

Expresión y funciones neurales de la variante
DlgS97 del gen *dlg* de *Drosophila*

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Carolina Andrea Mendoza Topaz

Octubre, 2006

Director de tesis: Dra. Jimena Sierralta Jara



UCH-FC
DOC-BMCN
M 539
c-1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

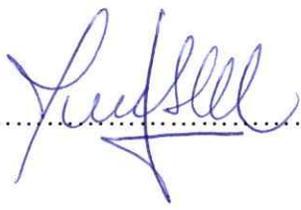
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

CAROLINA ANDREA MENDOZA TOPAZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de septiembre del año 2006

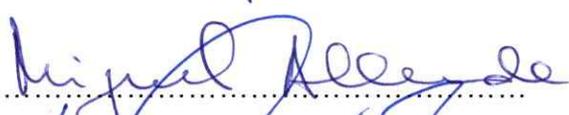
Director de Tesis:

Dra. Jimena Sierralta


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Allende (Presidente)


.....

Dra. Verónica Cambiazo


.....

Dr. Sergio Villanueva


.....

DEDICATORIA

A QUIEN MÁS PODRÍA DEDICAR ESTA TESIS QUE A MI BELLA MADRE.
POR EL ENORME DESEO DE QUE HUBIERA ESTADO CONMIGO,
EN ÉSTE Y EN TODOS LOS MOMENTOS QUE NOS FALTARON.
PARA TÍ MIRE.

BIOGRAFÍA



Nació el 20 de Noviembre del año 1973 en Santiago de Chile. Estudió en el Liceo Experimental Manuel de Salas de donde egresó el año 1991. Durante los años 1992 y 1993 estudió Bioquímica en la Universidad de Santiago, luego continuó sus estudios en la Universidad de Chile de donde egresó el año 1997. Se recibió de Bioquímico el año 1999, luego durante el año 2000 trabajó de ayudante técnico en el laboratorio de la Dra. Jimena Sierralta y el año 2001 ingresó al programa de Doctorado de la Facultad de Ciencias, mención Biología.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Uli Thomas por su ayuda en la transposición, por recibirme tan cálidamente en su laboratorio y por su ejemplo de dedicación al trabajo con las moscas y a la biología molecular.

Al Dr. Chris Doe por recibirme abiertamente en su laboratorio y facilitarme anticuerpos y cepas transgénicas.

Al Dr. Eckart Gudelfinger por facilitar mi estadía en el laboratorio de Uli.

A Valeria Albornoz por la ayuda en los experimentos de fototactismo, por la excelente disposición al trabajo y por la ayuda en la discusión de los resultados.

A Romina Barría y René Vidal por el interés y colaboración en la discusión y planificación de experimentos.

A Patricio Olgúin por su apoyo en los momentos más difíciles y por el constante aporte de ideas al trabajo con las moscas.

A la Dra. Jimena Sierralta por dejarme hacer el trabajo en forma independiente y libre.

A Alvaro Glavic por la enseñanza de genética de moscas.

A Angélica Figueroa por su valiosa ayuda técnica.

A Fernando Vergara por su ayuda cuando "justo" pasaba algo.

A mis amigas Claudia y Nicole.

A mis padres que me apoyaron incondicionalmente en todas mis empresas.

A FONDECYT por la beca para la realización del doctorado (2001-2004) y por la beca AT- 403019 de apoyo a la realización de tesis de doctorado (2003-2004).

A MECESUP por la beca de estadías cortas en el extranjero (2003).

Al Centro de Neurociencias Integradas (CENI) de la Iniciativa Científica Milenio (ICM) por el apoyo financiero para el desarrollo de mi tesis (2005).

Al proyecto ANILLO ACT 47 por la ayuda financiera que permitió terminar mi trabajo (2006).

ÍNDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE MATERIAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1.- FAMILIA DE PROTEÍNAS MAGUK.....	2
2.- PROTEÍNAS MAGUK NEURONALES “TIPO DLG”	4
3.- DISCS-LARGE (<i>DLG</i>).....	7
4.- <i>DLG</i> EN EL MANTENIMIENTO Y FORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA EPITELIAL	8
5.- <i>DLG</i> EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	12
5.1.- <i>dlg</i> EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE LA LARVA.....	12
5.2.- <i>dlg</i> EN LOS PRECURSORES NEURONALES.....	13
6.- VARIANTES DE PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE <i>DLG</i>	17
7.- DOMINIO L27	23
7.1.- PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN A TRAVÉS DE SUS DOMINIOS L27	23
7.2.- PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON EL DOMINIO L27 DE SAP9725	

8.- DLGS97 EN SISTEMA NERVIOSO.....	27
9.- ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL DESARROLLO DE <i>DROSOPHILA</i>	31
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS	33
1.- OBJETIVO GENERAL	33
2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
1.- MANTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE CEPAS DE <i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i>	36
1.1.- MANTENCIÓN CEPAS.....	36
1.2.- CEPAS NATIVAS, MUTANTES Y BALANCEADORES.....	36
1.3.- CEPAS TRANSGÉNICAS.....	37
1.4.- RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	42
1.5.- MICROINYECCIÓN DE <i>dsRNA</i> EN EMBRIONES DE UNA CÉLULA...	42
1.6.- CRUZAS.....	43
1.7.- SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA MANIPULACIÓN Y MANTENCIÓN DE CEPAS Y EMBRIONES.....	49
2.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	50
2.1.- GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS.....	50
2.2.- TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> Y GENERACIÓN DE <i>dsRNAs</i>	51
2.3.- OBTENCIÓN DE RNA, PARTIDORES Y RT-PCR.....	54
2.4.- OBTENCIÓN DNA GENÓMICO	55
2.5.- PCR DNA GENÓMICO.....	55
2.6.- HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	56
2.7.- REACTIVOS Y SISTEMAS COMERCIALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	58
2.8.- SOLUCIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	60
3.- FIJACIÓN E INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES	61
3.1.- FIJACIÓN DE EMBRIONES SIN INYECTAR.....	61
3.2.- FIJACIÓN DE EMBRIONES INYECTADOS.....	62

3.3.- INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES.....	63
3.4.- INMUNOTINCIÓN CEREBROS DE LARVA.....	64
3.5.- MARCAJE DE NEUROBLASTOS MITÓTICOS CON IODURO DE PROPIDIO.....	66
3.6.- REACTIVOS UTILIZADOS EN LA FIJACIÓN E INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES Y CEREBROS DE LARVAS.....	67
3.7.- SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA FIJACIÓN E INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES Y CEREBROS DE LARVAS.....	67
4.- PROTEÍNAS.....	68
4.1.- EXTRACTOS PROTEICOS.....	68
4.2.- SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS.....	69
4.3.- WESTERN BLOTS.....	69
4.4.- SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTS.....	70
5.- ESTUDIOS DE FOTOTACTISMO.....	71
6.- ADQUISICIÓN Y EDICIÓN DE IMÁGENES OBTENIDAS POR MICROSCOPIA.....	72
6.1.- CAMPO CLARO.....	72
6.2.- CONFOCAL.....	73
RESULTADOS.....	74
1.- ANÁLISIS TEMPORAL Y ESPACIAL DE LA EXPRESIÓN DE DLGS97.....	74
1.1.- IDENTIFICACIÓN DE cDNAs EMBRIONARIOS DE <i>dlg</i> POR RT-PCR.....	74
1.3.- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>DlgS97</i> DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	81
2.- PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE DLGS97 POR INYECCIÓN DE dsRNA ...	91
2.1.- OBTENCIÓN dsRNAs.....	91
2.2.- ESPECIFICIDAD dsRNAs EN EMBRIONES.....	91
2.3.- EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE dsRNA-S97N EN EMBRIONES.....	93
3.- SOBREEXPRESIÓN DE DLGS97 EN NEURONAS EMBRIONARIAS.....	97
4.- OBTENCIÓN DE UNA MUTANTE NULA DE DLGS97.....	97
4.1.- CARACTERIZACIÓN CEPA <i>dlg</i> ^{NP7225}	99

