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 30 minutos a temperatura ambiente (23° C aprox.); después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PT y se incubó por 10 minutos con la solución de amplificación incluida en el Tyramide Signaling Amplification Kit (Invitrogen, USA). Finalmente se lavó 3 veces por 10 minutos con PT y se realizó una segunda IHQ para marcar los otros componentes de la sinapsis por esto se realizó el protocolo descrito anteriormente a partir del bloqueo de PT con BSA al 3%.

### **3.2.9. Microscopía**

Se tomaron Z stacks de las ramas sinápticas que inervan los músculos longitudinales ventrales #6 del segmento abdominal A3. Las imágenes fueron adquiridas cada 0,3  $\mu\text{m}$  en el plano Z utilizando un microscopio confocal espectral invertido Olympus FluoView FV 1000 (Center Valley, USA) con un lente objetivo de inmersión en aceite, Universal Plan Fluor Super Apochromatic 60X (Olympus, Center Valley, USA) con apertura numérica de 1.35. Los planos de las imágenes fluorescentes en 3 canales fueron adquiridas con un zoom digital de 4X, sin rotación de las imágenes utilizando el modo secuencial del microscopio y la función de KALMAN 4. Para todas las cepas se utilizaron los mismos parámetros de adquisición.

### **3.2.10. Análisis de imágenes**

Para mejorar la razón señal ruido, las imágenes crudas fueron deconvolucionadas utilizando el programa Huygens Scripting (Scientific Volume Imaging, Holanda) usando un algoritmo basado en el estimador de máxima probabilidad. Se usaron valores de señal intrínseca y ruido de fondo iguales para todas las fotos.

Para medir el área de los clústers de los receptores de glutamato GluRIII; de las zonas activas y del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  cacophony se tomaron los stacks de fotos y se les aplicó una proyección en Z en la máxima intensidad, posteriormente se establecieron los valores reales de la dimensión de las imágenes después con un zoom de 400% se eligieron 3 botones por cada foto, dando un total de 18 botones por cada cepa, finalmente se procedió a medir el área de los botones y de cada clúster de forma



manual con el programa imageJ (U. S. National Institutes of Health), delimitando así el ROI o la zona de interés. Se trató de ser cuidadoso de manera de aplicar los mismos criterios visuales para cada una de las imágenes. Todo esto se realizó utilizando un sistema de ciego simple.

### **3.2.11. Inmunoprecipitación**

Moscas adultas de las cepas CS y Elav-CAC1-GFP fueron colectadas, congeladas en nitrógeno líquido y pasadas a través de un tamiz para colectar solo las cabezas. Estas fueron lisadas en buffer RIPA 1X y del extracto total se utilizaron 5000 µg de proteína para cada inmunoprecipitación y 10 µg como input. El homogenizado de cabezas se mezcló con 25 µl de cuentas conjugadas con GFP-Trap (Chromotek, EEUU) y se le adicionó buffer RIPA para completar un volumen de 1 ml. Posteriormente las muestras fueron incubadas por 2 hrs. en rotación a 4°C y lavadas 4 veces en buffer RIPA por 10 min. La elución se realizó en 20 µl de buffer Laemmli por 15 min. Finalmente las muestras fueron analizadas por medio de Western blot.

### **3.2.12. Western blot**

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo por métodos estándares. Brevemente, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo fueron incubados a 4°C durante toda la noche con agitación. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rabanita (HRP) y se utilizaron en una dilución de 1:5000. Las

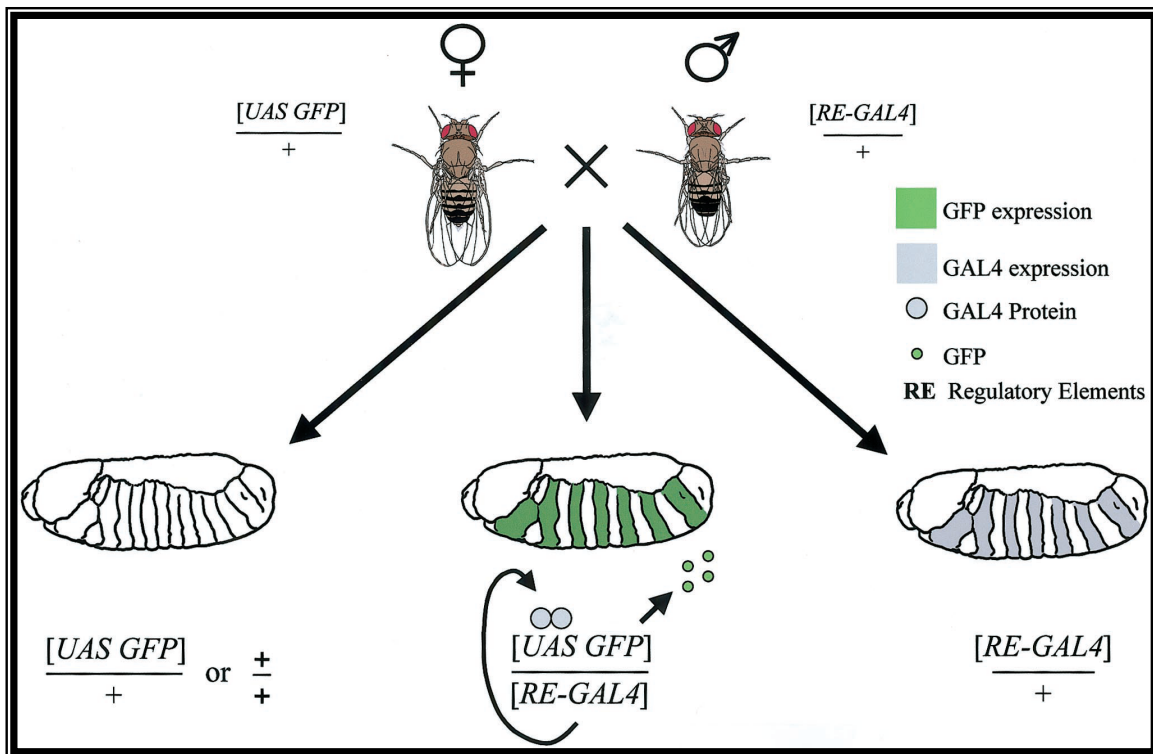
incubaciones con anticuerpos secundarios se realizaron durante 1-2 hrs a temperatura ambiente. La detección se se realizó mediante quimioluminiscencia por métodos estándares.

### **3.2.13. Manipulación de la expresión de las isoformas de *dlg* y del canal de $\text{Ca}^{+2}$ *cacophony***

La manipulación de la expresión de las isoformas de *dlg* y la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  *cacophony* se realizó utilizando el sistema UAS-Gal4. Este sistema se basa en el uso del factor transcripcional de levadura Gal4 y la secuencia activadora río arriba (UAS). En este método se utilizan 2 cepas de moscas transgénicas una de ellas portando el factor transcripcional Gal4 bajo la regulación de un promotor que puede ser general o tejido específico dependiendo del experimento, y otra cepa portando el gen que nos interesa expresar bajo la secuencia UAS (Brand y Perrimon, 1993). Cuando estas cepas se cruzan se produce la expresión del gen río abajo del UAS en la progenie. Esta expresión solo se producirá en los tejidos y momentos en el cual el promotor que regula la expresión de Gal4 este activo (Fig 11).

En este trabajo se utilizaron los constructos *C57-Gal4* (Packard et al., 2002), *OKA6-Gal4* (McCabe et al., 2003), y *Elav-Gal4* (Yannoni y White 1999) para inducir la expresión específica en músculo, motoneurona y pan-neuronal respectivamente.

Para la expresión presináptica de las isoformas de *dlg* se seleccionaron hembras *dlgS97<sup>5</sup>-OK6-Gal4* y *dlgA<sup>40.2</sup>-OK6-Gal4* las que se cruzaron con machos *UAS-dlgS97-EGFP* y *UAS-dlgA-EGFP* respectivamente. De esta cruce se seleccionaron larvas macho de 3<sup>er</sup> estadio que presentaran fluorescencia y con ellas se realizaron los experimentos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos.



**FIGURA 11. Sistema UAS-Gal4.**

Esquema representativo del uso del sistema UAS-Gal4 para la expresión tejido específica de la proteína GFP.

Para la expresión postsinápticos de las isoformas de *dlg* se seleccionaron hembras *dlgS97<sup>5</sup>-C57-Gal4* y *dlgA<sup>40.2</sup>-C57-Gal4* las que se cruzaron con machos *UAS-dlgS97-EGFP* y *UAS-dlgA-EGFP* respectivamente. De esta cruce se seleccionaron larvas macho de 3<sup>er</sup> estadio que presentaran fluorescencia y con ellas se realizaron los experimentos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos.

Para la disminuir la expresión pre y postsináptica de *dlg* se seleccionaron hembras *OK6-Gal4* y *C57-Gal4* respectivamente las que se cruzaron con machos *UAS-RNAi (dlg1)*. De esta cruce se seleccionaron indistintamente larvas macho o hembra de 3<sup>er</sup> estadio y con ellas se realizaron los experimentos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos.

Para la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $Ca^{+2}$  *cacophony* se seleccionaron hembras *dlgS97<sup>5</sup>-OK6-Gal4*, *dlgA<sup>40.2</sup>-OK6-Gal4*, *OK6-Gal4* y *Elav-Gal4* las que se cruzaron con machos *UAS-cac1-EGFP*. De esta cruce se seleccionaron larvas macho de 3<sup>er</sup> estadio que presentaran fluorescencia y con ellas se realizaron los experimentos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos.

#### **3.2.14. Presentación de los datos**

Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM (error promedio estándar). Para la comparación estadística se utilizó ANOVA seguido de un post-hoc de Tukey. El nivel de significancia se expresa como  $p <$  para cada caso particular. Los análisis y gráficos fueron generados mediante los programa Origin 7.5 (OriginLab, Corp, USA); DeltaGraph 7 (Red Rock Software, Inc., USA) y MATLAB (Mathworks, USA). Las figuras se generaron utilizando el programa Adobe PhotoShop CC ( Adobe Systems Software, Irlanda).

<b>Genotipo</b>	<b>Descripción</b>
<i>Canton-S (CS)</i>	Cepa control
<i>dlgS97<sup>5</sup></i>	Cepa mutante para <i>dlgS97</i>
<i>dlgA<sup>40.2</sup></i>	Cepa mutante para <i>dlgA</i>
<i>dlg<sup>XI-2</sup></i>	Cepa mutante para ambas isoformas de <i>dlg</i>
<i>dlgS97<sup>5</sup>/Def</i>	Cepa mutante para <i>dlgS97</i> sobre deficiencia del cromosoma X
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/Def</i>	Cepa mutante para <i>dlgA</i> sobre deficiencia del cromosoma X
<i>dlg<sup>XI-2</sup>/Def</i>	Cepa doble mutante sobre deficiencia del cromosoma X
<i>OK6-Gal4</i>	Driver de expresión en motoneuronas
<i>C57-Gal4</i>	Driver de expresión en músculo
<i>OK6-GAL4/UAS-RNAi-dlg</i>	Interferencia presináptica de <i>dlg</i>
<i>C57-GAL4/UAS-RNAi-dlg</i>	Interferencia postsináptica de <i>dlg</i>
<i>dlgS97<sup>5</sup>/OK6-Gal4</i>	Driver de expresión en motoneuronas en background mutante para <i>dlgS97</i>
<i>dlgS97<sup>5</sup>/C57-Gal4</i>	Driver de expresión en músculo en background mutante para <i>dlgS97</i>
<i>dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97</i>	Expresión presináptica de <i>dlgS97</i> en background mutante para <i>dlgS97</i>
<i>dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97</i>	Expresión postsináptica de <i>dlgS97</i> en background mutante para <i>dlgS97</i>
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-Gal4</i>	Driver de expresión en motoneuronas en background mutante para <i>dlgA</i>
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/C57-Gal4</i>	Driver de expresión en músculo en background mutante para <i>dlgA</i>
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA</i>	Expresión presináptica de <i>dlgA</i> en background mutante para <i>dlgA</i>
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA</i>	Expresión postsináptica de <i>dlgA</i> en background mutante para <i>dlgA</i>
<i>OK6-Gal4, UAS-CAC</i>	Expresión en motoneuronas de la subunidad $\alpha_1$ de cacophony
<i>Elav-Gal4, UAS-CAC</i>	Expresión pan-neuronal de la subunidad $\alpha_1$ de cacophony
<i>dlgS97<sup>5</sup>/OK6-Gal4, UAS-CAC</i>	Expresión en motoneuronas de la subunidad $\alpha_1$ de cacophony en background mutante para <i>dlgS97</i>
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-Gal4, UAS-CAC</i>	Expresión en motoneuronas de la subunidad $\alpha_1$ de cacophony en background mutante para <i>dlgA</i>

**TABLA 1. Sumario de las cepas de *Drosophila* utilizadas.**

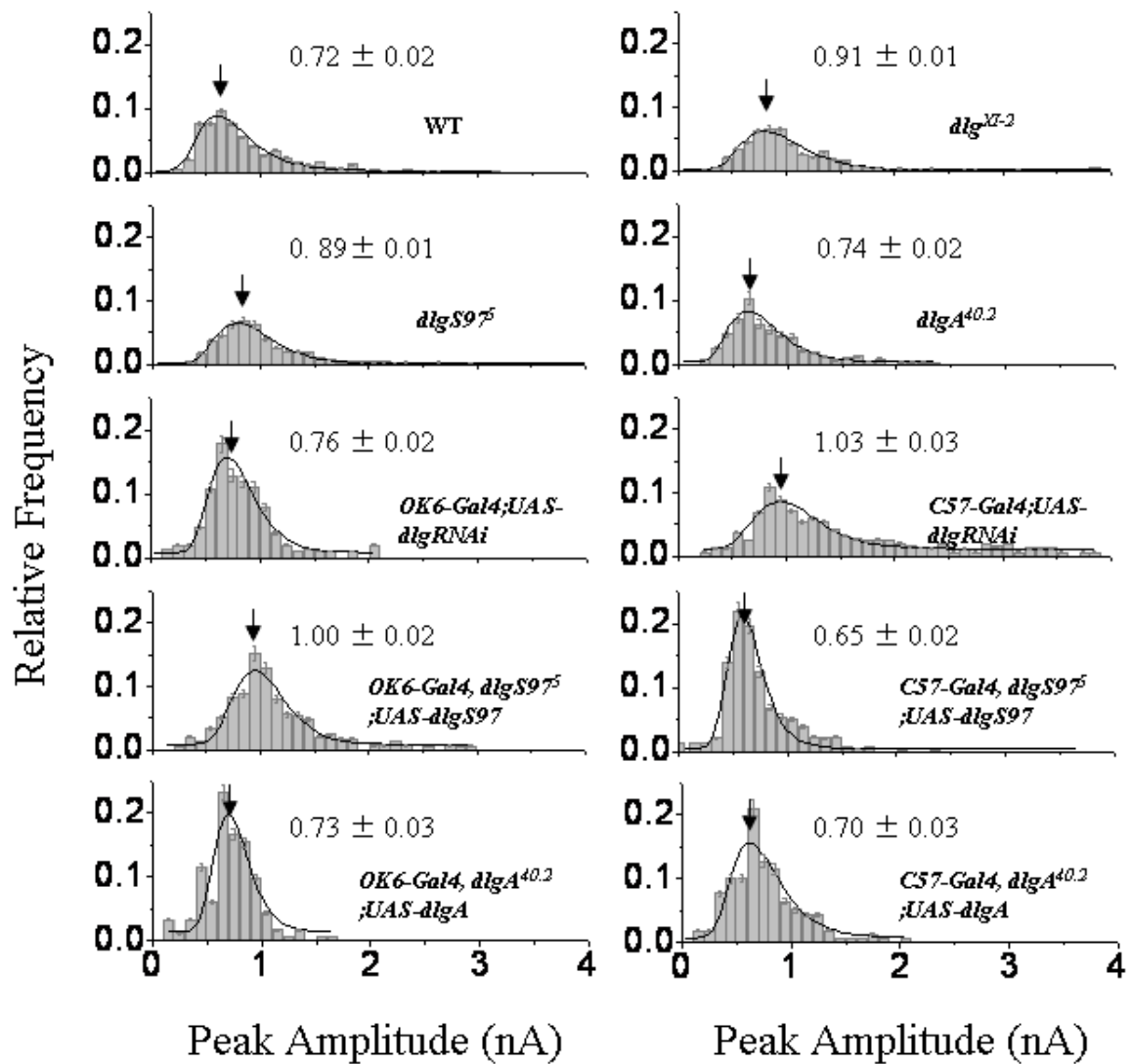
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Los mutantes *dlg<sup>XI-2</sup>* y *dlgS97<sup>5</sup>* poseen un mayor tamaño cuántico y cinéticas de decaimiento de las mEJCs más lentas

Para determinar el tamaño cuántico en la UNM, se registró la amplitud de las corrientes excitatorias de juntura en miniatura (mEJCs) en condiciones de baja probabilidad de liberación (0.2 mM Ca<sup>+2</sup> y en presencia de SXT) usando la técnica de pinzamiento de voltaje con dos electrodos (voltaje clamp). Se evaluó a larvas mutantes de *dlg* (*dlg<sup>XI-2</sup>*) y las mutantes isoforma específica *dlgS97<sup>5</sup>* y *dlgA<sup>40.2</sup>*.

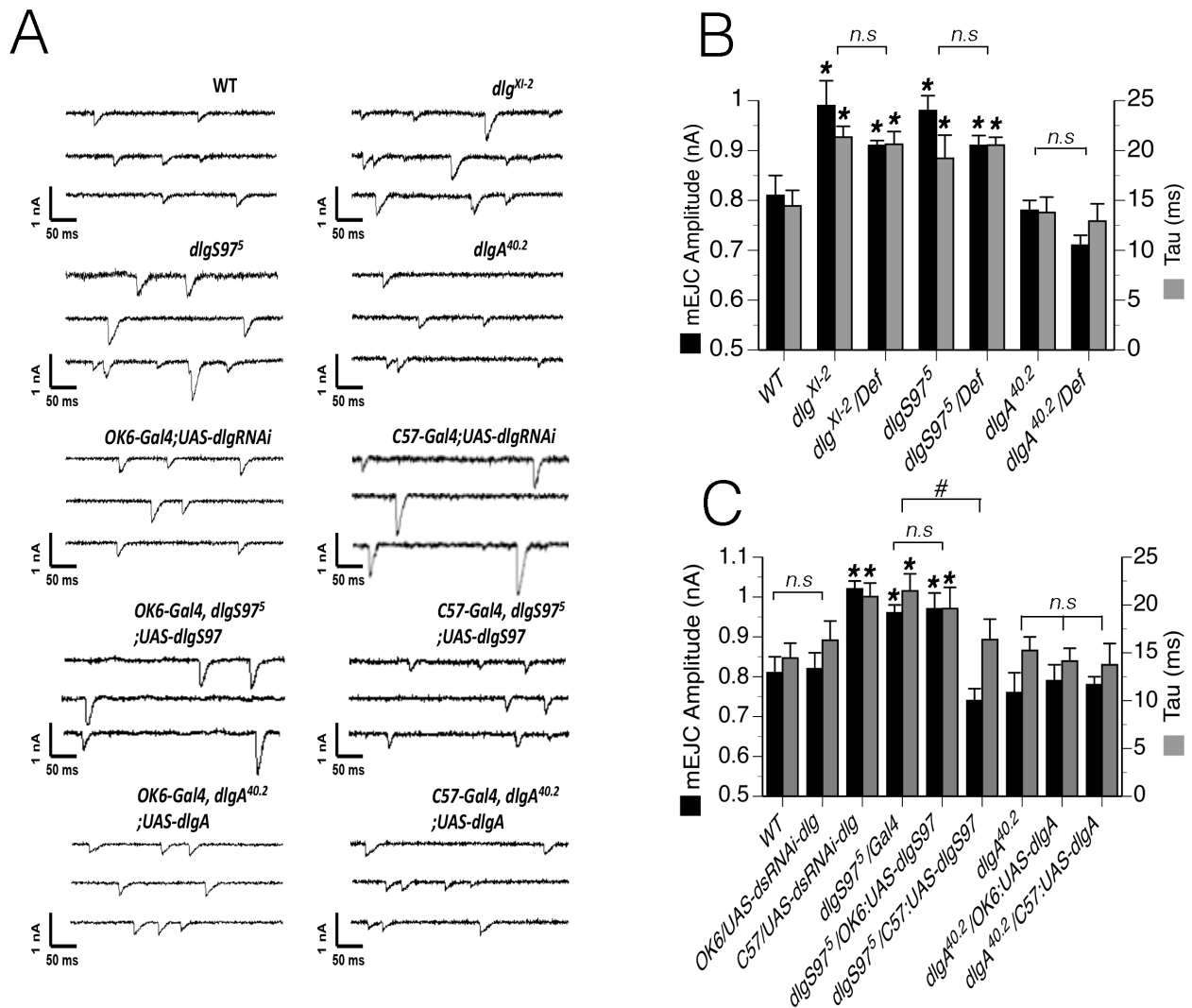
Los resultados obtenidos muestran que los mutantes *dlg<sup>XI-2</sup>* (0.91±0.01 nA) y *dlgS97<sup>5</sup>* (0.89±0.01 nA) presentan un tamaño cuántico mayor que el wild-type (0.72±0.02 nA) (p<0.05), pero no así el mutante *dlgA<sup>40.2</sup>* (0.74±0.01 nA) (Fig 12) (Fig 13A, B). Además al evaluar los mutantes sobre una deficiencia que incluye el locus *dlg* a manera de control, se encontraron diferencias significativas entre los respectivos mutantes y los mutantes sobre deficiencia (Fig 12) (Fig 13B), pero las cepas *dlg<sup>XI-2</sup>/Def* (0.91±0.02 nA) y *dlgS97<sup>5</sup>/Def* (0.91±0.01 nA) siguen siendo significativamente mayores al wild-type (0.72±0.02 nA) (Fig 12) (Fig 13B) (p<0.05).