4.2.- TRANSPOSICIÓN CEPA <i>dlg</i> ^{NP7225}	100
4.3.- ANÁLISIS DE LAS LÍNEAS OBTENIDAS DE LA TRANSPOSICIÓN...	100
4.4.- CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE <i>DlgS97</i> OBTENIDAS DE LA TRANSPOSICIÓN DE <i>dlg</i> ^{NP7225}	103
DISCUSIÓN	119
1.- REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA TRANSCRIPCIÓN DE <i>dlg</i>	120
2.- EXPERIMENTOS DE RNAi EN EMBRIONES	129
3.- MUTANTES NULAS DE <i>DlgS97</i>	132
4.- ALTERACIONES CONDUCTUALES EN LAS MUTANTES DE <i>DlgS97</i> ..	137
CONCLUSIONES	143
REFERENCIAS	145

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CEPAS DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> UTILIZADAS EN ESTA TESIS	39
TABLA 2: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y RNAs POLIMERASAS UTILIZADAS EN LA OBTENCIÓN DE DSRNAS	53
TABLA 3: PARTIDORES UTILIZADOS.....	56
TABLA 4: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y RNAs POLIMERASAS UTILIZADAS EN LA OBTENCIÓN DE LAS SONDAS PARA LAS HIBRIDACIONES <i>IN SITU</i>	57
TABLA 5: ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA LA INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES Y CEREBROS DE LARVAS	65
TABLA 6: ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS EN LA INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES Y CEREBROS DE LARVAS	66
TABLA 7: ANTICUERPOS UTILIZADOS EN WESTERN BLOTS	70
TABLA 8: ESPECIFICIDAD INYECCIONES DSRNA	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: FAMILIA DE PROTEÍNAS MAGUK	3
FIGURA 2: LARVAS DE TERCER ESTADIO MUTANTES DLG^{XI-2} Y DLG^{M52}	11
FIGURA 3: COMPARACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN CELULAR DE MAMÍFEROS Y DE <i>DROSOPHILA</i>	11
FIGURA 4: FENOTIPOS NEURONALES DE DLG	16
FIGURA 5: DIFERENTES TRANSCRITOS DE DLG DE <i>DROSOPHILA</i>	16
FIGURA 6: LOS TRANSCRITOS $DLG\alpha$ Y $DLGS97$ CODIFICAN LAS VARIANTES DE PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE DLG DE MAYOR LONGITUD	22
FIGURA 7: DOMINIO L27	22
FIGURA 8: LA INYECCIÓN DE $dsRNA-S97N$ PRODUCE DEFECTOS EN LA NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA	30
FIGURA 9: SISTEMA UAS/GAL4 EN <i>DROSOPHILA</i>	41
FIGURA 10: (A) MUTAGÉNESIS POR MOVILIZACIÓN DE UN ELEMENTO P.....	46
(B) ESQUEMA DE CRUZAS REALIZADAS PARA OBTENER UNA MUTANTE NULA DE $DLGS97$ POR MOVILIZACIÓN IMPRECISA DEL ELEMENTO P DE LA CEPA DLG^{NP7225}	46
FIGURA 11: ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN ENTRE LAS MUTANTES HOMOCIGOTAS LETALES OBTENIDAS DE LA TRANSPOSICIÓN Y EL ALELO DLG^{P1699}	47
FIGURA 12: CRUZAS REALIZADAS PARA LA OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES MEIÓTICAS ENTRE EL ALELO DLG^{EXC138} Y $ELAV-GAL4$	48
FIGURA 13: ENSAYO DE FOTOTACTISMO	73
FIGURA 14: PARTIDORES UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS DE RT-PCR DE EMBRIONES	78
FIGURA 15: RT-PCRS DE EMBRIONES POR ESTADIOS.....	79

FIGURA 16: LOS RNAs DE DLGA Y DE VARIANTES CON EXÓN 7 SE EXPRESAN EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	82
FIGURA 17: TRANSCRITOS DE DLGS97 Y DE WORNUI EN SISTEMA NERVIOSO EMBRIONARIO	83
FIGURA 18: DLGS97 Y DLGA EN WESTERN BLOT DE EXTRACTOS PROTEICOS EMBRIONARIOS.....	85
FIGURA 19: INMUNODETECCIÓN DE DLGS97 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	86
FIGURA 20: DLGS97 SE EXPRESA EN EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO	87
FIGURA 21: DLGS97 SE EXPRESA EN SISTEMA NERVIOSO Y NO EN LOS TEJIDOS EPITELIALES	89
FIGURA 22: DLGS97 SE EXPRESA EN UN GRUPO HETEROGÉNEO DE NEURONAS	90
FIGURA 23: OBTENCIÓN DE DSRNA-S97N Y DSRNA-GFP	92
FIGURA 24: DEFECTOS EN LA MIGRACIÓN AXONAL PRODUCIDOS POR LA INYECCIÓN DE DSRNA-S97N.....	95
FIGURA 25: DLGS97 NO SE EXPRESA EN LOS NEUROBLASTOS EMBRIONARIOS Y LA DISMINUCIÓN DE SU EXPRESIÓN POR INYECCIÓN DE DSRNA-S97N NO AFECTA LA UBICACIÓN BASAL DE MIRANDA	96
FIGURA 26: LA SOBREENEXPRESIÓN DE DLGS97 O DE DLGA NO AFECTA LA FORMACIÓN DE LOS FASCÍCULOS AXONALES.....	98
FIGURA 27: LA LÍNEA DLG^{NP7225} PRESENTA UNA MENOR EXPRESIÓN DE DLGS97 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	102
FIGURA 28: LAS LÍNEAS HOMOCIGOTAS LETALES OBTENIDAS DE LA TRANSPOSICIÓN DEL ELEMENTO P EN LA LÍNEA DLG^{NP7225} EXPRESAN DLGS97.....	103
FIGURA 29: LOS EMBRIONES MUTANTES DLG^{EXC138} Y DLG^{EXC5} NO EXPRESAN DLGS97	104
FIGURA 30: MAPEO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN DLG DE LOS ALELOS DLG^{EXC138} Y DLG^{EXC5}	107
FIGURA 31: INMUNOFUORESCENCIA CON LOS ANTICUERPOS DLGS97N Y DLG _{PDZ} EN EMBRIONES MUTANTES DE DLGS97	108
FIGURA 32: EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO DE EMBRIONES MUTANTES DLG^{EXC5} Y DLG^{EXC138} NO PRESENTA DEFECTOS EN LA MIGRACIÓN AXONAL.....	109

FIGURA 33: MENOR INMUNOREACTIVIDAD A FASCICLINA II EN LÓBULO CEREBRAL DE MUTANTES <i>DLG^{EXC138}</i>	116
FIGURA 34: ALTERACIONES EN LA RESPUESTA DE FOTOTACTISMO EN LAS MUTANTES <i>DLG^{EXC138}</i> Y <i>DLG^{EXC5}</i> Y EL RESCATE AL PRIMER MINUTO CON LA EXPRESIÓN NEURONAL DE DLGS97 PERO NO CON DLGA	117
FIGURA 35: OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES <i>DLG^{EXC138}</i> -ELAVGAL4	118
FIGURA 36: <i>DLG^{EXC138}</i> -ELAVGAL4/Y ES MUTANTE DE DLGS97 Y PERMITE LA EXPRESIÓN DE DLGS97 EN NEURONAS	118

ABREVIATURAS

BCIP	= 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
CaMK	= calcio calmodulina quinasa
<i>dlg</i>	= gen <i>discs-large</i>
DlgA	= proteína DlgA
<i>dlgA</i>	= transcrito <i>dlgA</i>
DlgS97	= proteína DlgS97
<i>dlgS97</i>	= transcrito <i>dlgS97</i>
<i>dlg_{S97N}</i>	= anticuerpo que reconoce región S97N de <i>dlg</i>
<i>dlg_{PDZ}</i>	= anticuerpo que reconoce región de los primeros dos dominios PDZs de <i>dlg</i>
<i>dlg^{m52}</i>	= alelo <i>m52</i> mutante de <i>dlg</i>
<i>dlg^{XI-2}</i>	= alelo <i>XI-2</i> mutante de <i>dlg</i>
dsDNA	= DNA de doble hebra (o simplemente DNA)
dNTPs	= desoxinucleótidos trifosfato
dsRNA	= RNA de doble hebra
EST	= Secuencias expresadas marcadas
hrs	= horas
Kb	= kilobases
KDa	= kilodaltons

min	= minutos
NBT	= Nitroblue Tetrazolium
NTP	= nucleótido trifosfato
pb	= pares de bases
PBS	= tampón fosfato salino
PCR	= reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	= transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	= dodecil sulfato de sodio
seg	= segundos
SNC	= sistema nervioso central
ssRNA	= RNA de simple hebra
TAE	= tampón tris-acetato-EDTA
TEMED	= N',N',N',N'-tetrametiletilamina
Tm	= temperatura de desnaturación térmica
UTR	= región no traducida

RESUMEN

Las proteínas citoplasmáticas de andamio se caracterizan por poseer dominios modulares de interacción proteína-proteína que forman complejos proteicos de alto peso molecular y que están ancladas a regiones de la membrana plasmática a través de su interacción con proteínas de membrana. Una superfamilia de proteínas andamio conservadas evolutivamente son las llamadas guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK). Las proteínas de esta familia que se expresan en neuronas agrupan receptores y canales iónicos en la membrana sináptica, organizan las vías de transducción de señales y modulan la plasticidad sináptica. Aunque se ha sugerido la participación de las MAGUKs en neurogénesis no existe evidencia genética contundente que lo apoye.