Junto con evaluar el tamaño cuántico de las mEJCs medimos su cinética de decaimiento o  $\tau_{off}$  ya que cambios en este nos pueden indicar posibles modificaciones en el tipo o contenido relativo de receptores de glutamato, que como se mencionó anteriormente en la UNM<sub>DL</sub> pueden ser de 2 tipos; DGluRIIA y DGluRIIB los que poseen características distintivas (DiAntonio et al 1999). Al igual que en el caso anterior tanto los mutantes *dlg<sup>XI-2</sup>* (21.34±1.09 ms) y *dlgS97<sup>5</sup>* (19.22±2.32 ms)



**FIGURA 12: Histogramas de frecuencia de las mEJCs en mutantes *dlg*.**

Histograma promedio de frecuencia de los mEJCs para cada genotipo. La flecha indica el Peak de la distribución usado como tamaño cuántico  $\pm$  SD.



**FIGURA 13: Análisis de las mEJCS en mutantes *dlg*.**

**A)** Trazos representativos de los mEJCS para cada genotipo. **B)** Tamaño cuántico (barras negras) y  $\tau_{off}$  (barras grises) de los mEJCS para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT; n.s., no significativo. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  en presencia de 100 nM de Saxitoxina.  $n=6$  **C)** Tamaño cuántico (barras negras) y off tau (barras grises) de los mEJCS para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT; (#)  $p < 0.05$  comparado entre si; n.s., no significativo. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  en presencia de 100 nM de Saxitoxina.  $n=6$



como sus respectivos controles sobre la deficiencia (*dlg<sup>XI-2</sup>/Def*, 20.63±0.78 ms; *dlgS97<sup>5</sup>/Def*, 20.54±1.26 ms) presentan un  $\tau_{\text{off}}$  mayor al wild-type (14.45±1.56 ms) ( $p < 0.05$ ), pero no así el mutante *dlgA<sup>40.2</sup>* (13.78±1.55 ms) ni su control (*dlgA<sup>40.2</sup>/Def*, 12.92±1.73 ms) (Fig 13B).

Para determinar si este fenotipo se debe a alteraciones pre o postsinápticas utilizamos el sistema UAS-GAL4 para interferir el gen *dlg* presinápticamente mediante la expresión en la motoneurona de un RNA de doble hebra dirigido contra el gen *dlg* (*OK6-GAL4/UAS-RNAi-dlg*) y postsinápticamente (*C57-GAL4/UAS-RNAi-dlg*). Lo que encontramos fue que sólo la interferencia postsináptica de *dlg* produce mEJCs de mayor tamaño (1.03±0.03 nA) y no así la presináptica (0.76±0.02 nA) (Fig 12) (Fig 13A, C) ( $p < 0.05$ ). Además, y como era de esperarse, sólo la interferencia postsináptica produce un incremento en la cinética de decaimiento de las mEJCs (21.47±1.42 ms) y no la presináptica (16.31±2.01 ms) (Fig 13C) ( $p < 0.05$ ).

También evaluamos si la expresión pre y postsináptica de las isoformas de *dlg* logran rescatar el fenotipo antes descrito. Para esto, haciendo uso del sistema UAS-GAL4 indujimos la expresión presináptica (*dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97* y *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*) y postsináptica (*dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97* y *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*) de las isoformas de *dlg* sobre sus respectivos mutantes. Lo que se encontró fue que sólo la expresión postsináptica de *dlgS97* logra rescatar tanto el tamaño cuántico de las mEJCs (0.65±0.03 nA) como el  $\tau_{\text{off}}$  (16.38±2.13 ms) y no la expresión presináptica (1.00±0.02 nA; 22.62±2.22 ms) (Fig 12) (Fig 13A, C) ( $p < 0.05$ ). Por otra parte ni la expresión pre (0.73±0.01 nA; 14.13±1.34 ms) o postsináptica de *dlgA*

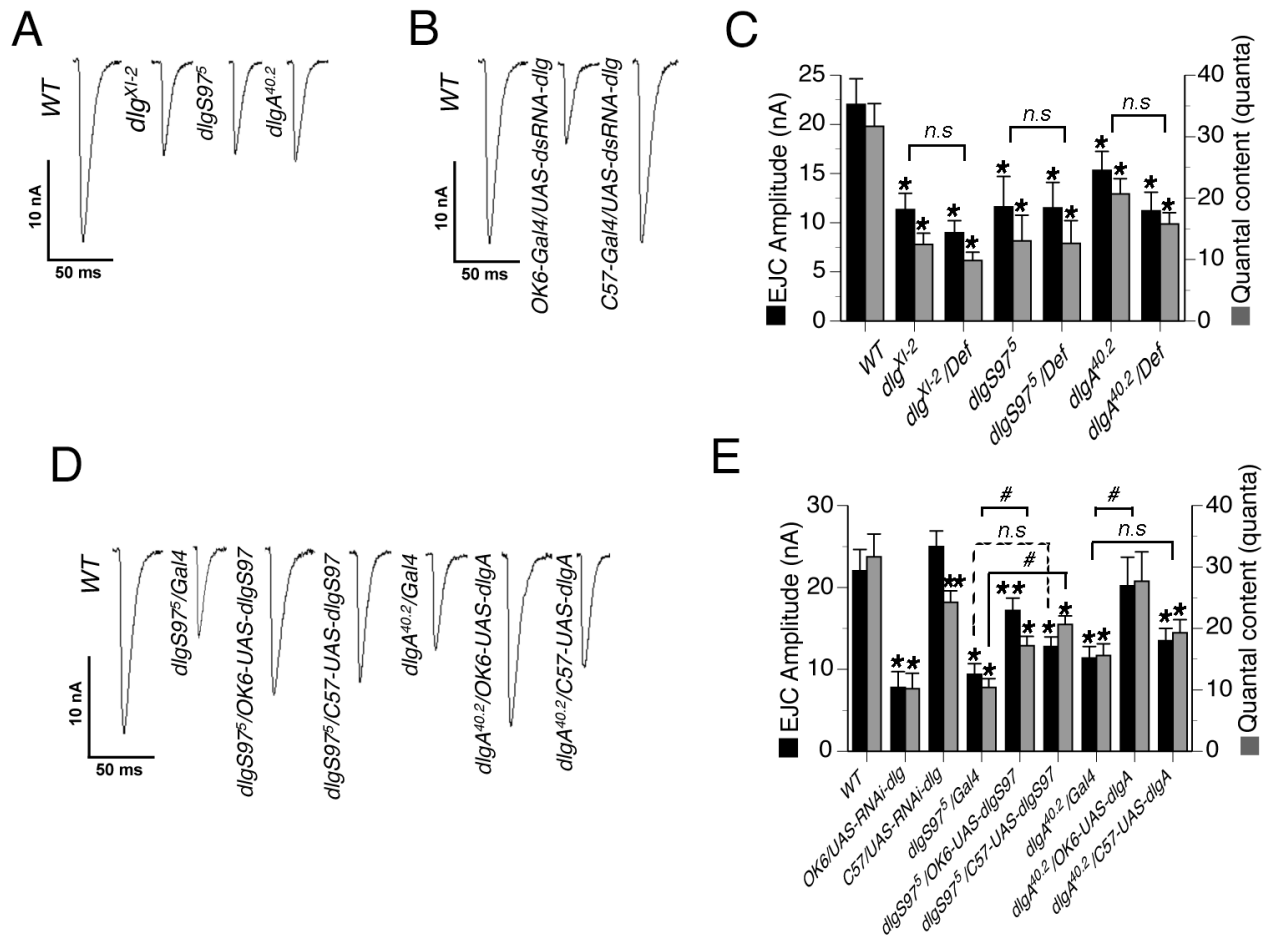
( $0.70 \pm 0.02$  nA;  $13.74 \pm 2.23$  ms) poseen efecto alguno en el tamaño cuántico ni la cinética de decaimiento de las mEJCs (Fig 12) (Fig 13A, C).

En conjunto estos datos indican que sólo la isoforma *dlgS97* posee un rol en la regulación del tamaño cuántico y no así la isoforma *dlgA*. Además este efecto sería mediado por un mecanismo principalmente postsináptico.

#### 4.2. Los mutantes de *dlg* presentan eEJCs más pequeñas en baja concentración $\text{Ca}^{+2}$

Para evaluar si las eEJCs se encuentran alteradas en los mutantes de *dlg* realizamos registros electrofisiológicos utilizando una concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular de 0.2 mM. Encontramos que todos los mutantes (*dlg*<sup>XI-2</sup> 11.33±1.6 nA; *dlgS97*<sup>5</sup> 9.41±1.3 nA; *dlgA*<sup>40.2</sup> 15.33±3.1 nA) presentan eEJCs de amplitudes más pequeñas que el wild-type (22.04±2.6 nA) (Fig 14 A, C) (p<0.05). Además todas poseen un contenido cuántico (numero de cuántos liberados) menor que el wild-type (31.87±3.7) (*dlg*<sup>XI-2</sup> 12.45±1.8; *dlgS97*<sup>5</sup> 13.03±1.3; *dlgA*<sup>40.2</sup> 20.87±4.1) (Fig 14 C) (p<0.05). Como control también registramos las eEJCs de los mutantes *dlg* sobre una deficiencia que incluye el locus *dlg* (ver materiales y métodos) y estos al igual que los mutantes presentan eEJCs (*dlg*<sup>XI-2</sup>/*Def* 8.97±1.7 nA; *dlgS97*<sup>5</sup>/*Def* 11.5±2.1 nA; *dlgA*<sup>40.2</sup>/*Def* 11.2±1.63 nA) y contenidos cuánticos menores (*dlg*<sup>XI-2</sup>/*Def* 9.85±1.8; *dlgS97*<sup>5</sup>/*Def* 12.83±2.1; *dlgA*<sup>40.2</sup>/*Def* 15.77±2.29) (Fig 14 C) (p<0.05).

Para determinar si este fenotipo se debe a alteraciones pre o postsinápticas utilizamos el sistema UAS-GAL4 para interferir el gen *dlg* presinápticamente (*OK6-GAL4/UAS-RNAi-dlg*) y postsinápticamente (*C57-GAL4/UAS-RNAi-dlg*). Lo que encontramos fue que sólo la interferencia presináptica de *dlg* produce eEJCs de menor tamaño (7.8±1.9 nA) (Fig 14 B, C) (p<0.05) pero ambas interferencias tanto la presináptica (10.2±2.5) como la postsináptica (24.27±1.8) generan contenidos cuánticos menores (Fig 14 C) (p<0.05).



**FIGURA 14: Análisis de las eEJCs en mutantes *dlg*.**

**A)** Trazos representativos de los eEJCS para cada mutante. **B)** Trazos representativos de los eEJCS para la interferencia presináptica (*OK6-Gal4/UAS-dsRNA-dlg*) y postsináptica (*C57-Gal4/UAS-dsRNA-dlg*) de *dlg*. **C)** Amplitud (barras negras) y contenido cuántico (barras grises) de las EJCS para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  con una estimulación de 10 V a 0.5 Hz. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT; n.s., no significativo.  $n = 6$ . **D)** Trazos representativos de los eEJCS para los rescates presináptica (*dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97* y *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*) y postsinápticos (*dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97* y *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*) de cada mutante. **E)** Amplitud (barras negras) y contenido cuántico (barras grises) de las eEJCS para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  con una estimulación de 10 V a 0.5 Hz. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT; (\*\*)  $p < 0.01$  comparado WT; (#)  $p < 0.05$  comparado entre ellos; n.s., no significativo.  $n = 6$

Otro aspecto que evaluamos es si la expresión pre y postsináptica de las isoformas de *dlg* logran rescatar el fenotipo antes descrito. Para esto y nuevamente haciendo uso del sistema UAS-GAL4 indujimos la expresión presináptica (*dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97* y *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*) y postsináptica (*dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97* y *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*) de las isoformas de *dlg* sobre sus respectivos mutantes. Encontramos que sólo la expresión presináptica de *dlgA* logra rescatar tanto la amplitud de las eEJCs ( $20.24 \pm 3.5$  nA) como el contenido cuántico ( $27.77 \pm 4.8$ ), pero no la postsináptica ( $13.5 \pm 1.5$  nA;  $19.28 \pm 2.1$ ) (Fig 14 D, E) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado la expresión presináptica de *dlgS97* rescata parcialmente tanto la amplitud de las eEJCs ( $17.2 \pm 1.5$  nA) como el contenido cuántico ( $17.4 \pm 1.5$ ) (Fig 14 D, E) ( $p < 0.05$ ) mientras que la expresión postsináptica de *dlgS97* sólo rescata parcialmente el contenido cuántico ( $20.64 \pm 1.4$ ), pero no así la amplitud de las eEJCs ( $12.8 \pm 1.2$  nA) (Fig 14 D, E).

En conjunto estos datos indican que además de presentar un efecto postsináptico *dlg* posee un rol presináptico, para el cual y a diferencia de lo visto anteriormente es necesaria la participación de ambas isoformas.

### 4.3. Los mutantes de *dlg* presentan alteraciones en las zonas activas y en los campos de receptores de glutamato

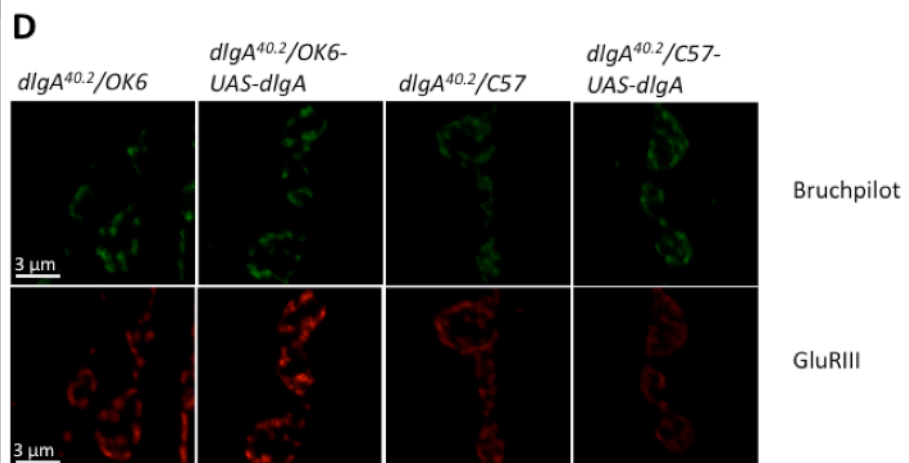
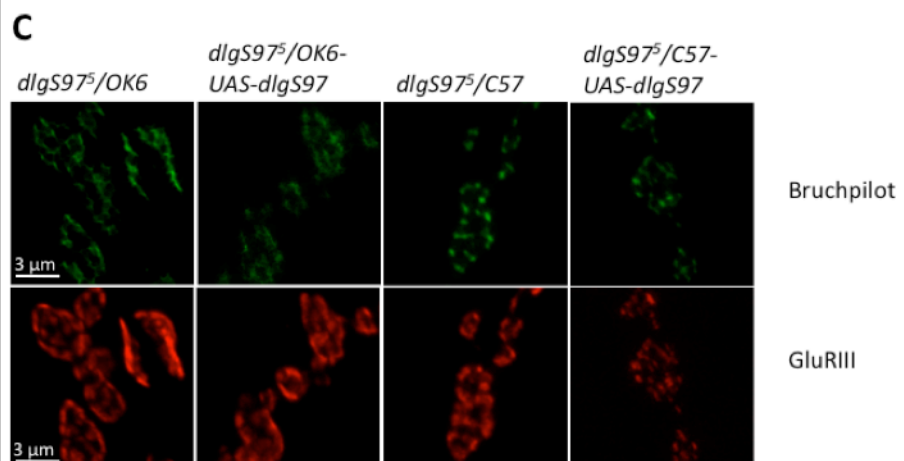
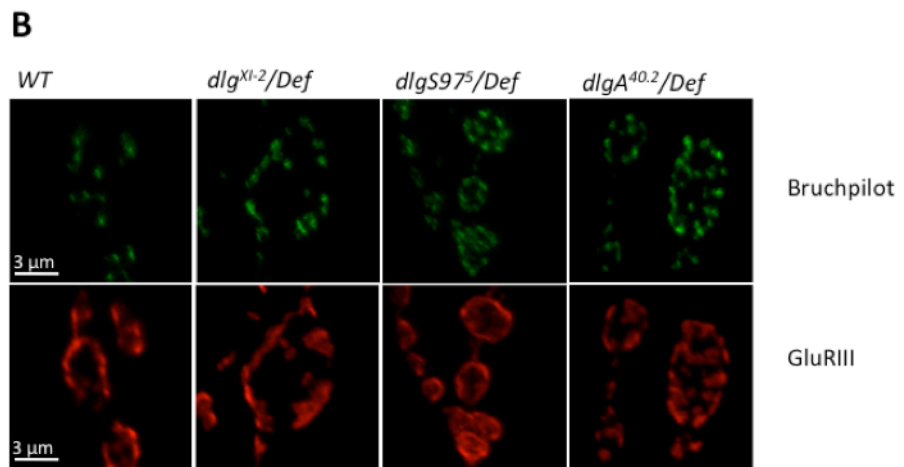
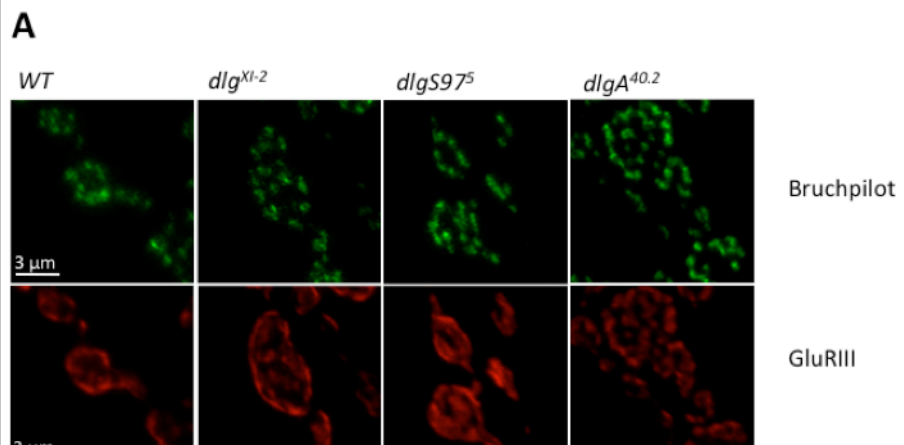
Para determinar si los mutantes de *dlg* presentan alteraciones morfológicas que puedan dar cuenta de las anomalías en la transmisión sináptica antes descritas, decidimos evaluar la estructura sináptica de los mutantes por medio de inmunohistoquímica. Para esto utilizamos el terminal nervioso de los músculos longitudinales ventrales #6 del segmento abdominal A3 analizando la organización de los receptores de glutamato y de las zonas activas (ZA), componentes clave para la fisiología sináptica. Esto lo hicimos por medio de la utilización de anticuerpos específicos para la subunidad DGluRIII y la proteína Bruchpilot. La subunidad DGluRIII es una subunidad esencial para los receptores de glutamato ionotrópicos y se encuentra presente en todos los tipos de receptores presentes en *Drosophila* (IIA y IIB) (Marrus et al 2004) de forma que nos permite visualizar la totalidad de los receptores en el terminal, esto sin permitirnos diferenciar entre subtipos. Por otra parte la proteína Bruchpilot es ampliamente utilizada por su localización altamente específica en las ZAs razón por la cual su marcaje es considerado como el estándar.