La primera caracterización molecular de un miembro de esta familia fue *discs-large (dlg)* de *Drosophila*. *dlg* es un gen supresor de tumores, que mantiene la adhesión y polaridad celular, regula la estructura y función sináptica de la sinapsis neuromuscular, y localiza determinantes de destino neural durante la división asimétrica de los precursores neurales. Todas estas funciones han sido atribuidas al único transcrito de *dlg* bien caracterizado, Dlg-A. Sin embargo existen múltiples variantes de

procesamiento alternativo de *dlg*, algunas de las cuales como *dlgS97*, poseen un dominio de interacción proteína-proteína llamado L27.

Considerando que experimentos previos de pérdida de función por inyección de un dsRNA dirigido contra la región del dominio L27 de *dlgS97* indican una participación de *DlgS97* en la migración axonal embrionaria y el hecho de que *DlgS97* se expresa específicamente en neuronas y no en epitelio, en esta tesis nos propusimos estudiar en detalle la expresión de *DlgS97* de *Drosophila* y analizar sus funciones neuronales.

Para cumplir con este objetivo general se analizó la expresión de los transcritos y de las proteínas derivados de *dlg*, los efectos de la pérdida y ganancia de función durante el desarrollo embrionario, y finalmente se generaron y analizaron mutantes nulas de *dlgS97*.

En conjunto, los resultados obtenidos de esta tesis muestran que: (1) Existe una regulación de la expresión temporal y espacial diferente para las variantes de procesamiento *DlgA* y *DlgS97*, siendo la primera de expresión principalmente epitelial y neuronal con un fuerte componente materno, y la segunda de expresión cigótica y principalmente neuronal. (2) *DlgS97* se expresa en un grupo heterogéneo de neuronas maduras y no en los precursores neurales, donde se expresa *DlgA*. (3) *DlgS97* es prescindible para el desarrollo del individuo hasta la edad adulta. (4) La pérdida o la ganancia de función de *DlgS97* no afecta el correcto desarrollo del sistema nervioso ni la migración axonal. (5) Las mutantes de *DlgS97* presentan defectos conductuales que afectan la velocidad de la respuesta locomotora

frente a un estímulo luminoso, los que pueden ser originados en el procesamiento de la información en las sinapsis centrales.

De acuerdo a lo anterior, se concluye que la variante DlgS97 por sí sola no es necesaria para el desarrollo del sistema nervioso, pero no descartamos que pudiera serlo en conjunto con DlgA. Por otra parte, las mutantes de DlgS97 generadas en esta tesis son el material de partida para analizar la función del dominio L27 de las proteínas MAGUKs en neuronas.

ABSTRACT

The main characteristics of the cytoplasm scaffold proteins are their modular protein-protein interaction domains and their ability to form high molecular weight complexes anchored to plasma membrane regions through its interactions with membrane proteins. A conserved large family of such scaffold proteins is the membrane-associated guanylate kinase family (MAGUK). When the proteins of this family are expressed in neurons, they cluster receptors and ionic channels in synaptic membranes, organize signalling transduction pathways and modulate the synaptic plasticity. Although it has been previously suggested, at present there is not strong genetic evidence to support MAGUK involvement in neurogenesis.

The first molecular characterization of a MAGUK member was *Drosophila discs-large* (*dlg*). *dlg* is a tumour suppressor gene, which maintain cellular polarity and cell adhesion, regulates the structure and function of neuromuscular synaptic junction, and localize neuronal fate determinants during the asymmetric cell division of neuronal precursors. All of these functions have been attributed to Dlg-A the only *dlg* transcript well characterized so far. Nevertheless, there are different *dlg* splicing variants,

some of them like dlgS97 have a protein-protein interaction domain called L27.

In view of previous knock down experiments with a dsRNA directed against the L27 domain of dlgS97, which suggested an involvement of DlgS97 in embryonic axon pathfinding, and considering that DlgS97 is expressed specifically in neurons but not in epithelia, we proposed in this thesis to study in detail *Drosophila* DlgS97 expression and to analyze its neuronal functions. For this purpose, To do that, we analyzed *dlg* expression of transcripts and proteins and the effects of the gain and loss of function during embryonic development. Additionally, dlgS97 null mutants were generated and analyzed.

Taken together the results reported in this thesis, show that (1) DlgA and DlgS97 have a different temporal and spatial regulation of their expression; DlgA is expressed mainly in epithelia but also in neurons with strong maternal component, and DlgS97 is expressed zygotically in neurons and muscle. (2) DlgS97 is expressed in a heterogeneous group of mature neurons but not in neuronal precursors where DlgA is expressed. (3) DlgS97 is not necessary to reach the adult stage. (4) The loss or gain of function of DlgS97 does not affect the normal nervous system development neither the axon pathfinding. And (5), the DlgS97 mutants have behavioral defects that affect the velocity of the locomotor response in response to a light stimulus, probably as a consequence of synaptic processing at central nervous system.

In conclusion, DlgS97 alone is not necessary for normal nervous system development, but we cannot exclude that it could participate in this process in concert with DlgA. In addition, the DlgS97 mutants generated in this thesis could be the start point to further analyze the L27 domain function of the neuronal MAGUK proteins.

INTRODUCCIÓN

La formación de los tejidos, la diferenciación celular y la transducción de señales requiere de sitios especializados de adhesión celular en los sitios de contacto célula-célula. Las proteínas citoplasmáticas de andamio se caracterizan por poseer dominios modulares de interacción proteína-proteína, por formar complejos proteicos de alto peso molecular, y por estar ancladas a regiones de la membrana plasmática a través de su interacción con proteínas de membrana. De esta forma, las proteínas de andamio agrupan moléculas de adhesión, receptores y enzimas de señalización intracelular, permitiendo la organización de complejos proteicos macromoleculares en los sitios de unión celular (Garner y col. 2000a, Pawson y Scott 1997, Sheng y Sala 2001, Tepass y col. 2001). Así se asegura la especificidad, aumenta la eficiencia de la señalización y puede además producirse una mayor sensibilidad al agrupar los complejos (Fannig y Anderson 1999, Zhang y Wang 2003). Estas asociaciones proteicas no son estáticas ya que están sujetas a procesos regulatorios dinámicos que las ensamblan y desensamblan (Koh y col. 1999), permitiendo cambiar su composición proteica y su distribución subcelular en respuesta a señales externas o propias del desarrollo.

1.- FAMILIA DE PROTEÍNAS MAGUK

Las proteínas llamadas guanilato quinasas asociadas a membrana (*membrane associated guanylate kinase*, o MAGUK) son una superfamilia de proteínas andamio muy conservada evolutivamente que se caracterizan por la presencia de una región de aproximadamente 300 aminoácidos con homología a la enzima guanilato quinasa (GUK) de levadura pero sin actividad catalítica, además de otros dominios de interacción proteína-proteína: uno a tres dominios PDZs y un dominio SH3 (*Src homology 3*).

El extremo amino terminal de las proteínas MAGUK puede ser variable, como por ejemplo extremo con dominio Ca^{+2} -Calmodulina quinasa II (como CASK), dominio L27 (como SAP97) o sitios críticos de modificación postraduccional (como la palmitoilación de PSD-95). En la figura 1 se esquematiza la familia de proteínas MAGUK de mamíferos, indicando los nombres de sus homólogos en *Drosophila*.

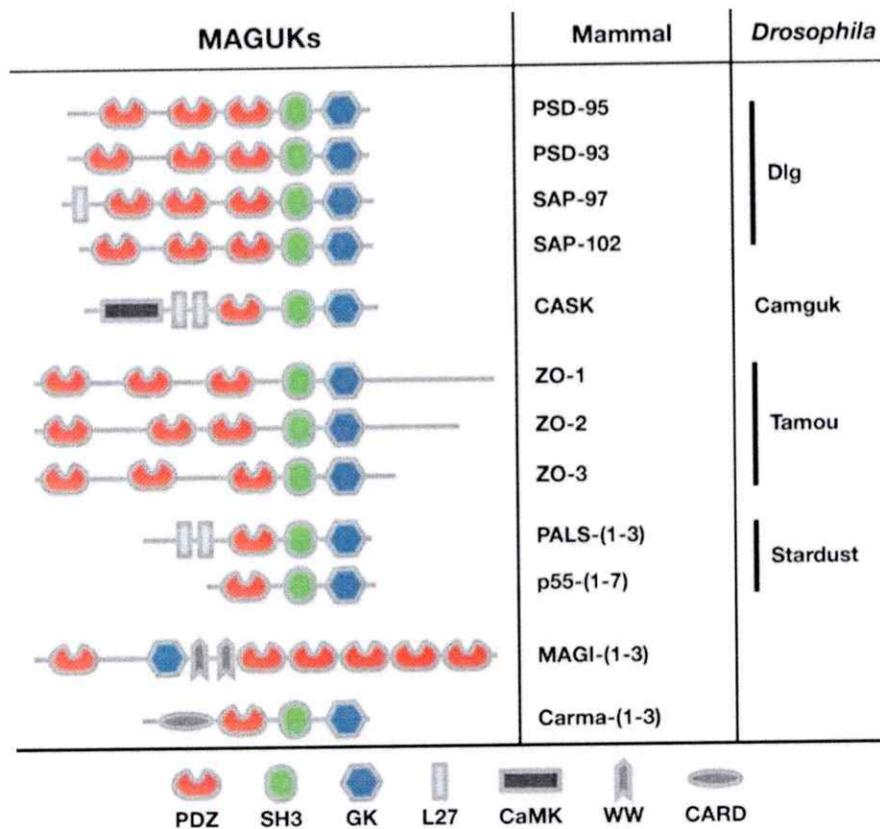


FIGURA 1: Familia de proteínas MAGUK

Esquema con la estructura proteica de los miembros de la familia MAGUK con sus homólogos en *Drosophila*. Se indican los dominios proteicos característicos (adaptado de Funke y col. 2005).

2.- PROTEÍNAS MAGUK NEURONALES “TIPO Dlg”

El tejido de mamíferos donde se expresa la mayor diversidad de proteínas MAGUK es en el sistema nervioso donde existen cuatro proteínas MAGUK que pertenecen a una subfamilia llamada “tipo Dlg” (ver más adelante). Estas proteínas son: SAP97/hDlg, PSD-93/Chapsyn-110, SAP102/NE-Dlg y PSD-95/SAP90. Sólo SAP97 se expresa además de las neuronas en la membrana lateral de las células epiteliales. Todas estas proteínas son llamadas proteínas asociadas a sinapsis (SAP) o de la densidad post-sináptica (PSD) las que a través de sus dominios de interacción proteína-proteína agrupan receptores de glutamato, elementos del citoesqueleto, moléculas de adhesión celular y de señalización (Fannig y Anderson 1999, Garner y col. 2000a, Garner y col. 2000b).

Existe diversa evidencia que sugiere la participación de estas proteínas MAGUK neuronales en (1) la regulación del ensamblaje de los complejos proteicos sinápticos, (2) en la regulación de la plasticidad sináptica y (3) en formación y mantenimiento de las sinapsis (ver revisión en Funke y col. 2005). Los experimentos que indican que estas proteínas regulan la plasticidad sináptica y que participan en la sinaptogénesis han sido estudios de cultivos primarios de neuronas que sobreexpresan la proteína MAGUK (SAP97 o PSD-95) fusionada con GFP, ensayos de funcionalidad presináptica a través de colorantes que permiten visualizar el reciclaje de vesículas y registros

electrofisiológicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de GFP-SAP97 en cultivo primario de neuronas produce un aumento del número de receptores AMPA, un aumento de la función sináptica y un aumento de la frecuencia de los potenciales excitatorios postsinápticos en miniatura (mEPSC) (Rumbaugh y col. 2003, Nakagawa y col. 2004, Regalado y col. 2006). Estos experimentos de sobreexpresión se correlacionan con las conclusiones que se pueden sacar de los experimentos de pérdida de función, ya que en cortes de hipocampo con un RNAi dirigido a SAP97 se produce una disminución del número de receptores AMPA sinápticos y una disminución de los EPSC, inclusive a los tres días de cultivo disminuye el número y densidad de las sinapsis (Nakagawa y col. 2004). Sin embargo, no existe evidencia genética contundente que apoye la participación de las MAGUK en la sinaptogénesis, ya que los ratones nulos de PSD-95 (Migaud y col. 1998) y de PSD-93 (McGee y col. 2001) no presentan defectos en la estructura ni en la transmisión sináptica, pero sí en aprendizaje y memoria. En el caso de los ratones mutantes de SAP97, éstos mueren al nacer (Caruana y Bernstein 2001) pero sus neuronas cultivadas muestran funciones sinápticas normales (Klocker y col. 2002). Esta falta de claridad puede deberse a la redundancia molecular, y sólo podrá resolverse una vez que se obtengan ratones nulos para todas las MAGUK neuronales.

La expresión de las cuatro proteínas MAGUKs "tipo Dlg" en cerebro de mamíferos se superpone regionalmente, con la aparente excepción de las neuronas de Purkinje cerebelares que sólo expresan PSD-93 (McGee y col.

2001). En lo referente a localización subcelular, todas se expresan principalmente en la densidad post-sináptica, pero SAP97 y SAP102 también se expresan abundantemente en citoplasma y asociadas a membranas intracelulares (Sans y col. 2001). Esta diferencia se ha explicado a través de las modificaciones postraduccionales de sus extremos amino terminal que alteran sus propiedades de interacción proteína-proteína y proteína-membrana; sólo PSD-95 y PSD-93 se palmitoilan, mientras que el extremo amino terminal de SAP102 forma dedos de zinc (El-Husseini y col. 2000b, El-Husseini y col. 2000c).

Funcionalmente estas MAGUK neuronales no son equivalentes entre sí, es decir algunas tienen funciones específicas que pareciera que las otras no poseen. Esto se ha determinado a través del análisis de las interacciones que establecen con otras proteínas. Por ejemplo se sabe que PSD-95, pero no SAP97 se une directamente -entre otras proteínas- a nNOS, stargazina, neuroligina y receptores NMDA. Por otro lado, SAP97 pero no PSD-95 se une directamente con el receptor AMPA GluR1, AKAP (molécula de unión a PKA) y proteína 4.1 de unión a actina (ver revisión en Funke y col. 2005). Sin embargo, la regulación de las funciones de las proteínas MAGUK neuronales "tipo Dlg" y la manera como se integran estas funciones durante el desarrollo y en actividad son bastante más complejas de lo que aparentan. Esto se debe a las asociaciones entre los diferentes complejos proteicos que agrupan cada una de las MAGUK por separado y al hecho de la activa regulación que se realiza por

las diferentes modificaciones postraduccionales como fosforilación, palmitoilación, etc. A modo de ejemplo, recientemente se ha descrito una interacción directa entre el dominio SH3 de PSD-95 y el extremo amino terminal de SAP97 que ha llevado a sugerir una participación de ambas proteínas en el tráfico sináptico de los receptores AMPA (Cai y col. 2006).