Los resultados muestran que sólo los mutantes *dlg*<sup>XI-2</sup> y no los mutantes *dlgS97*<sup>5</sup> o *dlgA*<sup>40.2</sup> presentan botones sinápticos de mayor tamaño (WT 7.92±1.75  $\mu\text{m}^2$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup> 15.88±2.01  $\mu\text{m}^2$ ; *dlgS97*<sup>5</sup> 9.74±1.84  $\mu\text{m}^2$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup> 9.6±1.3  $\mu\text{m}^2$ ) (Fig 15A y 16C) ( $p < 0.01$ ) esto está en concordancia con resultados previamente publicados (Mendoza-Topaz et al., 2008). Además encontramos que todos los mutantes presentan un mayor número de ZAs por botón (WT 9.22±1.22; *dlg*<sup>XI-2</sup> 15.34±1.16; *dlgS97*<sup>5</sup> 13.67±0.73; *dlgA*<sup>40.2</sup> 12.73±0.84) (Fig 15A y 16B) ( $p < 0.01$ ). También se

determino que sólo los mutantes  $dlg^{XI-2}$  y  $dlgA^{40.2}$  presentan ZAs más grandes (WT  $0.13\pm 0.018 \mu\text{m}^2$ ;  $dlg^{XI-2}$   $0.23\pm 0.02 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgS97^5$   $0.1\pm 0.04 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgA^{40.2}$   $0.21\pm 0.02 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15A y 16C) ( $p < 0.01$ ) y en contraparte sólo los mutantes  $dlgS97^5$  y  $dlg^{XI-2}$  poseen campos de receptores de glutamato de mayor tamaño (WT  $0.32\pm 0.09 \mu\text{m}^2$ ;  $dlg^{XI-2}$   $0.81\pm 0.11 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgS97^5$   $0.67\pm 0.12 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgA^{40.2}$   $0.35\pm 0.07 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15A y 16A) ( $p < 0.01$ ).

A manera de control, evaluamos los mutantes sobre una deficiencia que incluye el locus *dlg* y no encontramos diferencia significativa entre los respectivos mutantes y los mutantes sobre deficiencia ni en el tamaño de botones sinápticos ( $dlg^{XI-2}/Def$   $17.23\pm 2.45 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgS97^5/Def$   $9.03\pm 1.78 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgA^{40.2}/Def$   $7.46\pm 1.77 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15B y 16C), ni en el número de ZAs por botón ( $dlg^{XI-2}/Def$   $16.02\pm 1.16$ ;  $dlgS97^5/Def$   $14.22\pm 1.12$ ;  $dlgA^{40.2}/Def$   $12.25\pm 0.72$ ) (Fig 15B y 16B), ni en el tamaño de las ZAs ( $dlg^{XI-2}/Def$   $0.25\pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgS97^5/Def$   $0.14\pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgA^{40.2}/Def$   $0.24\pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15B y 16C), ni en el tamaño de los campos de receptores de glutamato ( $dlg^{XI-2}/Def$   $0.73\pm 0.07 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgS97^5/Def$   $0.69\pm 0.08 \mu\text{m}^2$ ;  $dlgA^{40.2}/Def$   $0.31\pm 0.08 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15B y 16A).

También evaluamos si la expresión pre y postsináptica de las isoformas de *dlg* logran rescatar el fenotipo antes descrito. Para esto, haciendo uso del sistema UAS-GAL4 indujimos la expresión presináptica ( $dlgS97^5/OK6-UAS-dlgS97$  y  $dlgA^{40.2}/OK6-UAS-dlgA$ ) y postsináptica ( $dlgS97^5/C57-UAS-dlgS97$  y  $dlgA^{40.2}/C57-UAS-dlgA$ ) de las isoformas de *dlg* sobre sus respectivos mutantes. Lo que encontramos fue que sólo la expresión postsináptica de *dlgS97* logra rescatar el tamaño de los campos de





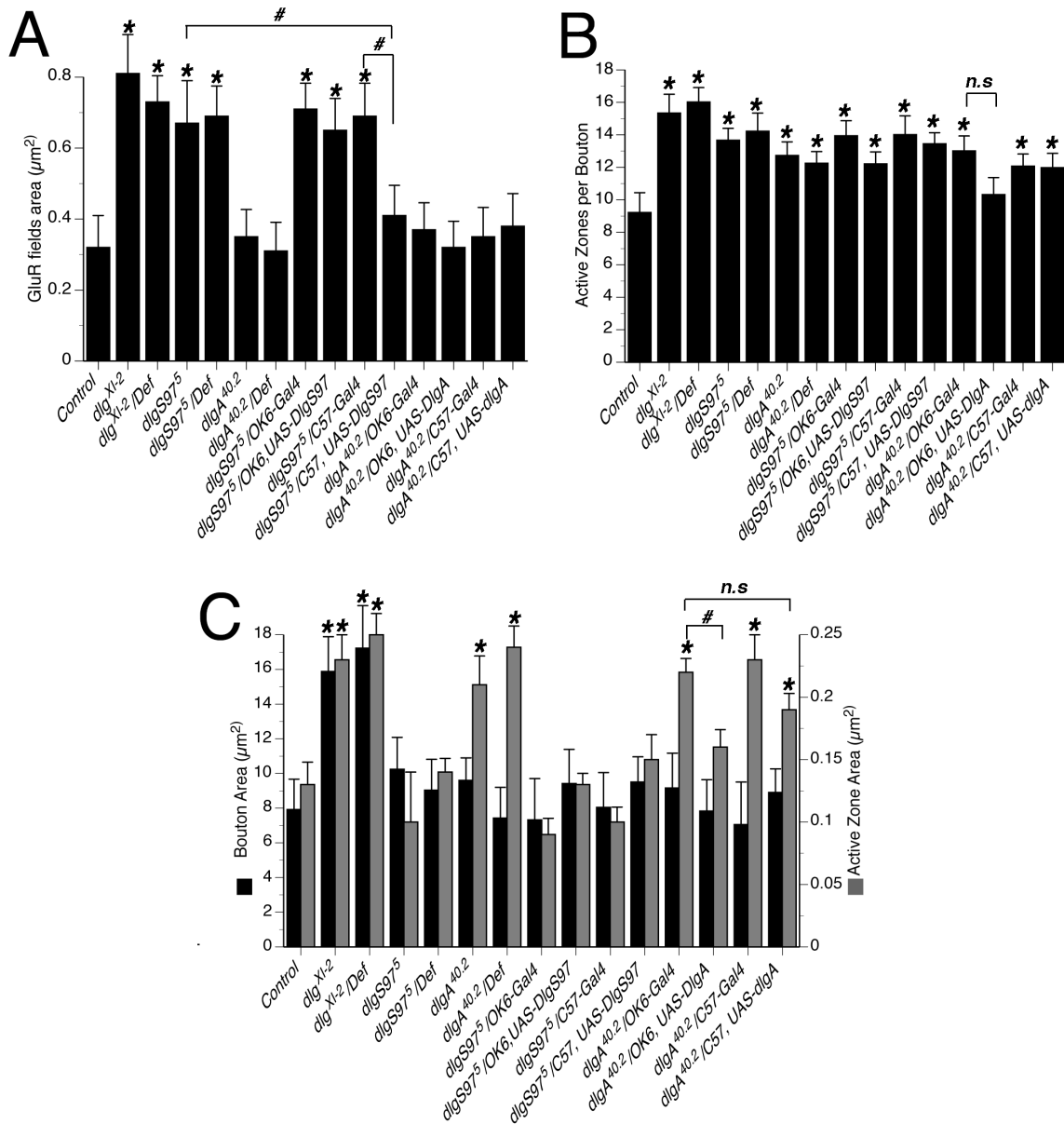
Página anterior

**FIGURA 15. Morfología de botones sinápticos en mutantes *dlg*.**

Inmunofluorescencia usando  $\alpha$ -GluRIII (rojo) y  $\alpha$ -Nc82 (verde, zonas activas) de botones sinápticos en el músculo 6 del segmento abdominal 3 en larvas de tercer estadio para las mutantes de *dlg* (A), mutantes de *dlg* sobre deficiencia (B) rescates pre y postsináptico de *dlgS97* y sus respectivos controles. (C) rescates pre y postsináptico de *dlgA* y sus respectivos controles.

receptores de glutamato ( $0.41 \pm 0.85 \mu\text{m}^2$ ) y no la presináptica ( $0.65 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15C y 16A) ( $p < 0.05$ ). Por otra parte ni en el tamaño de botones sinápticos (*dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97*  $9.42 \pm 1.97 \mu\text{m}^2$ ; *dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97*  $9.51 \pm 1.45 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15C y 16C), ni en el número de ZAs por botón (*dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97*  $12.21 \pm 0.74$ ; *dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97*  $13.45 \pm 0.68$ ) (Fig 15C y 16B), ni en el tamaño de las ZAs (*dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97*  $0.13 \pm 0.009 \mu\text{m}^2$ ; *dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97*  $0.15 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15C y 16C), parecen verse afectadas por la expresión presináptica o postsináptica de *dlgS97*.

También encontramos que la expresión presináptica de *dlgA* rescata tanto el tamaño de las ZAs (*dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*  $0.16 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*  $0.20 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15D y 16C) ( $p < 0.05$ ) como el número de ZAs por botón (*dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*  $9.72 \pm 1.05$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*  $12.25 \pm 0.88$ ) (Fig 15D y 16B) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado ni el tamaño de los botones sinápticos (*dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*  $7.83 \pm 1.81 \mu\text{m}^2$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*  $8.9 \pm 1.36 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 15D y 16C) ni el tamaño de los campos de receptores de glutamato (*dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA*  $0.32 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA*  $0.38 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ ) (Fig 8D, 9D y 10A) se ven afectados por la expresión pre o postsináptica de *dlgA*.



**FIGURA 16. Análisis morfológico de botones sinápticos en mutantes *dlg*.**

**A)** Área de los campos de receptores de glutamato para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.01$  comparado WT. (#)  $p < 0.01$  comparado entre ellos. n.s., no significativo.  $n = 6$ . **B)** Numero de zonas activas por botón para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.01$  comparado WT. n.s., no significativo.  $n = 6$ . **C)** Área de botón (barras negras) y zonas activas (barras grises) para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.01$  comparado WT. (#)  $p < 0.01$  comparado entre ellos. n.s., no significativo.  $n = 6$ .

#### **4.4. Los mutantes de *dlg* presentan una mayor plasticidad sináptica inducida por estimulación tetánica**

La estimulación tetánica ha sido utilizada desde los inicios de la neurofisiología y su nombre tiene origen en el efecto de la toxina tetánica, la que produce una contracción sostenida del músculo similar a la producida por la estimulación de la motoneurona a alta frecuencia. Este tipo de estimulación ha sido ampliamente utilizado ya que permite evaluar cambios de eficacia sináptica de manera sostenida tales como: la facilitación tetánica rápida y lenta también conocidos como facilitación tetánica y aumento tetánico respectivamente (Zucker y Regehr, 2002). Se cree que ambas formas de plasticidad se deben a un aumento en la concentración del  $Ca^{+2}$  residual en el terminal presináptico que persiste después de la estimulación del nervio (Kamiya y Zucker., 1994).

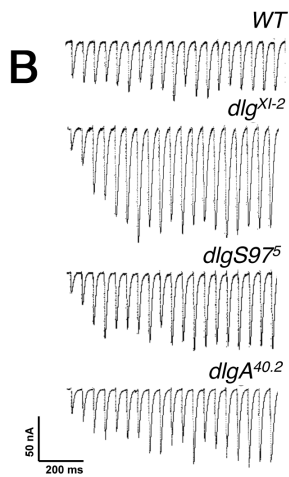
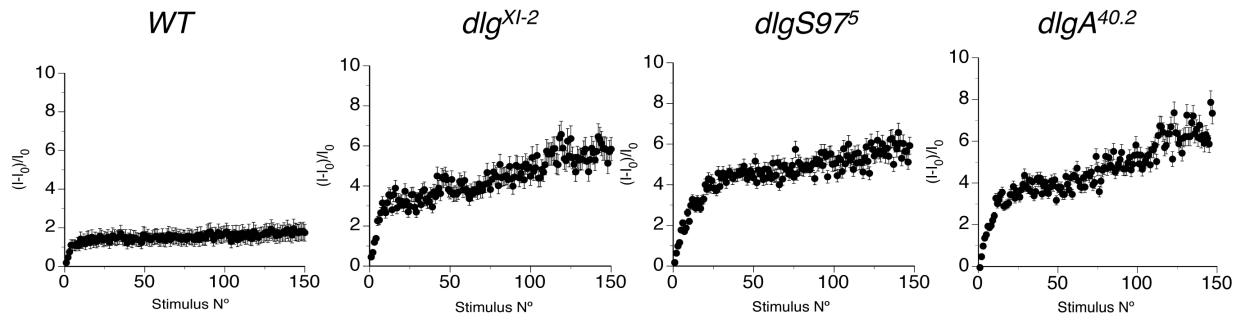
En la UNM<sub>DL</sub> tanto la facilitación como el aumento tetánico han sido observadas al realizar estimulación de alta frecuencia en bajas concentraciones de  $Ca^{+2}$  extracelular, (Zhong y Wu, 1991; Delgado et al., 1992, 1994, 2000 ;Wu et al., 2005).

Para evaluar si la plasticidad sináptica por estimulación tetánica en los mutantes de *dlg* esta alterada, se dieron 150 estímulos a 20 Hz precedidos por 10 estímulos a 0.5 Hz para poder determinar la amplitud basal de las eEJCs ( $I_0$ ) y de esta forma poder calcular el incremento sináptico fraccional, con la siguiente formula:

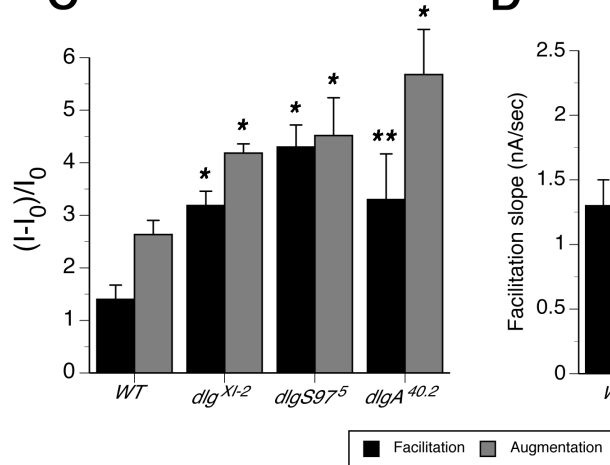
$$(I - I_0)/I_0$$

donde (I) corresponde a la amplitud de cada estímulo durante el tétano. (Delgado et al., 1992, 1994, 2000)

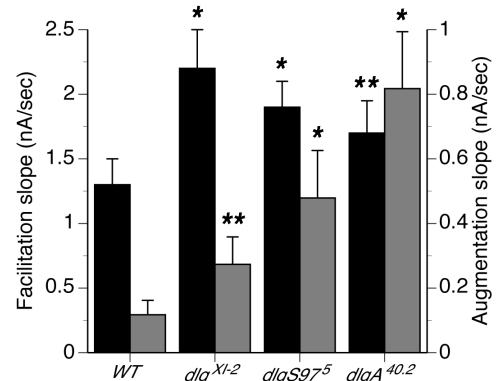
**A**



**C**



**D**



**FIGURA 17: Plasticidad sináptica por estimulación tetánica en mutantes *dlg*.**

**A)** Incremento fraccional promedio de las eEJCs para cada genotipo durante la estimulación tetánica (20 Hz). **B)** Registro característico en el comienzo del tétano para cada genotipo. **C)** Facilitación tetánica (barras negras) y aumento tetánico (barras grises) para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  dando 150 estímulos de 10 V a 20 Hz. (\*) $p<0.01$  comparado WT; (\*\*) $p<0.05$  comparado WT;  $n=6$ . **D)** Pendiente facilitación (barras negras) y pendiente aumento tetánico para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  dando 150 estímulos de 10 V a 20 Hz. (\*)  $p<0.05$  comparado WT; (\*\*)  $p<0.01$  comparado WT;  $n=6$ .