3.- DISCS-LARGE (*dlg*)

La primera caracterización molecular de un miembro de la familia MAGUK fue *discs-large (dlg)* de *Drosophila*. Es por esto que las proteínas homólogas de vertebrados SAP97, PSD-93, SAP102 y PSD-95 (las "tipo Dlg") fueron llamadas también Dlg 1, Dlg 2, Dlg 3 y Dlg 4 respectivamente.

Existen varios alelos con mutaciones en *dlg*. Las mutantes *dlg^{XI-2}* y *dlg^{m52}* corresponden a las mutaciones de *dlg* con los fenotipos mas severos; letalidad en homocigosis en 3^{er} y 2^o estadio larval respectivamente. El homólogo de *dlg* de *Drosophila* es SAP97, tanto por su homología en secuencia como porque la expresión de SAP97 en mutantes de *dlg* revierte el fenotipo mutante tanto en epitelio y unión neuromuscular (Thomas y col. 1997, ver más adelante).

Existe una gran cantidad de evidencia que indica que cuando se pierde la arquitectura celular se pierde el control de la proliferación celular, es decir las células necesitan responder a señales externas para proliferar de una manera

coordinada. Las mutantes de *dlg* pierden la polaridad epitelial y presentan un crecimiento neoplásico del epitelio de los discos imaginales de la larva, que son los tejidos que originan las distintas estructuras en el adulto (Woods y Bryant 1989, ver figura 2A que muestra una larva gigante *dlg*^{XI-2}). Es por esto que *dlg* ha sido definido como un gen supresor de tumores (ver revisión en Bilder 2004).

4.- *dlg* EN EL MANTENIMIENTO Y FORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA EPITELIAL

Las uniones estrechas de las células de vertebrados son abundantes en proteínas MAGUK de otras subfamilias como ZO, PALS y MAGI, las que controlan la polaridad celular epitelial, organizan complejos proteicos que permiten el ensamblaje de las uniones estrechas y regulan la permeabilidad paracelular (ver revisión en Funke y col. 2005). Como se dijo anteriormente, SAP97/hDlg es la única proteína MAGUK "tipo Dlg" que se expresa además de en las neuronas en las uniones estrechas de los epitelios de vertebrados, a la vez que es la homóloga estructural y funcional de Dlg de *Drosophila* que también se expresa en neuronas y epitelios (Woods y Bryant 1991).

Una de las funciones de *dlg* mejor caracterizada es el mantenimiento de la polaridad de los epitelios donde forma parte integral de un tipo de unión intercelular de insectos llamada unión septada (figura 3A). Este tipo de unión

intercelular actúa como barrera de difusión trans-epitelial y establece y/o mantiene la polaridad y adhesión celular (ver revisión en Tepass y col. 2001). A pesar que en cordados no existe una estructura homóloga a las uniones estrechas de vertebrados puede considerarse a las uniones septadas como sus equivalentes funcionales.

Dlg es crucial para el mantenimiento de las uniones septadas (ver figura 2B) y para la localización de otras proteínas propias de estas uniones (Tepass y col. 2001, Woods y col. 1996). A través de estudios con moscas transgénicas que expresan diferentes formas alteradas de Dlg tanto en un fondo genético mutante para mantener la integridad epitelial como en un fondo genético mutante de *dlg* para analizar el rescate de la formación de tumores, se determinó que cada uno de los dominios de Dlg tiene un papel específico en la regulación de la estructura y del crecimiento del tejido epitelial (Hough y col. 1997). Así, la región entre los dominios SH3 y GUK llamada región HOOK es la que actúa como señal de anclaje de Dlg a la membrana a través de su interacción con el citoesqueleto, los dominios PDZ1 y 2 unen el extremo carboxilo terminal de algunas proteínas transmembrana que poseen sitio de unión a PDZ, el dominio SH3 es esencial para el establecimiento o mantenimiento de la unión septada, mientras que las funciones específicas del dominio GUK son menos claras. Estos mismos análisis con moscas transgénicas han permitido sugerir que las funciones de mantenimiento de la estructura se pueden desacoplar de las funciones de control de la proliferación

(Hough y col. 1997), es decir que el exceso de proliferación que se observa en las mutantes de *dlg* puede no ser una consecuencia de la pérdida de estructura epitelial, sino que el reflejo de una función directa de *dlg* en el control de la proliferación. Hasta el momento no se sabe como *dlg* controlaría la proliferación en forma independiente de la polaridad celular. Una posibilidad podría ser a través del control del ciclo celular, considerando que en Brumby y col. 2004 los autores describen un análisis genético que identifica a *dlg* entre otros genes reguladores de la entrada en fase S del ciclo celular de *Drosophila* (a través de la su acción negativa sobre ciclina E). Por otro lado, en vertebrados existe variada evidencia de la asociación entre proteínas MAGUKs y oncoproteínas virales y otras proteínas involucradas en la formación de tumores, como la asociación de hDlg con la proteína supresora de tumores APC y la oncoproteína HPV E6 (Kiyono y col. 1997).

En los tejidos epiteliales se ha descrito la existencia de un complejo trimérico evolutivamente conservado Dlg - Scrib (*Scribble*) - Lgl (*Letal-giant-larvae*) (ver figura 3B) en el que cada componente participa de manera cooperativa en el mantenimiento de la polaridad epitelial y en la proliferación celular. Aunque no se conocen los mecanismos moleculares directos, se sabe que este complejo actúa como un centro coordinador entre la salida del ciclo celular y el mantenimiento de la citoarquitectura (Bilder y col. 2000, Bilder 2004, Tepass y col. 2001).

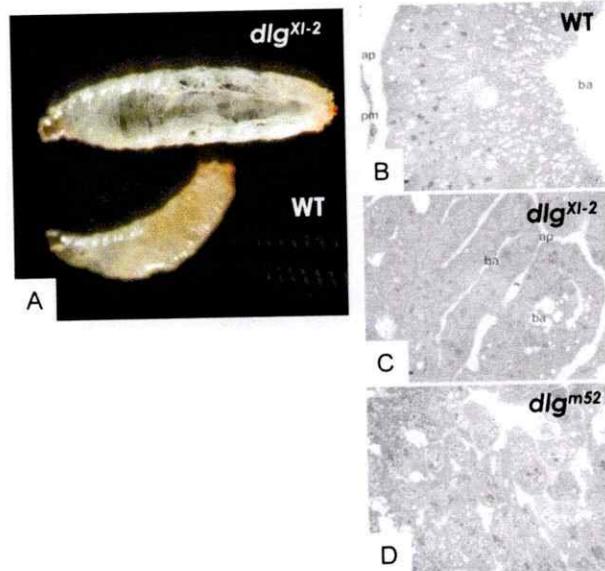


FIGURA 2: Larvas de tercer estadio mutantes *dlg*^{XI-2} y *dlg*^{m52}

(A) Larvas *dlg*^{XI-2} (arriba) y nativa (abajo). Nótese el mayor tamaño de la larva *dlg*^{XI-2}. (B-D) Imágenes de microscopía electrónica de epitelio de disco imaginal de ala de larva nativa (B), *dlg*^{XI-2} (C) y *dlg*^{m52} (D). En las mutantes de *dlg* se produce una pérdida parcial (C) o total (D) de la estructura epitelial (B-D adaptado de Woods y col. 1996).

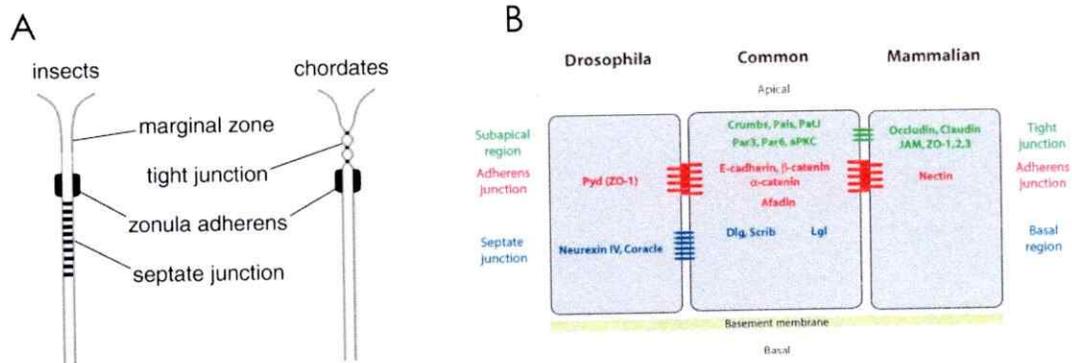


FIGURA 3: Comparación entre las proteínas de unión celular de mamíferos y de *Drosophila*

(A) Comparación entre los complejos de unión apical de insectos y de cordados (tomado de Tepass y col. 2001). (B) Algunas de las proteínas presentes en cada complejo de unión. Las proteínas comunes, entre las que se encuentra Dlg, se muestran al centro (tomado de Humbert y col. 2003).

5.- *dlg* EN EL SISTEMA NERVIOSO

Además de las funciones epitelial y supresora de tumores, las mutantes de *dlg* poseen defectos en el desarrollo neural. La pérdida completa de *dlg* (componente materno y cigótico) se asocia a defectos graves en la neurogénesis y en el establecimiento de la conectividad neuronal del sistema nervioso del embrión (Perrimon 1988). Sin embargo en los embriones mutantes de la línea germinal no es posible distinguir si el fenotipo neuronal es una consecuencia directa de la mutación en *dlg* sobre el desarrollo del sistema nervioso o si es una consecuencia indirecta del incorrecto desarrollo del ectodermo.

5.1.- *dlg* EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DE LA LARVA

Los primeros estudios que indican la participación de las proteínas MAGUK en la formación de las sinapsis provienen de los estudios realizados con mutantes de *dlg*, los que se han centrado en el papel que cumple en el mantenimiento estructural y funcional de la sinapsis neuromuscular de la larva. Esta sinapsis ha sido estudiada como un modelo de sinapsis central de vertebrado debido a que es glutamatérgica.

Dlg se expresa tanto pre como postsinápticamente en la unión neuromuscular y participa en la organización del retículo subsináptico,

estructura membranosa equivalente funcionalmente a la densidad postsináptica de vertebrados. Esto se ha establecido a través de estudios en los alelos mutantes *dlg^{XI-2}* y *dlg^{m52}* que presentan un retículo subsináptico poco desarrollado y simple, conjuntamente con potenciales postsinápticos evocados mayores debidos a un aumento en la liberación de neurotransmisor (Budnik y col. 1996, Lahey y col. 1994).

Las principales proteínas asociadas a *dlg* en la unión neuromuscular son el canal de potasio tipo Shaker (Tejedor y col. 1997) y la molécula de adhesión celular Fasciclina II (Thomas y col. 1997, Zito y col. 1997), a los que se une a través de sus dominios PDZ 1 y 2. Por una parte *dlg* es necesario para el agrupamiento de éstos canales en la unión neuromuscular, lo que podría explicar la mayor excitabilidad observada en las mutantes de *dlg*, y por otra parte *Dlg* localiza a la proteína Fasciclina II pre y postsinápticamente permitiendo que Fasciclina II controle el crecimiento y estabilidad sináptica (Schuster y col. 1996).

5.2.- *dlg* EN LOS PRECURSORES NEURONALES

Las únicas funciones neuronales de *dlg* descritas durante la embriogénesis son en el establecimiento de la polaridad que da origen a la asimetría apico-basal de la división de los neuroblastos (Ohshiro y col. 2000, Peng y col. 2000, y figura 4B) y en la asimetría planar de las células

precursoras de los órganos sensoriales periféricos del adulto (células SOP, Bellaiche y col. 2001).

Los neuroblastos se deslaminan desde el neuroectodermo ventral, en 5 olas de divisiones mitóticas. Las divisiones de los neuroblastos son asimétricas: después de cada división en el plano dorso ventral, la célula apical se mantiene como un neuroblasto multipotente, mientras que la célula basal genera una célula madre ganglionar (GMC) que posee un potencial de desarrollo más restringido. Los neuroblastos difieren de las GMCs en tamaño, potencial mitótico y expresión génica. La asimetría en los precursores neurales se debe a la distribución subcelular diferencial de componentes basales y apicales. Durante la mitosis de los neuroblastos un complejo de proteínas apicales orienta el huso mitótico y ubica determinantes de destino celular a la corteza basal (Bilder 2001a, Bilder 2001b, Jan y Jan 1998, Lu y col. 2000, Wodarz 2002). En los neuroblastos *dlg* actúa localizando corticalmente a *Lgl*, que al igual que *Dlg* es una proteína supresora de tumores que se expresa en epitelio y neuroblastos (ver último párrafo capítulo 4). *Lgl* por su parte determina la localización basal durante la mitosis de las proteínas Miranda y Pon, las que a su vez determinan la localización de Prospero y Numb respectivamente. Así, Miranda, Pon, Prospero y Numb son proteínas necesarias para el establecimiento del destino neural de las GMCs. La localización de los componentes apicales Baz (*bazooka*), dmPar-6, DaPKC, Insc (*inscuteable*) y Pins (*partner of inscuteable*) en los neuroblastos es independiente de la

localización de Lgl (ver revisión en Jan y Jan 2001). Por lo tanto, *dlg* determina la localización apropiada de componentes basales del neuroblasto mitótico, participando así en la correcta especificación intrínseca del destino neural. Se desconoce el mecanismo por el cual *Dlg* localiza corticalmente a Lgl en los neuroblastos y también se desconoce el tipo de interacción que se establece entre ambas proteínas.

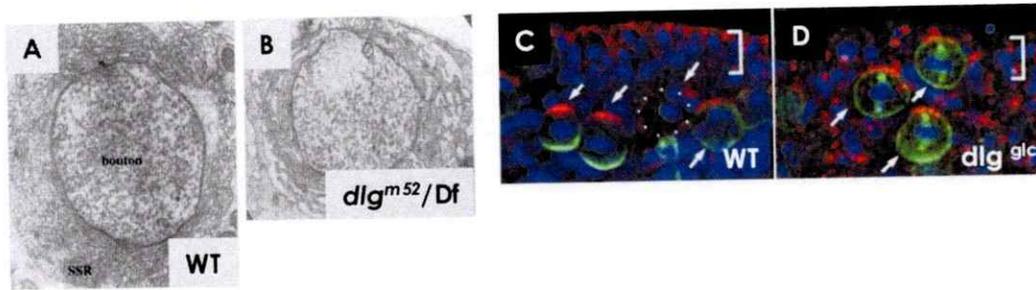


FIGURA 4: Fenotipos neuronales de *dlG*

Botones sinápticos de la unión neuromuscular de larvas de 3^{er} estadio nativa (A) y mutante *dlG^{m52}/Df* (B) donde se observa un menor desarrollo del retículo subsináptico (SSR) (adaptado de Budnik y col. 1996). (C-D) Neuroblastos mitóticos embrionarios. Miranda (verde) se localiza basalmente en neuroblastos mitóticos nativos (C) y se deslocaliza en toda la corteza de los neuroblastos mutantes de la línea germinal de *dlG* (D) (adaptado de Ohshiro y col. 2000).

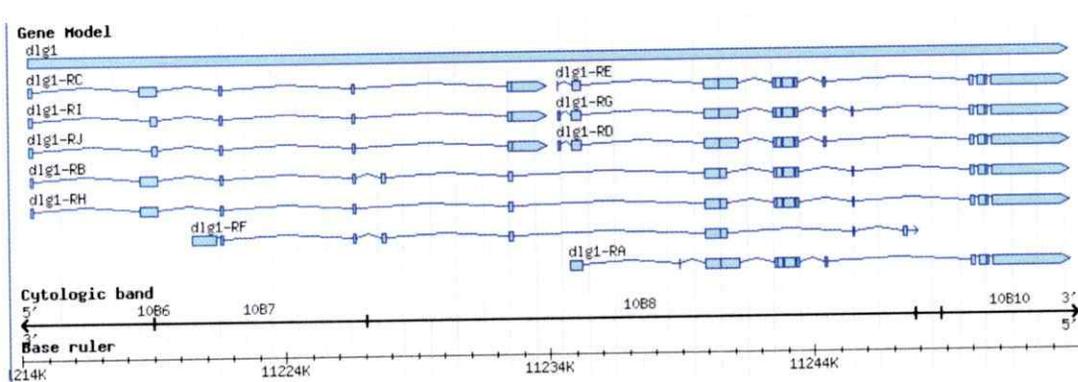


FIGURA 5: Diferentes transcritos de *dlG* de *Drosophila*

Región genómica del cromosoma X (10B6-10) correspondiente al gen *dlG* (*dlG1*) de *Drosophila* y las variantes de procesamiento que se originan de él (obtenido de la página web de flybase, <http://flybase.bio.indiana.edu/>). *dlG1*-RC, RI, RJ, RB, RH y RF codifican para variantes con dominio L27. Los exones se numeran correlativamente de 5' a 3' del número 1 al 24. El exón A (previo al 1) y el exón B (previo al 8) corresponden a exones no traducidos. Sólo la variante llamada *dlG1*-RF posee exón 2.