Lo que encontramos fue que todos los mutantes de *dlg* presentan un incremento tanto en la facilitación tetánica (*dlg<sup>X1-2</sup>*  $3.18\pm 0.27$ ; *dlgS97<sup>5</sup>*  $4.31\pm 0.41$ ;

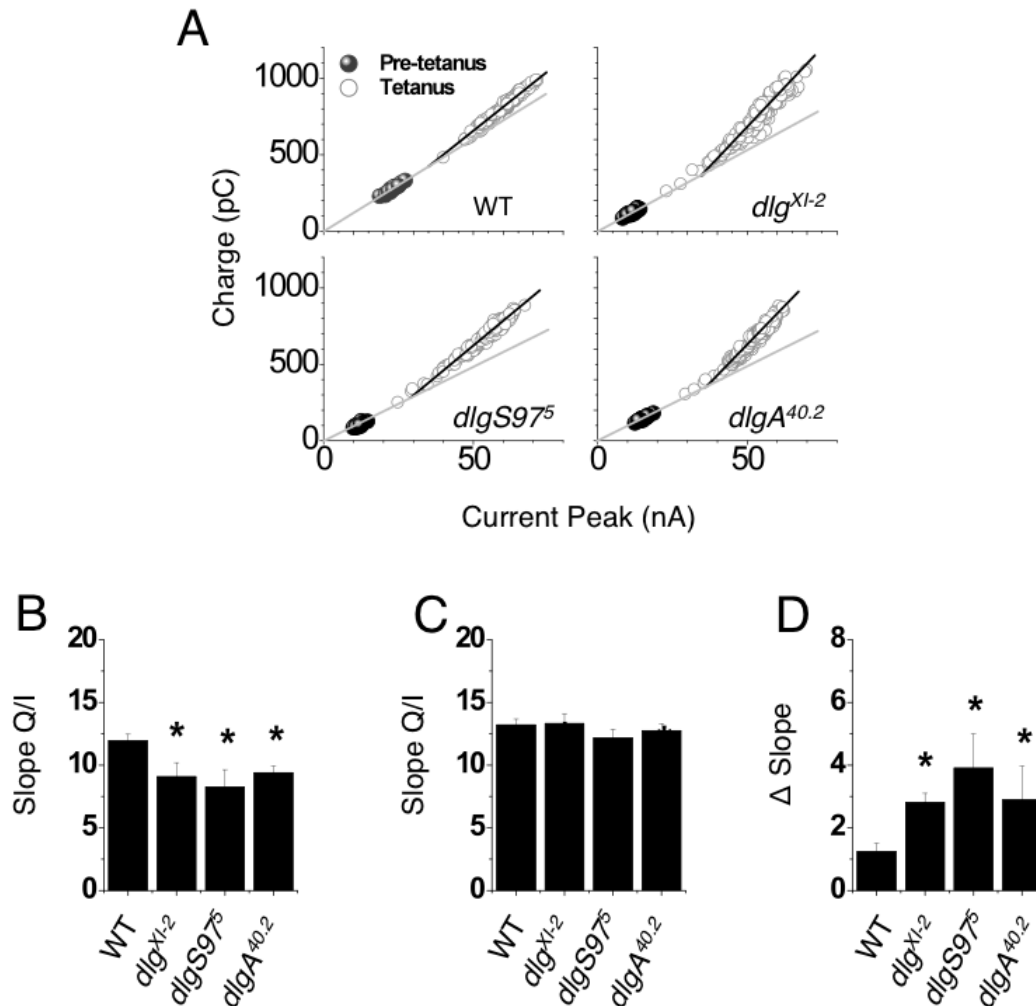
*dlgA*<sup>40.2</sup> 3.30±0.88) como en el aumento tetánico (*dlg*<sup>XI-2</sup> 4.18±0.17; *dlgS97*<sup>5</sup> 4.52±0.71; *dlgA*<sup>40.2</sup> 5.67±0.85 nA) comparados al wild-type (1.40±0.27; 2.63±0.25)(Fig 17A, B, C) (p<0.05). Además la velocidad a la que se genera la facilitación tetánica (WT 1.3±0.2; *dlg*<sup>XI-2</sup> 2.2±0.3; *dlgS97*<sup>5</sup> 1.9±0.2; *dlgA*<sup>40.2</sup> 1.8±0.15) y el aumento tetánico (WT 0.11±0.04; *dlg*<sup>XI-2</sup> 0.27±0.07; *dlgS97*<sup>5</sup> 0.47±0.14; *dlgA*<sup>40.2</sup> 0.81±0.17) están aumentadas en estos mutantes (Fig 17D) (p<0.05). Este resultado, en conjunto con el hecho de las eEJCs son más pequeñas en los mutantes, nos sugieren que los mutantes de *dlg* poseen una menor probabilidad de liberación de neurotransmisor (Pr) ya que como se ha descrito sinapsis con Pr más bajos poseen mayor facilitación (Zucker., 1999).

#### 4.5. Los mutantes de *dlg* presentan una mayor variación en la cinética de sus EJs durante el tétano

Se ha visto que durante una estimulación tetánica del nervio es posible que las cinéticas de liberación de neurotransmisor cambien debido al efecto que posee el  $Ca^{+2}$  sobre diferentes elementos de la maquinaria de fusión de vesículas e incluso sobre los mismos canales de  $Ca^{+2}$  (Catterall, 1998; Catterall, 2000). Por esta razón y para determinar si hay alteraciones relacionadas al influjo de  $Ca^{+2}$  en las mutantes de *dlg* decidimos evaluar este cambio de cinética durante una estimulación tetánica. Para esto ideamos un indicador del ancho de las eEJs. Este indicador corresponde a la pendiente del gráfico corriente vs carga (Fig 19A) de forma que una pendiente mayor nos indica que las eEJs son más lentas o asincrónicas y una pendiente menor indica eEJs más rápidas o sincrónicas.

Nuestros resultados muestran que en condiciones de estimulación basal, es decir durante el pre-tétano (0.5 Hz) con una concentración de  $Ca^{+2}$  0.2 mM, los mutantes de *dlg* presentan eEJs más sincrónicas que el wild-type (WT  $11.95 \pm 0.49$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $9.08 \pm 1.10$ ; *dlgS97*<sup>5</sup>  $8.26 \pm 1.37$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $9.40 \pm 0.51$ ) (Fig 18A, B) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado durante la estimulación tetánica todas las cepas presentan un incremento en la pendiente (Fig 18A, C) En estas condiciones no hay diferencia significativa entre el wild-type y ninguno de los mutantes (WT  $13.20 \pm 0.47$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $13.33 \pm 0.78$ ; *dlgS97*<sup>5</sup>  $12.17 \pm 0.68$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $12.75 \pm 0.55$ ) (Fig 18C). Cuando evaluamos el cambio de pendiente entre el pre-tétano y el tétano y por ende la variación en la sincronía de las eEJs debida al  $Ca^{+2}$  como era de esperarse los mutantes presentan una delta

significativamente mayor al wild-type (WT  $1.25 \pm 0.25$ ;  $dlg^{XI-2}$   $2.81 \pm 0.28$ ;  $dlgS97^5$   $3.90 \pm 1.08$ ;  $dlgA^{40.2}$   $2.9 \pm 1.07$ ) (Fig 18D) ( $p < 0.05$ ).



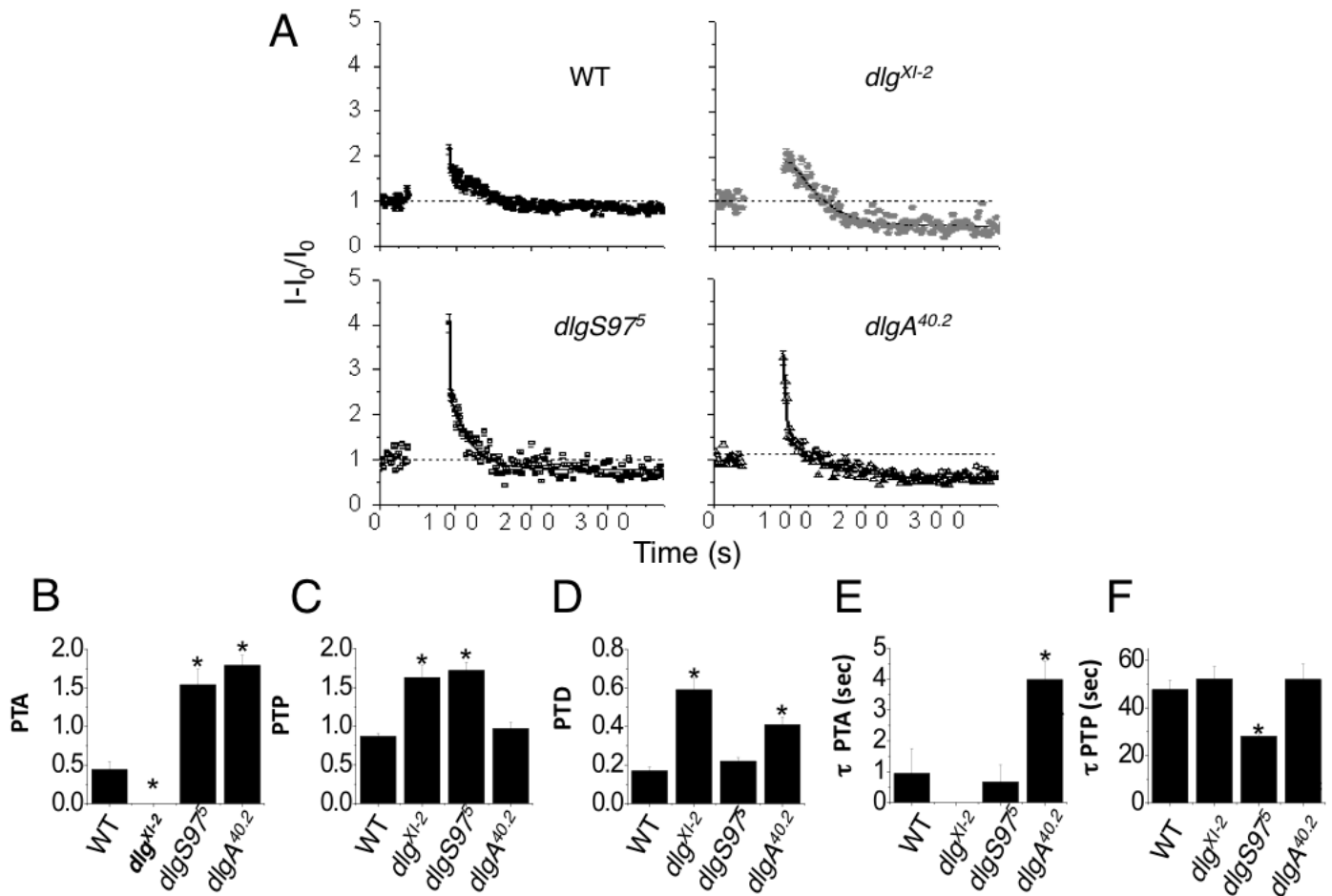
**FIGURA 18: Cambio de cinética de las eEJCs durante la estimulación tetánica en mutantes *dlg*.**

**A)** Relación carga/corriente de las eEJCs para cada genotipo durante la estimulación pre-tetánica (gris) y tetánica (negro). **B)** Pendiente de la relación carga/corriente durante estimulación pre-tetánica para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n=6$ . **C)** Pendiente de la relación carga/corriente durante estimulación tetánica para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE **D)** Variación de la pendiente (tétano-pre-tétano) para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n=6$ .

#### **4.6. Los mutantes de *dlg* presentan alteraciones en la plasticidad sináptica post-tetánica**

Entre el conjunto de fenómenos que comprenden la llamada plasticidad de corta duración, dentro de los cuales encontramos la facilitación y aumento tetánico antes mencionados, también encontramos los llamados fenómenos de plasticidad sináptica post-tetánica (Zucker.,2002; Dyasinou y Regehr, 2011). A diferencia de la facilitación y el aumento tetánico, que son modificaciones de la eficiencia sináptica que se producen durante una estimulación tetánica, como su nombre lo indica, los fenómenos de plasticidad sináptica post-tetánica son modificaciones en la eficacia sináptica que se observan después de aplicar un estímulo tetánico y que perduran por un periodo de tiempo (Zucker,1989). Según el carácter del cambio en la eficiencia podemos clasificar estos fenómenos en incremento post-tetánico o depresión post-tetánica. Dentro del incremento post-tetánico podemos encontrar dos tipos de fenómenos clasificados en base a la duración que estos poseen en aumento post-tetánico (PTA) el que dura de 3-10 segundos, o potenciación post-tetánica (PTP) que puede durar desde 30 segundos a varios minutos dependiendo de la sinapsis (Zucker., 2002). En la UNM<sub>DL</sub> han sido descritos todos estos tipos de plasticidad sináptica post-tetánica (Delgado et al., 2000; Wu et al., 2005) de forma que se pueden evaluar en nuestro modelo. Por esta razón y para explorar con mayor profundidad las alteraciones sinápticas que pueden estar presentes en los mutantes de *dlg* es que decidimos explorar la plasticidad sináptica post-tetánica en los mutantes.





**FIGURA 19: Plasticidad sináptica post-tetánica en mutantes *dlg*.**

**A)** Incremento fraccional promedio de las EJs antes y después de un tétano de 1000 estímulos a 20 Hz en 0.2 mM  $Ca^{+2}$  para cada genotipo. **B)** Aumento post-tetánico para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ . **C)** Potenciación post-tetánica para cada genotipo (PTP). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ . **D)** Depresión post-tetánica (PTD) para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ . **E)** Tau del aumento post-tetánico para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ . **F)** Tau de la potenciación post-tetánica para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ .

Lo que encontramos fue que tanto el mutante  $dlgS97^5$  ( $1.54 \pm 0.2$ ) como el mutante  $dlgA^{40.2}$  ( $1.749 \pm 0.13$ ) presentan una PTA mayor que el wild-type ( $0.44 \pm 0.1$  nA) (Fig 19A, B) ( $p < 0.01$ ) mientras que el mutante doble  $dlg^{XI-2}$  no posee PTA. Con respecto al  $\tau$  del PTA sólo el mutante  $dlgA^{40.2}$  ( $3.98 \pm 0.6$  seg) presenta un incremento significativo respecto del wild-type ( $0.94 \pm 0.8$  seg), pero no así el mutante  $dlgS97^5$  ( $0.67 \pm 0.5$  seg) (Fig 19E) ( $p < 0.01$ ).

Al evaluar la PTP encontramos un incremento significativo con respecto al wild-type ( $0.87 \pm 0.04$ ) para los mutantes  $dlgS97^5$  ( $1.72 \pm 0.1$ ) y  $dlg^{XI-2}$  ( $1.63 \pm 0.1$ ) (Fig 19A, C) ( $p < 0.05$ ), pero no para  $dlgA^{40.2}$  ( $0.97 \pm 0.08$ ). El  $\tau$  del PTP por otro lado sólo se observa alterado en el mutante  $dlgS97^5$  ( $28.1 \pm 2.58$  seg) en el cual es significativamente más corto que el wild-type ( $47.8 \pm 4.05$  seg) pero no en los otros mutantes ( $dlg^{XI-2}$   $52.17 \pm 5.2$  seg;  $dlgA^{40.2}$   $51.94 \pm 8.6$  seg) (Fig 19F) ( $p < 0.05$ ). Para el caso de la depresión post-tetánica (PTD) que acá se calculo como  $1 - F_1$  del último punto del post-tétano encontramos que tanto los mutantes  $dlg^{XI-2}$  ( $0.59 \pm 0.06$ ) como  $dlgA^{40.2}$  ( $0.41 \pm 0.04$ ) poseen mayor PTD que el wild-type ( $0.17 \pm 0.02$ ) y el mutante  $dlgS97^5$  ( $0.20 \pm 0.02$ ) (Fig 19D) ( $p < 0.05$ ).

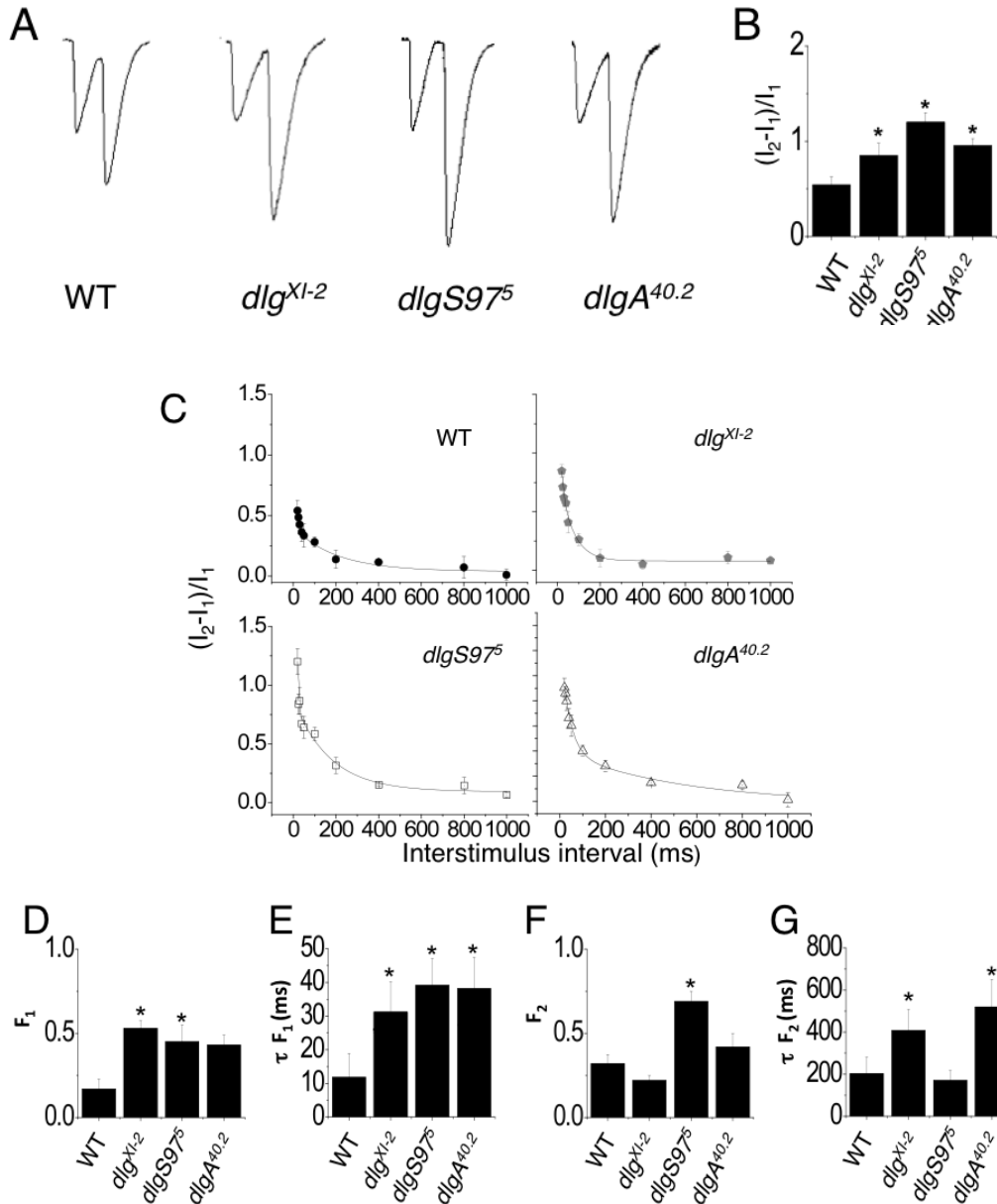
#### 4.7. Los mutantes de *dlg* presentan pulsos pareados con una mayor facilitación y una menor depresión.