6.- VARIANTES DE PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE *dlg*

Se han descrito variantes de procesamiento en los homólogos mamíferos de Dlg: SAP97 (rata, Muller y col. 1995) y hDlg (humano, Lue y col. 1994, Lue y col. 1996). Las variantes de procesamiento de ambas difieren en el uso alternativo de exones en tres sitios diferentes que pueden regular interacciones intramoleculares y la unión de proteínas que interactúan con el dominio GUK (McLaughlin y col. 2002). Dos de los tres sitios están localizados en el extremo amino terminal antes del primer dominio PDZ y el tercero está localizado entre los dominios SH3 y el dominio GUK, en la región HOOK. Los dominios HOOK-GUK son capaces de interactuar intramolecularmente impidiendo que el dominio GUK se una a las proteínas con las que interactúa (Wu y col. 2000). Las regiones del dominio amino terminal compiten *in vitro* con el dominio GUK por su interacción con HOOK, permitiendo su libre interacción con otras proteínas. El procesamiento alternativo en la región HOOK y en la región amino terminal podría interferir con estas interacciones intramoleculares (Lue y col. 1994, Wu y col. 2000).

Las variantes de procesamiento alternativo de las proteínas MAGUK "tipo Dlg" se expresan en las neuronas y cumplen funciones diferentes, con lo que aumenta aún más la heterogeneidad y complejidad de las agrupaciones proteicas sinápticas. Por ejemplo, la variante de PSD-95 que se palmitoila en el

extremo amino terminal es la variante llamada PSD-95 α y su palmitoilación se relaciona con la fuerza sináptica y la regulación de la plasticidad dependiente de actividad (El-Husseini y col. 2002), mientras que la variante de procesamiento PSD-95 β en vez del sitio de palmitoilación posee un dominio de interacción proteína-proteína L27 en vez del sitio de palmitoilación (ver más adelante). Así, PSD-95 β se localiza postsinápticamente por un mecanismo distinto a través de su interacción con proteínas diferentes a las que interactúan con PSD-95 α (Chetkovich y col. 2002). Por otro lado, se han descrito dos variantes de procesamiento de SAP97 que difieren en su región HOOK y que se expresan en neuronas. Una variante se expresa principalmente en soma y dendritas y posee un inserto llamado I2, mientras que la variante con el inserto llamado I3 se expresa principalmente en espinas dendríticas. Sólo la variante con el inserto I3 posee el sitio de unión a la proteína 4.1 y es la variante responsable del aumento de la expresión de los receptores AMPA y del aumento de la transmisión sináptica causado por la sobreexpresión de SAP97 (Rumbaugh y col. 2003).

Los análisis de Northern blot de *dlg* de *Drosophila* indican la presencia de al menos cinco transcritos de diferente tamaño molecular (Woods y Bryant 1989), y los análisis de Western blot indican la existencia de varios productos génicos (Koh y col. 1999, Lahey y col. 1994, Mendoza y col. 2003). El análisis de cDNAs completos obtenido de ESTs y de RT-PCR ha revelado la existencia de una serie de variantes de procesamiento alternativo del gen *dlg* (figura 5).

Los sitios de inserción de los exones alternativos de *dlg* son los mismos que se han descrito en vertebrados. Algunas variantes de procesamiento como *dlgS97* codifican para un extremo amino terminal llamado S97N que no está presente en Dlg-A. Esta región incluye a otro dominio de interacción proteína-proteína llamado L27 (ver más adelante). DlgA se diferencia de DlgS97 principalmente por el dominio L27 presente sólo en esta última proteína (figura 6).

Todas las funciones de *dlg* (supresión de tumores, mantenimiento de la polaridad epitelial, sinaptogénesis, etc.) han sido atribuidas al transcrito Dlg-A lo que se ha hecho por medio del análisis de mutantes y del uso de anticuerpos, uno desarrollado contra el dominio SH3-GUK (Woods y Bryant 1991) y otro contra el dominio PDZ1-PDZ2 (Koh y col. 1999). Los estudios genéticos con los alelos más severos de *dlg* han establecido que *dlg* en la mutante *dlg^{XI-2}* pierde parcialmente su función, mientras que la mutante *dlg^{m52}* se comporta como un alelo nulo. *dlg^{XI-2}* posee una mutación al principio del dominio GUK que determina el término prematuro de la traducción de la proteína, mientras que en el alelo *dlg^{m52}* la mutación produce un codón de término en el dominio PDZ3 y se produce, en muy bajos niveles, una proteína de menor tamaño

Las funciones pleiotrópicas que se han atribuido a *dlg* podrían explicarse por: (1) la interacción de Dlg con diferentes proteínas en diferentes tejidos (músculo, epitelios, neuronas), (2) la existencia de diferentes variantes de procesamiento alternativo, que expresadas en cada tejido den cuenta de una funcionalidad diferente, ya que el procesamiento alternativo -especialmente de

proteínas con dominios PDZ en sistema nervioso- es una fuente importante de diversidad funcional (ver revisión en Sierralta y Mendoza 2004), ó (3) una combinación de las dos situaciones anteriores.

Algunas de las proteínas con las que interactúa Dlg como Lgl, Pins (Bellaiche y col. 2001), Scrib etc. se expresan en precusores neurales, neuronas, músculo y epitelio, por lo que no son la causa de una funcionalidad diferente de Dlg en los diferentes tejidos. Por otro lado a través del análisis de la expresión de las proteínas que contienen la región S97N en *Drosophila* utilizando un anticuerpo dlg_{S97N} , se ha determinado que la región S97N que contiene el dominio L27 se expresa en tejido nervioso y muscular (Mendoza y col. 2003), en contraste con los análisis que utilizan los anticuerpos dlg_{PDZ1} y $dlg_{SH3-GUK}$ que muestran además una fuerte expresión en las uniones septadas de todos los epitelios. Como se dijo anteriormente, las mutantes disponibles de *dlg* tienen mutaciones en regiones 3' del gen que son comunes a la mayor parte de los productos génicos y por lo tanto afectan a todas las proteínas resultantes. De manera que el fenotipo mutante es más bien la consecuencia de la alteración de la expresión de varias proteínas distintas, con patrones de expresión diferentes, y no de una proteína única y ubicua.

Por lo tanto, DlgA podría ser la principal o quizás la única variante que se exprese en los epitelios y ser la responsable del mantenimiento de la polaridad epitelial y del control del crecimiento celular, mientras que DlgS97 podría ser la

principal o única variante que se exprese en los precursores neurales y en las neuronas y ser la responsable de las funciones neurales de *dlg*.

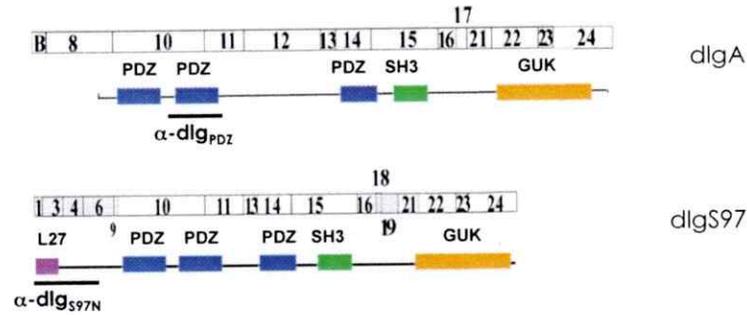


FIGURA 6: Los transcritos *dlgA* y *dlgS97* codifican las variantes de procesamiento alternativo de *dlg* de mayor longitud

Composición exónica de los transcritos *dlgA* y *dlgS97* y representación de los dominios proteicos que codifican para cada uno; PDZs en azul, SH3 en verde, guanilato quinasa (GUK) en amarillo y L27 en rosado. Exones grises sólo se encuentran en *dlgS97* y no en *dlgA*. Se indica además la zona para la cual están dirigidos los anticuerpos α -*dlgS97N* y α -*dlgPDZ* utilizados en esta tesis.