Para evaluar la plasticidad por pulsos pareados en los mutantes de *dlg*, se realizó una serie de pulsos a intervalos de 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 400, 800 y 1000 ms en 0.2 Y 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  para medir facilitación (PPF) y depresión (PPD) respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que todos los mutantes presentan una mayor PPF, medida como la razón entre la amplitud del primer pulso y el segundo pulso en condiciones de calcio extracelular igual a 0,2 mM (WT  $0.54 \pm 0.08$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $0.84 \pm 0.13$ ; *dlgS97*<sup>5</sup>  $1.2 \pm 0.11$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $0.95 \pm 0.07$ ) (Fig 20A, B) ( $p < 0.05$ ) y una menor PPD (WT  $0.23 \pm 0.03$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $0.13 \pm 0.008$ ; *dlgS97*<sup>5</sup>  $0.10 \pm 0.01$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $0.16 \pm 0.07$ ) (Fig 21A, B) ( $p < 0.01$ ). Además al evaluar los distintos componentes de cada fenómeno se encontró que al ajustar la exponencial de decaimiento de la facilitación, todos los mutantes presentan una mayor facilitación 1 ( $F_1$ ) al máximo incremento de la primera componente del fenómeno de facilitación (WT  $0.17 \pm 0.05$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $0.53 \pm 0.04$ ; *dlgS97*<sup>5</sup>  $0.4 \pm 0.09$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $0.36 \pm 0.06$ ) (Fig 20D) ( $p < 0.01$ ) y un  $\tau F_1$  que corresponde al tiempo que demora en decaer la primera componente del fenómeno de facilitación, más lento (WT  $11.79 \pm 7.14$  ms; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $31.2 \pm 9.2$  ms; *dlgS97*<sup>5</sup>  $39.14 \pm 8.4$  ms; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $38.17 \pm 9.3$  ms) (Fig 20E) ( $p < 0.01$ ). Sin embargo sólo el mutante *dlgS97*<sup>5</sup> posee una mayor facilitación 2 ( $F_2$ ) que corresponde al máximo incremento de la segunda componente del fenómeno de facilitación (WT  $0.32 \pm 0.05$ ; *dlg*<sup>XI-2</sup>  $0.26 \pm 0.04$ ; *dlgS97*<sup>5</sup>  $0.69 \pm 0.06$ ; *dlgA*<sup>40.2</sup>  $0.41 \pm 0.09$ ) (Fig 20F) ( $p < 0.01$ ) y tanto *dlg*<sup>XI-2</sup> como *dlgA*<sup>40.2</sup>

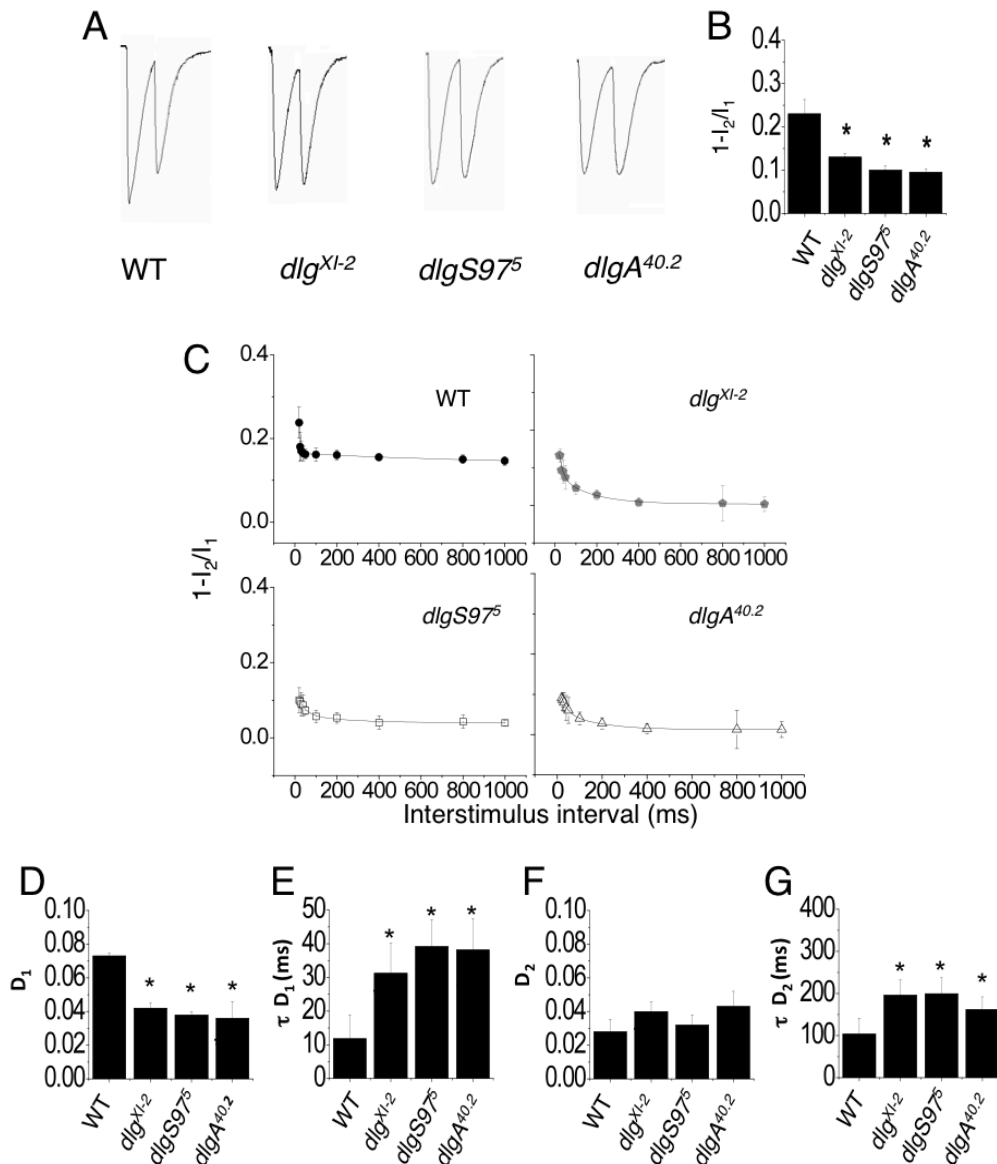
presentan un  $\tau F_2$  más lento, pero no así *dlgS97<sup>5</sup>* (WT 203±77 ms; *dlg<sup>XI-2</sup>* 408±100 ms; *dlgS97<sup>5</sup>* 170±48 ms; *dlgA<sup>40.2</sup>* 520±130 ms) (Fig 20G) ( $p < 0.01$ ).

Por otro lado todos los mutantes presentan una menor depresión 1 ( $D_1$ ) que corresponde al al máximo decremento de la primera componente del fenómeno de depresión (WT 0.073±0.001; *dlg<sup>XI-2</sup>* 0.042±0.003; *dlgS97<sup>5</sup>* 0.038±0.002; *dlgA<sup>40.2</sup>* 0.036±0.01) (Fig 21D) ( $p < 0.05$ ) y un  $\tau D_1$  más lento (WT 11.79±7.14 ms; *dlg<sup>XI-2</sup>* 31.2±9 ms; *dlgS97<sup>5</sup>* 39.14±8 ms; *dlgA<sup>40.2</sup>* 38.17±9.3 ms) (Fig 21E) ( $p < 0.05$ ), pero en ninguno de ellos se observa una diferencia significativa en la depresión 2 ( $D_2$ ) con respecto al wild-type (WT 0.028±0.007; *dlg<sup>XI-2</sup>* 0.04±0.006; *dlgS97<sup>5</sup>* 0.032±0.006; *dlgA<sup>40.2</sup>* 0.043±0.009) (Fig 21F) no obstante todos ellos poseen un  $\tau D_2$  más lento (WT 104±37 ms; *dlg<sup>XI-2</sup>* 196±36 ms; *dlgS97<sup>5</sup>* 199±38 ms; *dlgA<sup>40.2</sup>* 162±30 ms) (Fig 21G) ( $p < 0.01$ ). Estos resultados nuevamente confirman la idea de que los mutantes presentan una probabilidad de liberación (Pr) disminuida debido a que ha que se ha visto que sinapsis con baja Pr presentan una mayor facilitación y menor depresión por pulsos pareados. Además que algunos de los  $\tau$  sean más lentos indica que alguno o algunos de los mecanismos de remoción (clearance) de  $Ca^{+2}$  se encuentra alterado en estos mutantes.



**FIGURA 20: Facilitación por pulsos pareados en mutantes *dlg*.**

**A)** Trazos normalizados para el primer punto (20 ms) de tiempo inter-estímulo para cada genotipo. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $Ca^{+2}$  con una estimulación de 10 V **B)** Facilitación por pulsos pareados para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ . **C)** Ajuste de los datos al modelo doble exponencial  $F = (F_1 \cdot \exp(-x/\tau_{F1}) + F_2 \cdot \exp(-x/\tau_{F2}))$  para cada genotipo. **D)** Valor de  $F_1$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.01$  comparado WT.  $n = 6$ . **E)** Valor tau  $F_1$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ . **F)** Valor de  $F_2$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.01$  comparado WT.  $n = 6$ . **G)** Valor tau  $F_2$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n = 6$ .



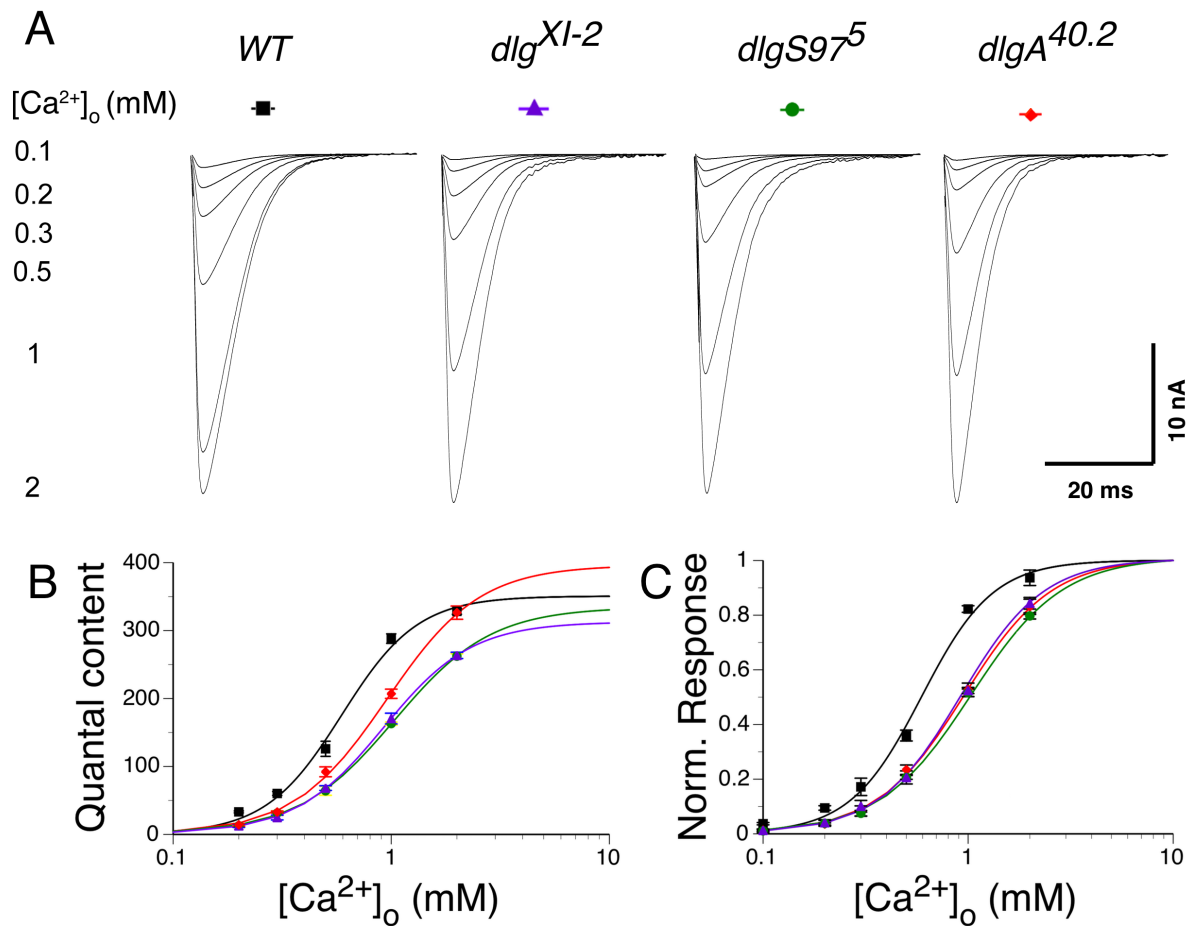
**FIGURA 21: Depresión por pulsos pareados en mutantes *dlg*.**

**A)** Trazos normalizados para el primer punto (20 ms) de tiempo inter-estimulo para cada genotipo. Los registros se realizaron a 2 mM  $Ca^{+2}$  con una estimulación de 10 V **B)** Depresión por pulsos pareados para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*) $p < 0.01$  comparado WT.  $n=6$ . **C)** Ajuste de los datos al modelo doble exponencial  $D = (D_1 \cdot \exp(-x/\tau_{D1}) + D_2 \cdot \exp(-x/\tau_{D2}))$  para cada genotipo. **D)** Valor de  $D_1$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n=6$ . **E)** Valor tau  $D_1$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n=6$ . **F)** Valor de  $D_2$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio.  $n=6$ . **G)** Valor tau  $D_2$  para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT.  $n=6$ .

#### **4.8. La dependencia de $\text{Ca}^{+2}$ de las corrientes post-sinápticas evocadas se encuentra alterada en mutantes de *dlg*.**

Para evaluar la dependencia de la concentración  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular de la liberación de neurotransmisor en los mutantes de *dlg* y por ende su Pr, como sugieren los experimentos de plasticidad, realizamos una curva de  $\text{Ca}^{+2}$  en la que se midió la amplitud de las eEJCs a distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular. Para esto se dieron 10 estímulos al nervio con una amplitud de 10 V a una frecuencia de 0.25 Hz para cada concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  debido a que esta frecuencia no genera ningún condicionamiento ni tipo de plasticidad. La concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular se cambió por medio de una bomba de perfusión una vez realizados los 10 estímulos.

Como se esperaba las eEJCs aumentan su amplitud a medida que se incrementa la concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (Fig 22A) hasta alcanzar un límite (Fig 22B). La amplitud de las EJCs en los mutantes presentan una menor amplitud para todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  excepto a 2 mM (Fig 22A). Esto se ve reflejado en un corrimiento a la derecha en la curva de dependencia a  $\text{Ca}^{+2}$  normalizada de todos los mutantes (Fig 22C). Cuando calculamos el contenido cuántico, es decir el numero de cuántos o vesículas liberadas por la estimulación del nervio, observamos nuevamente un corrimiento hacia la derecha en todos los mutantes, pero este efecto es aún más marcado en los mutantes *dlgS97<sup>5</sup>* y *dlg<sup>XI-2</sup>*. Esta diferencia entre mutantes es explicada por el mayor tamaño cuántico que presentan estos mutantes y no así el mutante *dlgA<sup>40.2</sup>* (Fig 22B).



**FIGURA 22: Dependencia del  $Ca^{+2}$  extracelular en las eEJCs en mutantes de *dlg*.**

**A)** Trazos representativos de los eEJCs para las concentraciones  $Ca^{+2}$  extracelular indicadas a la izquierda para cada genotipo. **B)** Dependencia de  $Ca^{+2}$  extracelular en el contenido cuántico para cada genotipo. Cada punto representan el promedio  $\pm$  SE para esa concentración de  $Ca^{+2}$ . n=6. **C)** Dependencia de  $Ca^{+2}$  extracelular normalizada de los eEJCs para cada genotipo. Cada punto representan el promedio  $\pm$  SE para esa concentración de  $Ca^{+2}$ . n=6

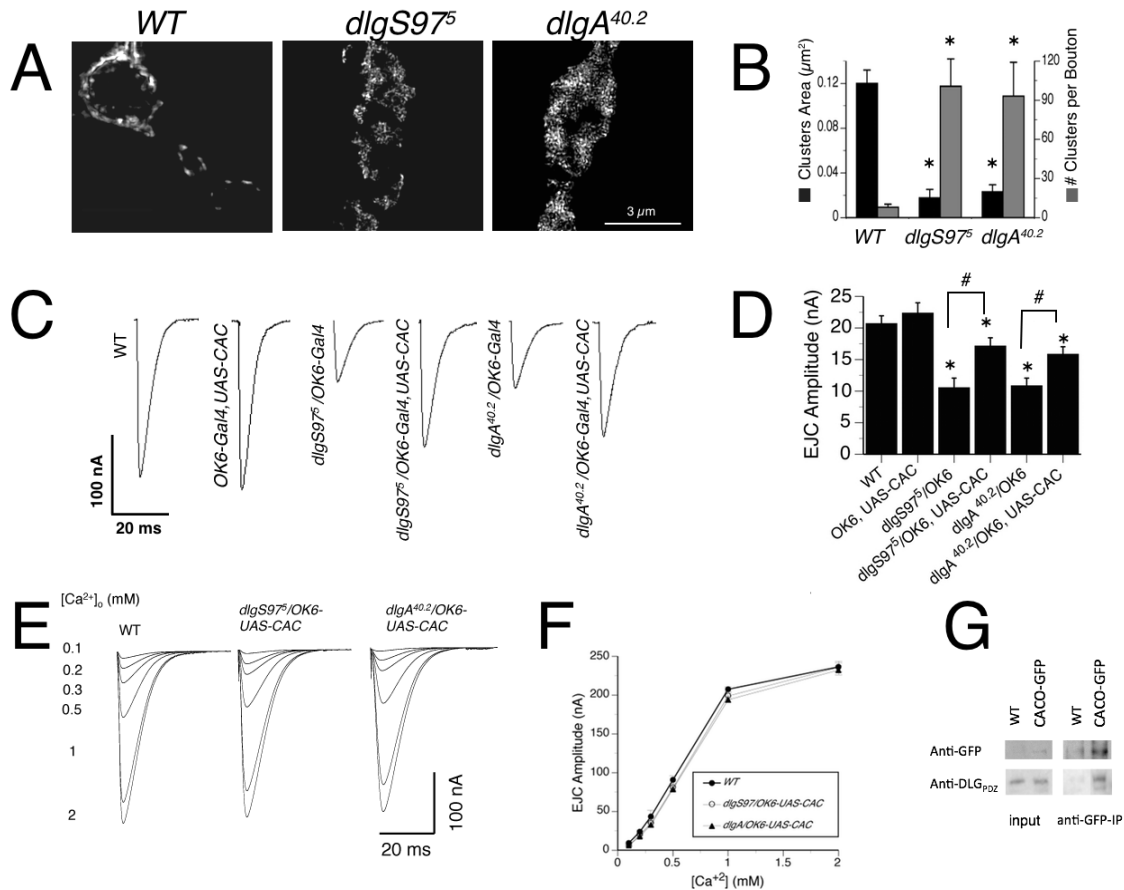
Estos resultados confirman una alteración y disminución de la Pr en los mutantes de *dlg*, pero aún debe ser determinado si esto se debe a una menor entrada de  $Ca^{+2}$  al terminal o a alteraciones en los elementos de respuesta a  $Ca^{+2}$  que participan en la liberación de neurotransmisor.



#### **4.9. La distribución del canal de Ca<sup>+2</sup> cacophony se encuentra alterada en los mutantes *dlg***

La menor probabilidad de liberación que presentan los mutantes de *dlg* se puede deber a múltiples causas, como por ejemplo a un menor ingreso de Ca<sup>+2</sup> al terminal o alteraciones en la maquinaria de liberación de vesículas sinápticas. Por esta razón y para tener una mejor comprensión del fenotipo quisimos evaluar qué está ocurriendo con los canales de Ca<sup>+2</sup> en el terminal. Si bien en el genoma de *Drosophila* se han descrito varios genes que codifican para canales de Ca<sup>+2</sup> parece ser que el canal de Ca<sup>+2</sup> Cacophony es el que media la mayoría, si es que no la totalidad, del influjo de Ca<sup>+2</sup> que gatilla la liberación del neurotransmisor en la sinapsis (Kawasaki et al., 2000, 2004; Rieckhof et al., 2003). Mutantes hipomorfos para este canal presentan una importante reducción en la liberación de neurotransmisor en la UNM<sub>DL</sub> de larvas de 3.<sup>er</sup> estadio y mutantes nulos mueren durante el estado embrionario presumiblemente debido a una reducción importante en la neurotransmisión. Aunque evaluar la distribución por medio de IHQ de este canal de Ca<sup>+2</sup> es la mejor opción, lamentablemente no existen anticuerpos disponibles para este, de forma que no pudimos visualizar el canal endógeno.

Sin embargo utilizando el sistema UAS-GAL4 indujimos la expresión de la proteína de fusión de la subunidad  $\alpha_1$  de Cacophony con EGFP (Kawasaki et al., 2004). Para esto utilizamos *OK6-GAL4* y *UAS-CAC1-EGFP* y posteriormente realizamos la detección del canal utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -GFP. Lo que observamos fue una clara alteración en la distribución del canal de Ca<sup>+2</sup> Cacophony en los mutantes



**FIGURA 23. La distribución del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  cacophony esta alterada en los mutantes *dlg* y su sobre-expresión rescata parcialmente el fenotipo de las eEJCs.**

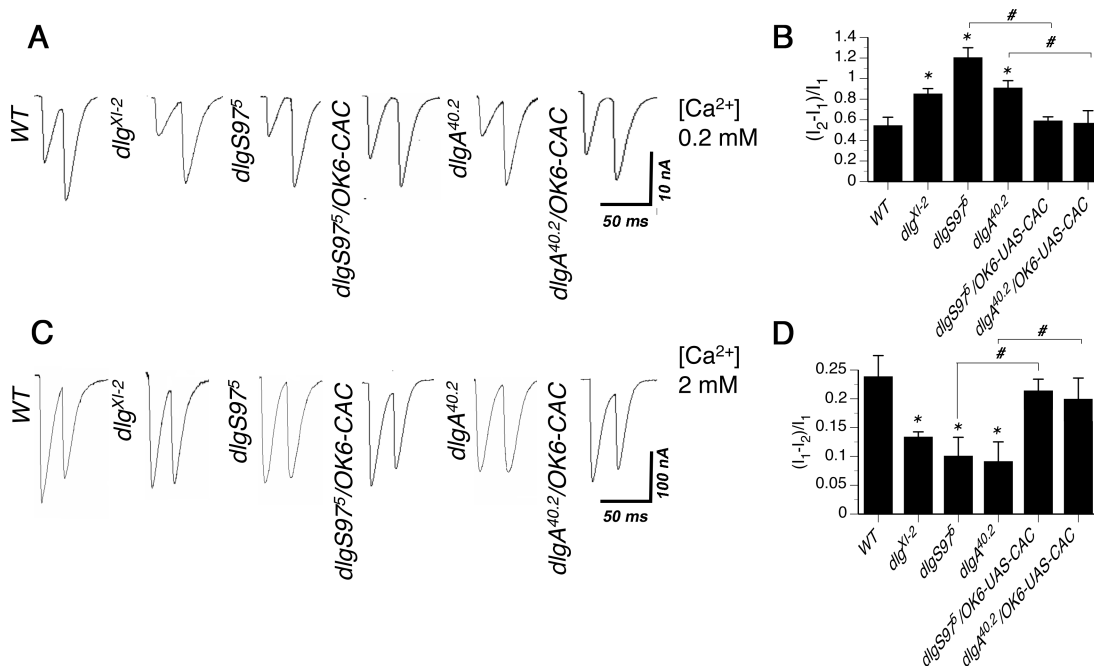
**A)** Inmunofluorescencia usando  $\alpha$ -GFP de la rama sináptica de músculos longitudinales ventrales #6 del segmento abdominal A3 en larvas de 3.<sup>er</sup> estadio expresando Cacophony-GFP presinápticamente. **B)** Tamaño promedio (barras negras) y numero de clusters (barras grises) de cacophony para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. (\*)  $p < 0.01$  comparado WT.  $n = 6$ . **C)** Trazos representativos de los eEJCS para cada genotipo **D)** Amplitud de eEJCs para cada genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SE. Los registros se realizaron a 0.2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  con una estimulación de 10V a 0.5Hz. (\*)  $p < 0.05$  comparado WT. (#)  $p < 0.05$  comparados entre si.  $n = 6$ . **E)** Trazos promedio de los eEJCs para las concentraciones  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular indicadas a la izquierda para cada genotipo. **F)** Dependencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular en los eEJCs para cada genotipo. Cada punto representan el promedio  $\pm$  SE para esa concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ .  $n = 6$ . **G)** Ensayo de inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-GFP y detectando DLG con anti-DLG<sub>PDZ</sub>.

comparados con el control (Fig 24A), presentando clusters mucho más pequeños (WT  $0.12 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ; *dlgS97<sup>5</sup>*  $0.017 \pm 0.007 \mu\text{m}^2$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>*  $0.023 \pm 0.006 \mu\text{m}^2$ ) y

numerosos (WT  $8.02 \pm 2.29$ ; *dlgS97<sup>5</sup>*  $100.76 \pm 20.96$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>*  $93.13 \pm 25.95$ ) que en el wild-type (Fig 23B) ( $p < 0.01$ ).

Debido a que la proteína de fusión que utilizamos es funcional como canal (Kawasaki et al., 2004), quisimos evaluar si la sobre-expresión de cacophony mejora algunas de las alteraciones fisiológicas antes descritas en los mutantes. Los resultados muestran que la expresión del canal rescata parcialmente el tamaño de los EJs en 0.2 mM  $Ca^{+2}$  (WT  $20.85 \pm 1.28$  nA; *OK6-Gal4,UAS-CAC*  $21.72 \pm 1.33$  nA; *dlgS97<sup>5</sup>/OK6-Gal4*  $10.5 \pm 1.56$  nA; *dlgS97<sup>5</sup>/OK6-Gal4,UAS-CAC*  $17.1 \pm 1.35$  nA; *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-Gal4*  $10.8 \pm 1.26$  nA; *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-Gal4,UAS-CAC*  $15.8 \pm 1.23$  nA) (Fig 23C, D) y que también la curva de dependencia de  $Ca^{+2}$  de las EJs presenta un perfil indistinguible del wild-type (Fig 22E, F) a diferencia de lo que veíamos antes (Fig 23B). Además observamos que tanto la facilitación por pulsos pareados (WT  $0.54 \pm 0.08$ ; *dlg<sup>XI-2</sup>*  $0.84 \pm 0.13$ ; *dlgS97<sup>5</sup>*  $1.2 \pm 0.11$ ; *dlgS97<sup>5</sup>/OK6-Gal4,UAS-CAC*  $0.58 \pm 0.04$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>*  $0.95 \pm 0.07$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-Gal4,UAS-CAC*  $0.56 \pm 0.012$ ) (Fig 24A, B) como la depresión por pulsos pareados (WT  $0.23 \pm 0.03$ ; *dlg<sup>XI-2</sup>*  $0.13 \pm 0.008$ ; *dlgS97<sup>5</sup>*  $0.10 \pm 0.01$ ; *dlgS97<sup>5</sup>/OK6-Gal4,UAS-CAC*  $0.18 \pm 0.05$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>*  $0.16 \pm 0.07$ ; *dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-Gal4,UAS-CAC*  $0.16 \pm 0.076$ ) (Fig 24C, D) es rescatada.

Estos resultados demuestran que parte del fenotipo presináptico se debe a una alteración en la expresión y o distribución del canal de  $Ca^{+2}$  cacophony, y por ende a una disminución en la entrada de  $Ca^{+2}$  al terminal sináptico pero no descarta que otros componentes involucrados en la liberación de neurotransmisor estén afectados.



**FIGURA 24. La sobre-expresión del canal de Ca<sup>2+</sup> cacophony rescata la PPF y PPD en los mutantes *dlg*.**

**A)** Trazos representativos para pulsos pareados con 20ms de tiempo inter-estimulo en 0.2 mM Ca<sup>2+</sup> para cada genotipo. **B)** Facilitación por pulsos pareados (PPF) para 20ms de tiempo inter-estimulo en 0.2 mM Ca<sup>2+</sup>. Los datos se presentan como promedio ± SE. (\*)p<0.05 comparado WT. (#) p<0.05 comparados entre si. n=6. **C)** Trazos representativos para pulsos pareados con 20ms de tiempo inter-estimulo en 2 mM Ca<sup>2+</sup> para cada genotipo **D)** Depresión por pulsos pareados (PPD) para 20ms de tiempo inter-estimulo en 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Los datos se presentan como promedio ± SE. (\*)p<0.05 comparado WT. (#) p<0.05 comparados entre si. n=6.

Para confirmar la interacción entre DLG y Cacophony realizamos un ensayo de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-GFP para inmunoprecipitar y detectamos DLG usando un anticuerpo anti-DLG<sub>PDZ</sub>. Lo que obtuvimos fue una inmunoprecipitación positiva de DLG lo que confirma la interacción entre estas dos proteínas (Fig 23G).

<b>Genotipo</b>	<b>mEJC amplitud (q)</b>	<b>mEJC tau</b>	<b>eEJCs amplitud</b>	<b>Quantal content (m)</b>
<i>Canton-S (CS)</i>	0.72±0.02 nA	14.45±1.56 ms	22.04±2.6 nA	31.87±3.7
<i>dlgS97<sup>5</sup></i>	0.89±0.01 nA	19.22±2.32 ms	9.41±1.3 nA	13.03±1.3
<i>dlgA<sup>40.2</sup></i>	0.74±0.01 nA	13.78±1.55 ms	15.33±3.1 nA	20.87±4.1
<i>dlg<sup>XI-2</sup></i>	0.91±0.01 nA	21.34±1.09 ms	11.33±1.6 nA	12.45±1.8
<i>dlgS97<sup>5</sup>/Def</i>	0.91±0.01 nA	20.54±1.26 ms	11.5±2.1 nA	12.83±2.1
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/Def</i>	0.72±0.02 nA	12.92±1.73 ms	11.2±1.63 nA	15.77±2.2
<i>dlg<sup>XI-2</sup>/Def</i>	0.91±0.02 nA)	20.63±0.78 ms	8.97±1.7 nA	9.85±1.8
<i>OK6-GAL4/UAS-RNAi-dlg</i>	0.76±0.02 nA	16.31±2.01 ms	7.8±1.9 nA	10.2±2.5
<i>C57-GAL4/UAS-RNAi-dlg</i>	1.03±0.03 nA	21.47±1.42 ms	23.64±2.4 nA	24.27±1.8
<i>dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97</i>	1.00±0.02 nA	22.62±2.22 ms	17.2±1.5 nA	18.4±1.5
<i>dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97</i>	0.65±0.03 nA	16.38±2.13 ms	12.8±1.2 nA	20.64±1.4
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA</i>	0.73±0.01 nA	14.13±1.34 ms	20.24±3.5 nA	17.2±1.5
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA</i>	0.70±0.02 nA	13.74±2.23 ms	13.51±1.5 nA	19.28±2.1

**TABLA 2** Sumario de variables electrofisiologicas para todas las cepas.

<b>Genotipo</b>	<b>GluR (Área)</b>	<b>N° ZA</b>	<b>ZA (Área)</b>	<b>Botón (Área)</b>
<i>Canton-S (CS)</i>	0.32±0.09 $\mu\text{m}^2$	9.22±1.22	0.13±0.018 $\mu\text{m}^2$	7.92±1.75 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgS97<sup>5</sup></i>	0.67±0.12 $\mu\text{m}^2$	13.67±0.73	0.1±0.04 $\mu\text{m}^2$	9.74±1.84 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgA<sup>40.2</sup></i>	0.35±0.07 $\mu\text{m}^2$	12.73±0.84	0.21±0.02 $\mu\text{m}^2$	9.6±1.3 $\mu\text{m}^2$
<i>dlg<sup>XI-2</sup></i>	0.81±0.11 $\mu\text{m}^2$	15.34±1.16	0.23±0.02 $\mu\text{m}^2$	15.88±2.01 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgS97<sup>5</sup>/Def</i>	0.69±0.08 $\mu\text{m}^2$	14.22±1.12	0.14±0.01 $\mu\text{m}^2$	9.03±1.78 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/Def</i>	0.31±0.08 $\mu\text{m}^2$	12.25±0.72	0.24±0.01 $\mu\text{m}^2$	7.46±1.77 $\mu\text{m}^2$
<i>dlg<sup>XI-2</sup>/Def</i>	0.73±0.07 $\mu\text{m}^2$	16.02±1.16	0.25±0.01 $\mu\text{m}^2$	17.23±2.45 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgS97<sup>5</sup>/OK6-UAS-dlgS97</i>	0.65±0.09 $\mu\text{m}^2$	12.21±0.74	0.13±0.01 $\mu\text{m}^2$	9.42±1.97 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgS97<sup>5</sup>/C57-UAS-dlgS97</i>	0.41±0.85 $\mu\text{m}^2$	13.45±0.68	0.15±0.02 $\mu\text{m}^2$	9.51±1.45 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/OK6-UAS-dlgA</i>	0.32±0.07 $\mu\text{m}^2$	9.72±1.05	0.16±0.01 $\mu\text{m}^2$	7.83±1.81 $\mu\text{m}^2$
<i>dlgA<sup>40.2</sup>/C57-UAS-dlgA</i>	0.38±0.09 $\mu\text{m}^2$	12.25±0.88	0.20±0.01 $\mu\text{m}^2$	8.9±1.36 $\mu\text{m}^2$

**TABLA 3. Sumario de variables morfológicas para todas las cepas.**

## 5. DISCUSION

### **5.1. La isoforma *dlgS97* participa en la regulación del contenido cuántico por medio de la modificación del tamaño de los campos de receptores de glutamato y/o probablemente el tipo de receptor de glutamato presente**

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la participación exclusiva de la isoforma *dlgS97* en la regulación del tamaño cuántico y de los campos de receptores de glutamato sin que *dlgA* tenga ningún efecto sobre ellos. Como se demostró, sólo la mutación de *dlgS97* y no la de *dlgA* presenta un incremento en el tamaño cuántico de forma que sería la falta de ésta isoforma lo que genera un incremento de este en el mutante doble. Este resultado había sido descrito con anterioridad, de manera que nuestros experimentos confirman este fenómeno (Mendoza-Topaz et al., 2008). Se cree que el tamaño cuántico refleja el contenido de neurotransmisor presente en las vesícula sinápticas (VS) y que variaciones en este son producto de un incremento o disminución de la concentración de neurotransmisor presente en ellas (Estable et al., 1954; De Robertis y Franchi, 1956; De Robertis et al., 1962). Por otro lado se ha descrito un incremento en el tamaño de las VS para los mutantes *dlg* (Karunanithi et al., 2002; Mendoza-Topaz et al., 2008) de manera que parece obvio suponer que el incremento en el contenido cuántico se debe a estas VS más grandes. Sin embargo se sabe que todos los mutantes presentan VS de mayor tamaño incluyendo *dlgA* (Mendoza-Topaz et al., 2008) el que no presenta variación alguna en el tamaño cuántico con respecto al wild-type. Esto, sumado a nuestros resultados, que muestran que sólo la interferencia postsináptica de *dlg* genera un incremento en el tamaño cuántico y que este fenotipo puede ser

rescatado solamente por la expresión postsináptica de *dlgS97* y no la presináptica, nos hace considerar una causa postsináptica para este fenotipo.

Si bien la idea de que un cuánta corresponde a la liberación de una vesícula sináptica es la idea más aceptada, aún no hay pruebas directas de este hecho y otros modelos han sido propuestos. Otro modelo que se ha propuesto es que la naturaleza del cuánta refleja propiedades más bien postsinápticas (Edwards et al., 1990). De acuerdo con esta hipótesis diferentes sinapsis tienen un número diferente de módulos postsinápticos y el tamaño cuántico es determinado por el número de módulos presentes. De forma que cada uno de estos módulos puede corresponder a uno o varios receptores. Lo más probable es que el tamaño cuántico esté determinado tanto por mecanismos presinápticos (contenido de neurotransmisor en las VS) como postsinápticos (tamaño de los campos de receptores). Lo que sugieren nuestros resultados es que el tamaño cuántico en los mutantes *dlg* estaría regulado por *dlgS97* por medio de este segundo mecanismo. Esto debido a que el tamaño de los campos de receptores de glutamato se encuentran aumentados en este mutante (y en el mutante doble) pero no en el mutante *dlgA*, y a que este fenotipo es rescatado al igual que el aumento en el tamaño cuántico solo por la expresión postsináptica de *dlgS97* pero no por la presináptica.

Actualmente no existe evidencia de interacción directa entre *dlgS97* y los receptores de glutamato, pero una explicación razonable del mecanismo que podría estar implicado y cuya confirmación requiere de más experimentos, es que este efecto podría estar mediado a través de la proteína METRO. METRO al igual que *dlg* es una MAGUK y es sabido que forma un complejo con *dlgS97* por medio de la proteína adaptadora *DLin-7* (Bachmann et al., 2010). Este complejo DLGS97-



METRO-DLin7 se cree estaría participando en el control del tamaño y la adecuada organización de los botones sinápticos en la UNM<sub>DL</sub> regulando el tamaño de los campos de receptores de glutamato postsinápticos (Bachmann et al., 2010). Se ha descrito que los mutantes de METRO al igual que los mutantes de *dlgS97*, como mostramos en este trabajo, presentan mayor tamaño en los campos de receptores de glutamato postsinápticos sin embargo los mutantes de METRO a diferencia de los mutantes *dlgS97* no presentan alteraciones en el tamaño cuántico (Bachmann et al., 2010).

El hecho de que el aumento de tamaño en los campos de receptores de glutamato no sea suficiente para que se genere un aumento en el tamaño cuántico, como se ve en los mutantes de METRO, hace posible que este incremento en los mutantes de *dlgS97* no se deba directamente o totalmente a un aumento de los campos de receptores, sino que además existan otras alteraciones concomitantes que den cuenta de este fenómeno. Se sabe que en embriones, DLG participa en la regulación de los niveles relativos de receptores que contienen la subunidad IIA versus la IIB, y que en mutantes *dlg<sup>XI-2</sup>* se favorece la presencia de los primeros (Chen y Featherstone , 2005). Además es sabido que los DGluRIIA presentan una mayor conductancia y cinéticas de inactivación más lentas y por ende su enriquecimiento en la sinapsis genera mEJC más grandes con una constante de tiempo de la disminución de la corriente más lento lo que es compatible con nuestro fenotipo (DiAntonio et al., 1999). Lamentablemente y pese a nuestros esfuerzos no fuimos capaces de visualizar por medio de IHQ el enriquecimiento de DGluRIIA en las sinapsis de los mutantes. No obstante evaluamos la cinética de disminución de la corriente representada por la constante de tiempo “ $\tau$ ” y, como se mostró en los

resultados, los mutantes *dlgS97*<sup>5</sup> y *dlg*<sup>XI-2</sup> poseen constantes de tiempo  $\tau$  más lentos, pero no así *dlgA*<sup>40.2</sup>. Además este fenotipo es rescatado solo por la expresión postsináptica de *dlgS97*. Lo que sugiere a *dlgS97* como el responsable de regular la razón DGluRIIA/ DGluRIIB.

## **5.2. Los mutantes de *dlg* presentan eEJCs más pequeñas debido a alteraciones presinápticas**

Nuestros resultados muestran que todos los mutantes presentan una menor amplitud de sus eEJCs. Esto sugiere que, a diferencia de lo que ocurre con el tamaño cuántico, ambas subunidades son requeridas para obtener una apropiada actividad sináptica evocada.

De acuerdo al modelo de liberación cuántica de neurotransmisor (DelCastillo y Katz, 1954a) podemos suponer que una disminución en las eEJCs de los mutantes se puede deber teóricamente a una disminución en  $N$  (número de sitios de liberación),  $Pr$  (probabilidad de liberación)  $q$  (tamaño cuántico), cosa que discutiremos a continuación.

Como se dijo anteriormente los mutantes *dlgS97*<sup>5</sup> y *dlg*<sup>XI-2</sup> presentan un  $q$  de mayor tamaño, mientras que en el mutante *dlgA*<sup>40.2</sup> este no es diferente del control, de forma que este menor tamaño de las eEJCs no se puede deber a esto. Además al interferir presinápticamente *dlg* observamos una disminución en el tamaño de las eEJCs y en  $m$  (contenido cuántico) sin que se alterara  $q$  y cuando interferimos postsinápticamente *dlg* se observó un aumento en  $q$  sin que se altere la amplitud de las eEJC pero sí se vió una disminución en  $m$ . Esto nos indicaría que este cambio en la amplitud de las eEJCs se debe a un defecto presináptico. También vimos que

todos los mutantes presentan  $m$  menores de manera que esto nos indica que de alguna forma hay una alteración en N, Pr o ambos y que ambas isoformas de *dlg* son necesarias para la liberación de neurotransmisor.

Otra cosa que evaluamos fue el tamaño y número de zonas activas por botón por medio de la tinción IHQ de la proteína Bruchpilot. Como se dijo anteriormente Bruchpilot es ampliamente utilizada por su localización específica en las ZAs razón por la cual podemos usar el número de clústers de Bruchpilot como una estimación del número de sitios de liberación N. Nuestro hallazgo contrariamente a lo esperado al saber que las eEJCs en los mutantes son más pequeñas fue que todos los mutantes poseen más ZAs por botón es decir que N es mayor y según lo dicho anteriormente si N es mayor y Pr es constante deberíamos esperar eEJCs de mayor tamaño y  $m$  mayores. Por si fuera poco las mutantes *dlgA*<sup>40.2</sup> y *dlg*<sup>XI-2</sup> poseen ZAs más grandes. Se ha descrito que cambios en el tamaño e inmunoreactividad de la proteína bruchpilot pueden ser correlacionados con la amplitud de las eEJCs, sin que se observe una variación de la amplitud de los mEJCs (Wagh et al., 2006), por lo tanto al tener un mayor número de ZAs y de mayor tamaño deberíamos esperar eEJCs más grandes.

Existen dos posibles explicaciones a porque a pesar de que todos los mutantes poseen más ZAs y que incluso estas sean más grandes en mutantes *dlgA*<sup>40.2</sup> y *dlg*<sup>XI-2</sup> presentan eEJCs más pequeñas. Una explicación posible es que exista un aumento en el número de sinapsis silentes, es decir que muchas de estas ZAs no posean realmente toda la maquinaria para ser funcionales cosa que ha sido descrita (Peled y Isacof., 2011) o que estas ZAs sean funcionales pero que por algún motivo la Pr de los mutantes se ve muy disminuida, lo que se puede deber a una

disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al terminal o a una alteración en el mecanismo de liberación de vesículas.

Otra cosa que no podemos determinar es si este incremento en el número de ZAs o del tamaño de estas se debe a un efecto directo de las proteínas *dlgA* y *dlgS97* sobre la regulación de estas o a un efecto compensatorio de la sinapsis debido a otro tipo de alteraciones, probablemente relacionados con la Pr. Por otra parte lo que sí podemos concluir es que la familia de proteínas *dlg* poseen un rol tanto presináptico como postsináptico ya que es necesaria tanto para una adecuado tamaño de los campos de receptores de glutamato (postsinápticos) mediada principalmente por *dlgS97* como para la apropiada liberación de neurotransmisor (presináptico) donde se necesita la presencia de ambas isoformas.

### **5.3. Los mutantes de *dlg* presentan alteraciones en distintos fenómenos de plasticidad de corta duración**

La variación dinámica de la transmisión sináptica ha sido conocida por más de 70 años (Feng , 1941; Eccles et al.,1941). Virtualmente todos los tipos de sinapsis son regulados por procesos de corta y larga duración, algunos de los cuales llevan a un aumento de la eficiencia sináptica y otros a una disminución de esta. En algunas sinapsis la actividad repetida genera un incremento sináptico por lo que los procesos de facilitación predominan, en otras una disminución de la eficiencia es preponderante de manera que los procesos de depresión son favorecidos. Esta diferencia depende de las características funcionales de cada sinapsis. En este trabajo para evaluar con mayor profundidad las posibles alteraciones por la ausencia

de una o ambas isoformas de la proteína *dlg* evaluamos distintos tipos de plasticidad sináptica que se sabe están presentes en la UNM<sub>DL</sub>.

Uno de los fenómenos que evaluamos fue la plasticidad sináptica por estimulación tetánica. Como se dijo anteriormente todos los mutantes presentaron un incremento tanto en la facilitación como en el aumento tetánico. Se ha visto que sinapsis con un contenido cuántico bajo, como se vió anteriormente presentan todos los mutantes, poseen mayores incrementos en la eficacia sináptica, de manera que esto es compatible y confirma lo antes descrito. Se cree que esto se debe a que al tener un menor contenido cuántico ocurre una menor depleción de las vesículas sinápticas de forma que hay un mayor número de estas disponible para ser liberado en estímulos consecutivos (Zucker, 2002).

La potenciación post-tetánica (PTP) fue descrita más de 100 años atrás cuando se encontró que estímulos del nervio que originalmente eran incapaces de generar una contracción muscular se volvieron capaces de generar una después de un periodo sostenido de estimulación de alta frecuencia (Schiff 1858; Boehm 1894; Hughes 1958). En varias sinapsis además se ha descrito un tipo de plasticidad con una duración mucho más corta que la PTP con un curso temporal independiente de la duración del estímulo tetánico llamado aumento post-tetánico (PTA) (Magleby 1987). En este trabajo evaluamos ambos fenómenos en los mutantes *dlg* y encontramos que la ausencia de cualquiera de las dos isoformas de *dlg* genera un incremento en el PTA; sin embargo en el mutante doble no se observa este tipo de plasticidad. Esto sugiere que es necesaria al menos una de las isoformas de *dlg* para generar el PTA y que la presencia de ambas es requerida para su apropiada inducción. Aún no se conoce el mecanismo concreto que genera este tipo de

plasticidad, de manera que es difícil aventurarse con una explicación más detallada de lo observado en los mutantes. Sin embargo se sabe que este mecanismo es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  ya que la inyección presináptica de un quelante de este ion (EGTA) previene su generación en la sinapsis gigante de calamar (Swandulla, 1991). También sabemos que la constante de tiempo  $\tau$  del PTA parece reflejar el clearance de  $\text{Ca}^{+2}$  del terminal, ya que este se ve aumentado con la acumulación de  $\text{Na}^+$  en este (cosa que disminuye el clearance de  $\text{Ca}^{+2}$  por el intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ ) o por la unión de  $\text{Ca}^{+2}$  a proteínas quelantes intracelulares (Magleby y Zegel, 1976). Debido a que sólo el mutante para *dlgA* presenta un aumento en la constante de tiempo de la PTA podríamos especular que en estas condiciones sólo este mutante posee un clearance de  $\text{Ca}^{+2}$  más lento, pero esto aún debe ser confirmado con más experimentos. Por otra parte resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio parecen indicar que la PMCA ( $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa de la membrana plasmática) de alguna forma esta interactuando con una o ambas de las isoformas de *dlg*, aún no sabemos con cual de ellas pero podríamos suponer que esta interacción podría ser con *dlgA*.

Al evaluar la PTP se observo que tanto el mutante para *dlgS97* como el doble mutante poseen un aumento en su magnitud, lo que indicaría que esta es regulada solamente por esta isoforma y no por *dlgA*. Además sólo el mutante para *dlgS97* presenta una diferencia significativa en la constante de tiempo  $\tau$  del PTP, siendo éste más rápido. A lo largo del tiempo se han sugerido varios candidatos moleculares para este tipo de plasticidad, dentro de los cuales encontramos: la proteína kinasa C (PKC) (Alle et al., 2001; Brager et al., 2003; Beierlein et al., 2007; Korogod et al., 2007); Munc13 (Beierlein et al. 2007; Shin et al. 2010) y CaMKII (Calmodulin and

calcium/ calmodulin-dependent kinase II) (Wang y Maler 1998; Fiumara et al., 2007). Pero ninguno de ellos ha logrado ser completamente confirmado.

La plasticidad por pulsos pareados ha sido ampliamente utilizada para evaluar los cambios de eficacia sináptica y así caracterizar las propiedades de distintas sinapsis. Se han descrito principalmente dos tipos de plasticidad por pulsos pareados, la facilitación (PPF) y la depresión (PPD), y la ocurrencia de una o la otra depende del tipo de sinapsis estudiada y de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular utilizada. El mecanismo comúnmente aceptado para la PPF es el del  $\text{Ca}^{+2}$  residual, el que propone que el arribo de un potencial de acción (PA) al terminal genera la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a este de forma que se induce la liberación del neurotransmisor, pero además una baja concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  persiste por un periodo de tiempo en el terminal, de forma que al llegar un segundo PA e inducir nuevamente la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  este se sumara al ya presente y se generara una mayor liberación de neurotransmisor debido a que la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  es mayor (Katz y Miledi 1968). Sin embargo se han propuesto otros mecanismos por los cuales se podría generar esta PPF. Uno de los mecanismos propuestos es la existencia de un sensor de  $\text{Ca}^{+2}$  distinto a la sinaptotagmina, el que posee una baja afinidad para este ion, de manera tal que la acumulación de  $\text{Ca}^{+2}$  en el terminal permitiría la liberación de neurotransmisor mediada por este sensor de baja afinidad además de la mediada por sinaptotagmina y de esta forma generar un aumento en la eficacia sináptica (Stanley 1984; Bain y Quastel 1992). Otro mecanismo propuesto es la existencia de una proteína quelante de  $\text{Ca}^{+2}$  de alta afinidad, de manera tal que esta reduciría el  $\text{Ca}^{+2}$  disponible para interactuar con sinaptotagmina e inducir la liberación de neurotransmisor, pero al dar un segundo estímulo al estar esta ya unida a  $\text{Ca}^{+2}$  más

de este ion estaría disponible para unirse a sinaptotagmina e inducir la liberación del neurotransmisor (Roberts, 1993; Neher, 1998). Actualmente se cree en realidad que varios de estos mecanismos puede estar participando en distintas sinapsis y por esa razón el proceso de PPF puede ser ajustado a un modelo doble exponencial.

Al evaluar la PPF en los mutantes de *dlg* encontramos que todos los mutantes poseen una mayor valor en la constante rápida  $F_1$  y un  $\tau$  de la  $F_1$  que se cree se debe al primer mecanismo antes descrito. Esta observación estaría de acuerdo con el hallazgo de que los mutantes de *dlg* presentan una menor probabilidad de liberación, ya que se ha visto que sinapsis con baja probabilidad de liberación y por ende menor contenido cuántico presentan mayor facilitación (Mallart y Martin, 1968). Por otra parte sólo el mutante para *dlgS97* presenta una mayor  $F_2$  la que se cree se debe a uno de los otros dos mecanismos antes mencionados, lo que sugiere una regulación específica por parte de esta isoforma de *dlg* ya sea en el sensor de baja afinidad o en el quelante de alta afinidad a  $Ca^{+2}$ .

Al evaluar la PPD se vio que todos los mutantes presentan un menor valor en la constante rápida  $D_1$  y  $\tau$  s más lentos para  $D_1$  y  $D_2$  lo que sugiere nuevamente que los mutantes de *dlg* tienen clearance de  $Ca^{+2}$  más lento. El hecho que la PPD sea menor es compatible con el hecho de que todos los mutantes presentan más zonas activas ya que se cree que la PPD refleja el pool de vesículas sinápticas listo a ser liberado, el que corresponde a las vesículas unidas a las zonas activas y que son competentes para fusionarse cuando entra el  $Ca^{+2}$  al terminal (Zucker, 2002).



#### **5.4. El canal de $\text{Ca}^{+2}$ cacophony presenta una alterada distribución en los mutantes *dlg***

Como muestran nuestros resultados la menor amplitud de las eEJCs se debería principalmente a una menor probabilidad de liberación (Pr), más que a un aumento en el número de sinapsis silentes (como se discutió anteriormente) y esto debido a una alterada distribución del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  “Cacophony” siendo este, según nuestro conocimiento, el primer reporte *in vivo* de un rol presináptico concreto para esta familia de proteínas.

En *Drosophila*, el gen *cacophony* (*cac*), codifica para la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  cercano a la familia N-P/Q de vertebrados, el cual se expresa en el sistema nervioso y en particular en el terminal presináptico de la UNM<sub>DL</sub> (Kawasaki et al., 2004). Estudios en el alelo hipomorfo termosensible *cac<sup>ts-2</sup>* muestran una exacerbada disminución en la liberación de neurotransmisor a T° restrictiva (Kawasaki et al., 2000; Kawasaki et al., 2002). La mutación de *cac<sup>ts-2</sup>* produce un cambio de residuo desde arginina a serina en el dominio regulador de  $\text{Ca}^{+2}$  del extremo citoplasmático del carboxilo terminal del canal (Kawasaki et al., 2000). Estudios en la UNM<sub>DL</sub> del alelo *cac<sup>ts-2</sup>* han mostrado que la estimulación del nervio evoca una menor señal de calcio en el terminal pre-sináptico. Junto a esto el contenido cuántico de las respuestas evocadas sufre un desplazamiento a la derecha en la dependencia al  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (Macleod et al., 2006). En la UNM y en la sinapsis del cáliz del ratón se ha observado un similar comportamiento en la dependencia del contenido cuántico al  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular al eliminar el canal de calcio de tipo P/Q así como también mediante su inhibición con fármacos específicos (Inchauspe et al., 2004). De

esta forma en el terminal presináptico la disminución en la conductancia de  $\text{Ca}^{+2}$  disminuye la secreción de neurotransmisor. Estos resultados son totalmente compatibles con lo que vimos en los mutantes *dlg* los que presentan una liberación de neurotransmisor disminuida y un corrimiento a la derecha en la dependencia al  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular de sus EJC's lo que confirma nuestro hallazgo de una localización alterada del canal Cacophony en el terminal. Pero también observamos que a altas concentraciones de este ion (2 mM) la amplitud de las EJC's es idéntica a la del WT lo que descarta que además de poseer una menor probabilidad de liberación presenten un aumento en el número de sinapsis silentes, ya que si este fuera el caso además de observarse este desplazamiento a la derecha los mutantes no serían nunca capaces de generar un EJC's de la misma amplitud que el wild-type debido a la disminución del número de sitios de liberación disponible. Por otra parte si nos fijamos en la pendiente de los dos últimos puntos de la curva (1mM y 2mM) se nota claramente que la pendiente de todos los mutantes es mayor a la del wild-type, lo que sugiere que estos todavía no han llegado al punto de saturación lo que es concordante con el hallazgo de que estos poseen más sitios de liberación (ZAs) y con el hecho de que a 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  a pesar de que las EJC's poseen la misma amplitud que el wild-type cuando realizamos experimentos de depresión de pulsos pareados estos presentan menor depresión probablemente debido a que estos aún poseen más sitios de liberación disponibles que el control (Zucker y Regehr 2002). Por otra parte al evaluar la amplitud de los EJC, la dependencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, la PPF y la PPD con la sobre-expresión de cacophony se observa casi una completa mejora de las alteraciones antes vistas en los mutantes lo que corrobora que en su mayoría el fenotipo se debe a una alterada entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al terminal por una

inadecuada distribución y probablemente una disminución de la expresión de este canal.

Si bien se conoce la interacción y regulación de canales de potasio dependientes de voltaje por la familia de proteínas MAGUK-DLG como Kv1, Kv4.2, Kir3.1 (Ogawa et al., 2008; Vikstrom et al., 2008; Gardoni et al., 2007) y el canal de K<sup>+</sup> Shaker en *Drosophila* (Tejedor et al., 1997) aún no hay ningún reporte de regulación de canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje por parte de esta familia de proteínas, de manera que no tenemos ningún indicio del mecanismo por el cual *dlg* podría estar realizando esto, si es a través de una interacción directa o por medio de adaptadores. Una posibilidad es que las isoformas de *dlg* se unan directamente a Cacophony. Como se mencionó anteriormente el gen *cacophony* codifica para la subunidad  $\alpha_1$  del canal de Ca<sup>+2</sup> cercano a la familia N-P/Q de vertebrados. Es sabido que además de la subunidad  $\alpha_1$  la cual es la principal ya que posee la región que forma el poro, la maquinaria de gating y la mayoría de sitios a los que se unen las drogas, los canales de Ca<sup>+2</sup> poseen otras subunidades regulatorias que pueden modificar sus propiedades de conducción o su localización como las subunidades  $\alpha_2\delta$  y  $\beta$  (Buraei y Yang, 2010). De las cuales la que más nos llama la atención es la subunidad  $\beta$  debido a que ésta al igual que *dlg* pertenece a la familia MAGUK. La subunidad  $\beta$  de los canales de Ca<sup>+2</sup> esta formada básicamente por cinco regiones de las cuales la primera, la tercera y la quinta son de un largo variable y presentan variaciones en su secuencia, pero la segunda y la cuarta son altamente conservadas y corresponden a un dominio SH3 y a un dominio GUK (Opatowsky et al., 2003). Se ha determinado que la subunidad  $\alpha_1$  se une a la subunidad  $\beta$  por medio de una

región localizada entre el loop I y II llamada AID (Pragnelli et al., 1994). Por otra parte la región de la subunidad  $\beta$  que se une a AID es llamada BID la que esta conformada por los dominios SH3 y GUK antes mencionados de la proteína ( De Waard et al., 1994; De Waard et al.,1996). Se ha visto que la subunidad  $\beta$  regula el tráfico y la localización subcelular del canal (Gao et al., 1999; Gerster et al., 1999) y que puede modificar la apertura o “gating” del canal (Hullin et al., 2003; Zamponi et al., 2007). Dado el hecho que ambas isoformas *d/g* poseen esta región SH3 GUK hace posible que interactúen directamente con cacophony.

## 6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que podemos obtener de este trabajo son las siguientes:

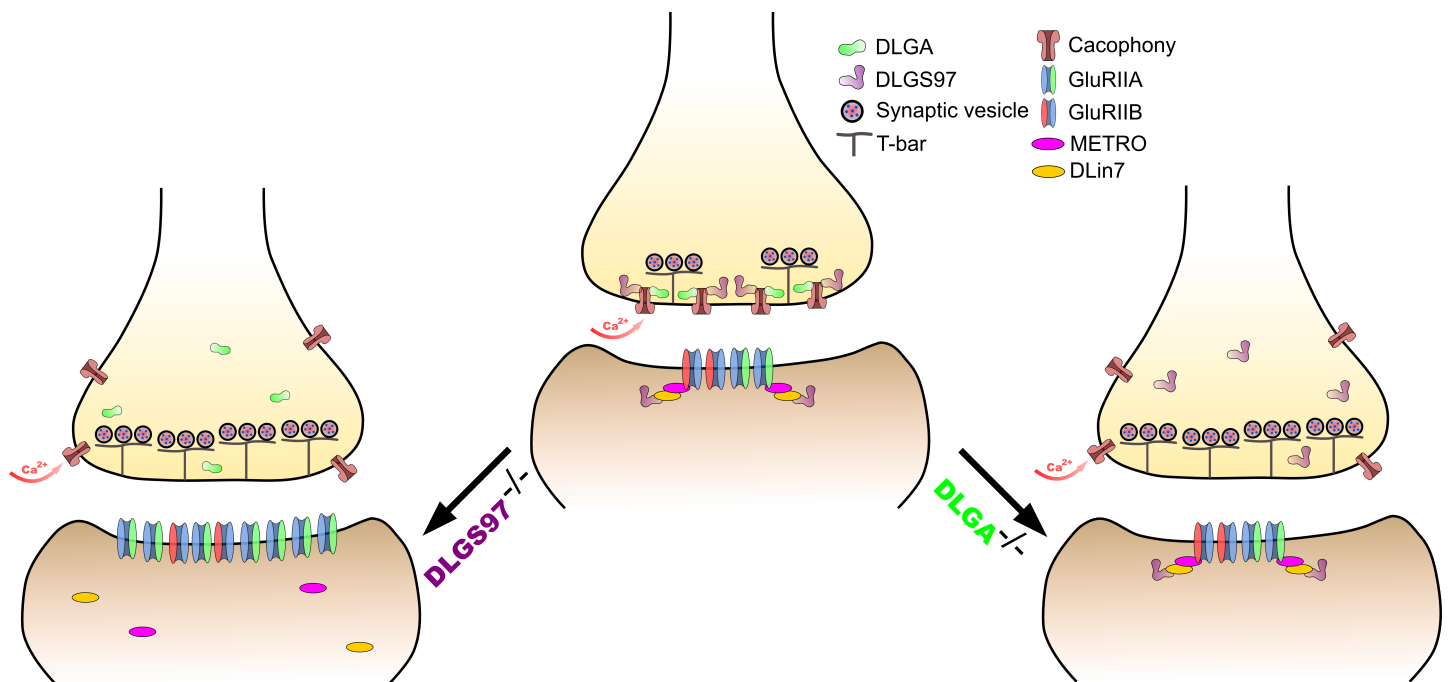
La isoforma DLGS97 es la única que participa en la regulación del tamaño de los campos de receptores de glutamato, probablemente a través de su interacción con DLin7 y METRO.

DLGS97 está probablemente involucrada en la regulación de la abundancia relativa de los GluR en el compartimento postsináptico, favoreciendo la presencia de los receptores tipo GluRIIB por sobre los GluRIIA.

Ambas isoformas de *d/g* son necesarias para una apropiada localización del canal de  $Ca^{+2}$  dependiente de voltaje Cacophony en el terminal presináptico.

De acuerdo los resultados obtenidos en este trabajo y la información previamente publicada proponemos un modelo en el cual tanto la isoforma DLGS97 como DLGA participan en la regulación de la localización del canal de  $Ca^{+2}$  Cacophony, y por ende en la regulación de la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas en el terminal presináptico. Por otra parte DLGS97 participa además en la determinación del tamaño de los clusters de receptores de glutamato postsinápticos,

probablemente mediante su interacción con DLin7 y METRO y en la regulación de la abundancia relativa de los receptores GluRIIA y GluRIIB. (Fig 25). Según nuestro conocimiento por primera vez se demuestra un rol concreto para esta familia de proteínas en el compartimento presináptico.



**FIGURA 25.** Modelo propuesto del rol de las isoformas de *dlg* en la UNM<sub>DL</sub>

## 7. REFERENCIAS

Aoki, C., Miko, I., Oviedo, H., Mikeladze-Dvali, T., Alexandre, L., Sweeney, N., & Brecht, D. S. (2001). Electron microscopy immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-97, and SAP-102 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex. *Synapse*, 40, 239–257.

Alle H, Jonas P, Geiger JR. 2001. PTP and LTP at a hippocampal mossy fiber-interneuron synapse. *Proc Natl Acad Sci* 98: 14708–14713.

Atwood HL, Govind CK, Wu CF. 1993. Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* 24:1008-1024.

Bachmann A, Timmer M, Sierralta J, Pietrini G, Gundelfinger ED, Knust E, Thomas U. 2004. Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J Cell Sci* 117:1899 – 1909.

Bachmann A, Kobler O, Kittel RJ, Wichmann C, Sierralta J, Sigrist SJ, Gundelfinger ED, Knust E, Thomas U. 2010. A perisynaptic ménage à trois between Dlg, DLin-7, and Metro controls proper organization of *Drosophila* synaptic junctions. *J Neurosci*. 30(17):5811-24.

Ball SL, Powers PA, Shin HS, Morgans CW, Peachey NS, Gregg RG. 2002. Role of the  $\beta 2$  subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 43: 1595–1603.

Beierlein M, Fioravante D, Regehr WG. 2007. Differential expression of posttetanic potentiation and retrograde signaling mediate target-dependent short-term synaptic plasticity. *Neuron* 54: 949–959.

Betz W, Bewick G. 1992. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255(5041):200-203.

Boehm R. 1894. Einige beobachtungen über die nervenend-wirkung des curarin. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 35: 16–22.

Bogdanik, L., Mohrmann, R., Ramaekers, A., Bockaert, J., Grau, Y., Broadie, K., Parmentier, M.L. 2004. The *Drosophila* metabotropic glutamate receptor DmGluRA regulates activity-dependent synaptic facilitation and fine synaptic morphology. *J. Neurosci.* 24(41): 9105–9116.

Bollmann J, Sakmann B, Borst J. 2000. Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* 289:953–957.

Brager DH, Cai X, Thompson SM. 2003. Activity-dependent activation of presynaptic protein kinase C mediates post-tetanic potentiation. *Nat Neurosci* 6: 551–552.

Brand A, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS. 1996. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 84(5):757-67.

Budnik, V., Zhong, Y., Wu, C.F. 1990. Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J. Neurosci.* 10: 3754–3768.



Budnik V, Koh YH, Guan B, Hartmann B, Hough C, Woods D, Gorczyca M. 1996. Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron* 17:627– 640.

Budnik V, Ruiz-Cañada C. 2006. The fly neuromuscular junction structure and function . 2 th Edition. Academic Press

Catterall WA. 1998. Structure and function of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24:307-323.

Catterall WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.

Chen K, Featherstone D. 2005. Disc -Large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*. *BMC Biol.* 3:1.

Chetkovich, D. M., Bunn, R. C., Kuo, S. H., Kawasaki, Y., Kohwi, M., & Brecht, D. S. 2002. Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. *J. Neurosci.*, 22, 6415–6425.

Craven S, Brecht D. 1998. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell.* 93(4):495-8.

De Robertis E, Franchi CM .1956. Electron microscope observations on synaptic vesicles in synapses of the retinal rods and cones. *J Biophys Biochem Cytol* 2:307-318.

DelCastillo J, Stark DL 1952. The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. *J Physiol* 116:507-515.

DelCastillo J, Katz B .1954. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.

Delgado R, Latorre R, Labarca P. 1992. K(+)-channel blockers restore synaptic plasticity in the neuromuscular junction of *dunce*, a *Drosophila* learning and memory mutant. *Proc Biol Sci* 250:181-185.

Delgado R, Latorre R, Labarca P. 1994. Shaker mutants lack post-tetanic potentiation at motor end-plates. *Eur J Neurosci* 6:1160-1166.

Delgado R, Maureira C, Oliva C, Kidokoro Y, Labarca P . 2000. Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron* 28:941-953.

De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. 1994. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* 13: 495–503.

De Waard M, Scott VE, Pragnell M, Campbell KP. 1996. Identification of critical amino acids involved in  $\alpha$ 1- $\beta$  interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett* 380: 272–276.

Dodge FAJ, Rahamimoff R .1967 .Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193:419-432.

DiAntonio A, Petersen S, Heckmann M, Goodman C. 1999. Glutamate receptor expresión regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 19:3023-3032.

Eccles JC, Katz B, Kuffler SW. 1941. Nature of the “endplate potential” in curarized muscle. *J. Neurophysiol.* 4:362–87

Edwards F, Konnerth A, Sakmann B. 1990. Quantal análisis of inhibitory synaptic transmiión in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch clamp study. *J. Physiol.* 177:109-128.

Estable C, Reissig M, De Robertis E. 1954. Microscopic and submicroscopic structure of the synapsis in the ventral ganglion of the acoustic nerve. *Exp Cell Res* 6:255- 262.

Fanning A, Anderson J. 1999. Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol.* 11(4):432-9.

Featherstone, D.E., Rushton, E., Rohrbough, J., Liebl, F., Karr, J., Sheng, Q., Rodesch, C.K., Broadie, K. 2005. An essential *Drosophila* glutamate receptor subunit that functions in both central neuropil and neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 25(12): 3199--3208.

Felmy F, Neher E, Schneggenburger R. 2003. Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37:801-811.

Feng T. 1941. Studies on the neuromuscular junction. XXVI. The changes of the end-plate potentila durinag and after prolonged stimulation. *Chin J Physiol* 16:341- 372.

Fioravante D, Regehr WG. 2011. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* Apr;21(2):269-74.

Fiumara F, Milanese C, Corradi A, Giovedi S, Leitinger G, Menegon A, Montarolo PG, Benfenati F, Ghirardi M. 2007. Phosphorylation of synapsin domain A is required for post-tetanic potentiation. *J Cell Sci* 120: 3228--3237.

Gao T, Chien AJ, Hosey MM. 1999. Complexes of the  $\alpha$ 1C and  $\beta$  subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels. *J Biol Chem* 274: 2137--2144.

Frerking M, Borges S, Wilson M. 1997. Are some minis multiquantal?. *J. Neurophysiol.* 78:1293-1304.

Gardoni, F, Mauceri, D, Marcello, E, Sala, C, Di Luca, M, Jeromin, A. 2007. Sap97 Directs the Localization of Kv4.2 to Spines in Hippocampal Neurons: Regulation by Camkii. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 28691-28699.

Garner C, Nash J, Huganir R. 2000. PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biol.* 10:274-280.

Gerster U, Neuhuber B, Groschner K, Striessnig J, Flucher BE. 1999. Current modulation and membrane targeting of the calcium channel  $\alpha 1C$  subunit are independent functions of the  $\beta$  subunit. *J Physiol* 517: 353–368.

Hughes JR. 1958. Post-tetanic potentiation. *Physiol Rev* 38: 91 – 113.

Hullin R, Khan IF, Wirtz S, Mohacsi P, Varadi G, Schwartz A, Herzig S. 2003. Cardiac L-type calcium channel  $\beta$ -subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem* 278: 21623–21630.

Inchauspe CG, Martini FJ, Forsythe ID, Uchitel OD. 2004. Functional compensation of P/Q by N-type channels blocks short-term plasticity at the calyx of held presynaptic terminal. *J Neurosci* 24:10379-10383.

Jahn, R., Lang, T. and Südhof, T. C. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.

Jan LY, Jan YN. 1976. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* 262:189-214.

Jan Y, Jan LY, Dennis MJ. 1977. Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198:87-108.

Jan YN, Jan LY. 1978. Genetic dissection of short-term and long-term facilitation at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75(1):515-9.

Johnston D, Miao-SinWu S. 1995. *Foundations of cellular Neurophysiology*, First Ed. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

Kalkstein J, Magleby K. 2004. Augmentation Increases Vesicular Release Probability in the Presence of Masking Depression at the Frog Neuromuscular Junction. *J Neurosci*. 24(50):11391–11403

Kamiya H, Zucker RS. 1994. Residual Ca<sup>2+</sup> and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603-606.

Kandel ER, Schwarz JH, Jessell T. 2000. *Principles of Neural Science*, 4th Ed. McGraw Hill, New York.

Karunanithi S, Marin L, Wong K, Atwood HL. 2002. Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22:10267–10276.

Katz B, Miledi R. 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* 189:535-544.

Katz B, Miledi R. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.

Kawasaki F, Felling R, Ordway RW .2000. A temperature-sensitive paralytic mutant defines a primary synaptic calcium channel in *Drosophila*. *J Neurosci* 20:4885- 4889.

Kawasaki F, Zou B, Xu X, Ordway RW .2004. Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of *Drosophila*. *J Neurosci* 24:282-285.

Kidokoro Y, Kuromi H, Delgado R, Maureira C, Oliva C, Labarca P. 2004. Synaptic vesicle pools and plasticity of synaptic transmission at the *Drosophila* synapse. *Brain Res Brain Res Rev* 47:18-32.

Koh Y, Popova E, Thomas U, Griffith L, Budnik V. 1999. Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent Phosphorylation. *Cell* 98:353- 363.

Kornau H. C., Schenker L. T., Kennedy M. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD- 95. *Science* 269: 1737–1740

Korogod N, Lou X, Schneggenburger R. 2007. Posttetanic potentiation critically depends on an enhanced  $Ca^{+2}$  sensitivity of vesicle fusion mediated by presynaptic PKC. *Proc Natl Acad Sci* 104: 15923–15928.

Kriebel M, Gross, C.1974. Multimodal distribution of frog miniature endplate potentials in adult, denervated and tadpole leg muscle. *J. Gen. Physiol.*64:85-103.

Kriebel M. 1989. The neuromuscular junction. *Handbook of experimental pharmacology*, Whittaker, V., ed Berlin: Springer-Verlag. pp 537-566.

Kuromi H, Kidokoro Y. 1999. The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* 19:1557-1565.

Lahey T, Gorczyca M, Jia XX, Budnik V. 1994. The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron* 13:823– 835.

Leroy J, Richards MW, Butcher AJ, Nieto-Rostro M, Pratt WS, Davies A, Dolphin AC. 2005. Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for  $\beta 1$  but not for palmitoylated  $\beta 2$ , implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *J Neurosci* 25: 6984–6996, 2

Llinas RR. 1977. Depolarization-release coupling systems in neurons. *Neurosci Res Program Bull* 15:555-687.

Magleby, K.L. and Zengel, J.E. 1976. Stimulation-induced factors which affect augmentation and potentiation of transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 260, 687–717

Magleby KL. 1987. Short-term changes in synaptic efficacy. In *Synaptic function* (ed. Edelman GM, et al.), pp. 21 – 56. Wiley, New York.

Malenka R. C. and Nicoll R. A. 1999. Long-term potentiation a decade of progress? *Science* 285: 1870–1874

Mallart, A. and Martin, A.R. 1968. The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 196, 593–604

Marrus, S.B., Portman, S.L., Allen, M.J., Moffat, K.G., DiAntonio, A. 2004. Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 24(6): 1406--1415.

Martin, JR, Olló, R. 1996. A New *Drosophila*  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase (Caki) Is Localized in the Central Nervous System and Implicated in Walking Speed. *EMBO J* 15: 1865-1876.

Macleod GT, Chen L, Karunanithi S, Peloquin JB, Atwood HL, McRory JE, Zamponi GW, Charlton MP. 2006. The *Drosophila* cacts2 mutation reduces presynaptic  $Ca^{2+}$

entry and defines an important element in Cav2.1 channel inactivation. *Eur J Neurosci* 23:3230-3244.

McMahon HT, Missler M, Li C, Südhof TC. 1995. Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*. 6;83(1):111-9.

McGee A, Topinka J, Hashimoto K, Petralia R, Kakizawa S, Kauer F, Aguilera-Morena A, Wenthold R, Kano M, Brecht D. 2001. PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. *J. Neurosci.* 21:3085-3091.

Mendoza C, Olguin P, Lafferte G, Thomas U, Ebitsch S, Gundelfinger ED, Kukuljan M, Sierralta J (2003) Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J Neurosci [Correction 27(11)]* 23:2093– 2101.

Mendoza-Topaz C, Urra F, Baria R, Albornoz V, Ugalde D, Thomas U, Gundelfinger ED, Kukuljan M, Sierralta J. 2008. DLGS97/SAP97 is developmentally upregulated and is required for complex adult behaviors and synapse morphology and function. *J Neurosciences* 28:304-314.

Monastirioti, M. Gorczyca, J. Rapus, M. Eckert, K. White, V. Budnik. 1995. Octopamine-immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.*, 356 pp. 275–287

Montgomery J, Zamorano P, Garner C. 2004. MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:911–929.

Morabito MA, Sheng M, Tsai LH. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J Neurosci.* 24(4):865-76.



Muller B. M., Kistner U., Kindler S. et al. 1996. SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 17: 255– 265

Nakai J, Ohkura M, Imoto K. 2001. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.*19(2):137-41.

Neher E. 2006. A comparison between exocytic control mechanisms in adrenal chromaffin cells and a glutamatergic synapse. *Pflugers Arch* 453:261-268.

Ogawa Y, Horresh I, Trimmer JS, Brecht DS, Peles E, Rasband M. 2008. Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J Neurosci.* 28(22):5731-9.

Ohshiro T, Yagami T, Zhang C, Matsuzaki F. 2000. Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* 408:593– 596.

Oliva C, Escobedo P, Astorga C, Molina C, Sierralta J. 2012. Role of the MAGUK protein family in synapse formation and function. *Dev Neurobiol.* 2012 Jan;72(1):57-72.

Olsen O, Brecht D. S. 2003. Functional analysis of the nucleotide binding domain membrane-associated guanylate kinases. *J. Biol. Chem.* 278: 6873– 6878

Opatowsky Y, Chomsky-Hecht O, Kang MG, Campbell KP, Hirsch JA. 2003. The voltage-dependent calcium channel  $\beta$  subunit contains two stable interacting domains. *J Biol Chem* 278: 52323–52332.

Pawlu, C., DiAntonio, A., Heckmann, M. 2004. Postfusional control of quantal current shape. *Neuron* 42(4): 607--618.

Peled, E.S. and Isacoff, E.Y. 2011. Optical Quantal Analysis of Synaptic Transmission from Wildtype and Rab3-Mutant *Drosophila* Motor Axons. *Nature Neurosci* 14, 519-26.

Pereda A. 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 250–263

Petersen, S.A., Fetter, R.D., Noordermeer, J.N., Goodman, C.S., DiAntonio, A. 1997. Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron* 19(6): 1237--1248.

Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. 1994. Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha$ 1-subunit. *Nature* 368: 67–70.

Purves D, Augustine G, Fitzpatrick I, Katz A, LaMantia J, McNamara J, Williams S. 2004. *Neurosciences*. 3th Ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Mass.

Qin, G., Schwarz, T., Kittel, R.J., Schmid, A., Rasse, T.M., Kappei, D., Ponimaskin, E., Heckmann, M., Sigrist, S.J. 2005. Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 25(12): 3209--3218.

Rela L, Szczupak L. 2003. Coactivation of motoneurons regulated by a network combining electrical and chemical synapses. *J Neurosci.* Jan 15;23(2):682-92.

Roche J, Packard M, Moeckel-Cole S, Budnik V. 2002. Regulation of Synaptic Plasticity and Synaptic Vesicle Dynamics by the PDZ Protein Scribble

Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC. 1995. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375: 488–493.

Sakaba T, Stein A, Jahn R, Neher E. 2005. Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. *Science* 309:491-494.

Sanford JL, Mays TA, Rafael-Fortney JA.. 2004. CASK and Dlg form a PDZ protein complex at the mammalian neuromuscular junction. *Muscle Nerve*. 30(2):164-71.

Schiff JM. 1858. *Lehrbuch der physiologie des menschen: I. Muskel- und nervenphysiologie*. Schauenburg, Lahr, Germany.

Schnell E., Sizemore M., Karimzadegan S. et al. 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13902–1390

Schneggenburger R, Neher E. 2005. Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr Opin Neurobiol* 15:266-274.

Schuster C, Davis G, Fetter R, Goodman C. 1996. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity I. Fascilin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17:641-654.

Shin OH, Lu J, Rhee JS, Tomchick DR, Pang ZP, Wojcik SM, Camacho-Perez M, Brose N, Machius M, Rizo J, et al. 2010. Munc13 C2B domain is an activity-dependent  $Ca^{+2}$  regulator of synaptic exocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 17: 280–288.

Sigrist S, Thiel P, Reiff D, Lachance P, Lasko P, Schuster C. 2000. Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* 405:1062-1065.

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. 1993 SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318 - 324

Sorensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC, Neher E. 2003. Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114:75-86.

Sudhof TC. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.

Swandulla, D. 1991. Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: fast and slow calcium signaling in nerve terminals. *Neuron* 7, 915–926

Tejedor FJ, Bokhari A, Rogero O, Gorczyca M, Zhang J, Kim E, Sheng M, Budnik V. (1997). Essential role for dlg in synaptic clustering of Shaker K<sup>+</sup> channels in vivo. *J Neurosci* 17:152–159.

Thomas U, Kim E, Kuhlendahl S, Koh YH, Gundelfinger ED, Sheng M, Garner CC, Budnik V. 1997. Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron* 19:787–799.

Vikstrom K, Vaidyanathan R, Levinsohn S, O'Connell R, Qian Y, Crye M, Mills JH, Anumonwo J. 2009. SAP97 regulates Kir2.3 channels by multiple mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(4):H1387-97.

Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E. 2006. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron*. ;49(6):833-44.

Wang D, Maler L. 1998. Differential roles of  $Ca^{+2}$ /calmodulin-dependent kinases in posttetanic potentiation at input selective glutamatergic pathways. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7133–7138.

Wang C, Zucker RS. 1998. Regulation of synaptic vesicle recycling by calcium and serotonin. *Neuron* 21:155–167.

Woods DF, Hough C, Peel D, Callaini G, Bryant PJ. 1996. Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J Cell Biol* 134:1469 –1482.

Wu Y, Kawasaki F, Ordway RW. 2005. Properties of short-term synaptic depression at larval neuromuscular synapses in wild-type and temperature-sensitive paralytic mutants of *Drosophila*. *J Neurophysiol* 93:2396-2405.

Yoshihara, M., Adolfsen, B., Galle, K.T., Littleton, J.T. 2005. Retrograde signalling by Syt 4 induces presynaptic release and synapse-specific growth. *Science* 310(5749): 858--863.

Zamponi GW. 2005. Voltage-Gated Calcium Channels. New York: Landes Bioscience/Eurekah, p. 377.

Zhong Y, Wu CF. 1991. Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *Science* 251:198-201.

Zito K, Fetter R, Goodman C, Isacoff E. 1997. Synaptic clustering of Fasciclin II and Shaker: Essential targeting sequences and role of Dlg. *Neuron* 19:1007- 1016.

Zordan, MA, Massironi, M, Ducato, MG, Te Kronnie, G, Costa, R, Reggiani, C, Chagneau, C, Martin, J, Megighian, A. 2005. *Drosophila* Caki/Comg Protein, a

Homolog of Human Cask, Is Essential for Regulation of Neurotransmitter Vesicle Release. *Journal of Neurophysiology* 94: 1074-1083.

Zucker RS. 1989. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.

Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355- 405