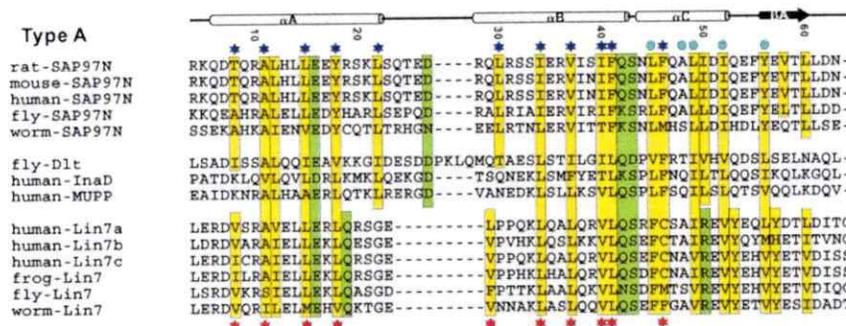


FIGURA 7: Dominio L27

Alineamiento de secuencia del dominio L27 basado en la estructura (adaptado de Feng y col. 2004). La subfamilia de proteínas con sólo un L27 (tipo A) se alinean mejor entre ellas que las que poseen 2 dominios L27 (tipo B, no mostrado). Residuos hidrofóbicos altamente conservados están destacados en amarillo y otros residuos conservados en verde. Nótese la alta homología entre el amino terminal de SAP97 de rata y el de *DlgS97* de *Drosophila* (llamado aquí fly-SAP97N). Estrellas y círculos señalan diferentes residuos importantes para la formación de los heterotetrámeros de L27.

7.- DOMINIO L27

Originalmente descrito en las proteínas de *C. elegans*, Lin-2 y Lin-7 (de allí su nombre), el dominio L27 ha sido descrito como un dominio de heterodimerización conservado evolutivamente y que sirve como plataforma para la formación de grandes complejos moleculares, permitiendo el establecimiento y mantenimiento de la polaridad subcelular tanto en células epiteliales como en neuronas (Feng y col. 2004, Doerks y col. 2000, y figura 7).

7.1.- PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN A TRAVÉS DE SUS DOMINIOS L27

7.1.1.- PALS1 - PATJ

En epitelios de vertebrados existe un complejo formado por las proteínas PALS1, PATJ y Crumbs que también existe en *Drosophila* (proteínas Sdt, Dlt y Crumbs, respectivamente). PALS1 es una proteína MAGUK que posee dos dominios L27 (L27N y L27C) en su extremo amino terminal, L27N se une con el único dominio L27 de PATJ, una proteína con múltiples dominios PDZ. El único dominio PDZ de PALS1 se une con Crumbs una proteína apical de transmembrana. El complejo PALS/PATJ/Crumbs junto con el formado por las proteínas PAR-3/aPKC/PAR-6 son necesarios para el establecimiento de la

polaridad epitelial en las diferentes especies analizadas (ver revisión en Knust y Bossinger 2002).

7.1.2.- mLin-2 - mLin-7

mLin-2 (o Cask) es una proteína MAGUK que fue identificada originalmente en el nematodo *C. elegans* (Lin-2) como parte del complejo formado con las proteínas Lin-7 y Lin-10. El complejo Lin-2/Lin-7/Lin-10 es necesario para la localización del receptor tirosina quinasa LET-23 en la superficie basolateral de las células precursoras de la vulva de *C. elegans* (Kaech y col. 1998). mLin-2/Cask (llamado Camguk o Caki en *Drosophila*) posee un dominio CaMK, dos dominios L27, tres dominios PDZs, un dominio SH3 y un dominio GUK (ver figura 1). Lin-7 es una proteína pequeña que posee un dominio L27 y un dominio PDZ y Lin-10 es una proteína con un dominio PTB y dos dominios PDZs. El segundo dominio L27 de mLin-2/Cask (L27C) se asocia con el dominio L27 de mLin-7 también llamado MALS o Veli (Dlin-7 en *Drosophila*) y a su vez el dominio CaMK de Cask se asocia a la proteína mLin-10/Mint.

Se ha demostrado la existencia de este mismo complejo tripartito en inmunoprecipitados de extractos proteicos de cerebro de mamíferos y se ha propuesto que éste actuaría como sitio de nucleación para el ensamblaje de proteínas involucradas en la exocitosis de vesículas sinápticas y en la formación de las uniones sinápticas, es decir, relacionando la exocitosis de las vesículas sinápticas con la adhesión celular (Butz y col. 1998). mLin-7 a través de su

dominio PDZ se une a la subunidad NR2B de los receptores de glutamato tipo NMDA. mLin-10 a su vez se une a través de uno de sus dominios PDZs a la proteína motor KIF-17. De este modo KIF-17 transporta las vesículas con receptores NMDA hacia las dendritas (Setou y col. 2000, ver revisión en Harris y Lim 2001). Por lo tanto, las proteínas del complejo Lin-2/Lin-7/Lin-10 se asocian entre sí a través de sus dominios L27 y CaMK, permitiendo que los dominios PDZs, SH3 y GUK queden libres para interactuar con otras proteínas.

Recientemente se ha sugerido que el complejo formado por las proteínas Caki/MALS/Mint (Lin-2/Lin-7/Lin-10 de mamíferos) regula la liberación de neurotransmisor a través de la asociación de MALS con la proteína Liprin- α , proteína que organiza la zona activa presináptica (Olsen y cols. 2006, revisión en Olsen y col. 2006). Del mismo modo a través de estudios electrofisiológicos en mutantes Caki se ha asociado a la proteína Caki de *Drosophila* con la regulación de la liberación de vesículas de neurotransmisor (Zordan y col., 2005)

7.2.- PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON EL DOMINIO L27 DE SAP97

De las proteínas descritas como proteínas de asociación al dominio L27 de SAP97, mLin2/Cask es de la que más información se dispone. Ambas proteínas, SAP97 y mLin-2/Cask, se expresan en células epiteliales y en neuronas e interactúan a través de la unión del dominio L27N de mLin-2/Cask

con dominio L27 de SAP97 (Lee y col. 2002). Incluso se ha determinado la estructura cristalina por resonancia magnética nuclear de alta resolución del complejo L27-SAP97/L27N-mLin2 (Feng y col. 2004), que junto con la resolución de la estructura cristalina del complejo L27N-PALS1/L27-PATJ (Li y col. 2004) han permitido comprender en parte las bases estructurales del ensamblaje de los complejos con L27 y como esta asociación sirve de plataforma para agrupar grandes complejos supramoleculares (Petrosky y col. 2005). Otras proteínas que se han descrito como proteínas de asociación al dominio L27 de SAP97 son miosina VI (Wu y col. 2002), PSD-93 y SAP102 (Karnak y col. 2002) y PSD-95 (Cai y col. 2006). No se dispone de más antecedentes sobre estas relaciones que las publicaciones citadas.

Funcionalmente se sabe que el dominio L27 de SAP97 es necesario y suficiente para la unión de las proteínas que lo contienen al citoesqueleto de actina en la membrana lateral de líneas celulares epiteliales en cultivo (Wu y col. 1998). También se ha visto que en neuronas promueve la incorporación de receptores AMPA con GluR1 a la sinapsis, aumentando la fuerza sináptica (Nakagawa y col. 2004). Lee y col. 2002 demostraron que el dominio L27 de Cask de vertebrados une y recluta SAP97 en la superficie lateral de epitelios. Esta interacción es conservada evolutivamente ya que *in vitro* el dominio L27 de la proteína de *Drosophila* CPD (por proteína componente de *Dlg*, correspondiente a una forma de DlgS97) se une a Cask (de vertebrados) y a Camguk o Caki (de *Drosophila*).

8.- DlgS97 EN SISTEMA NERVIOSO

Todos los antecedentes aquí expuestos muestran que las interacciones y funciones de las proteínas MAGUK en general, de las MAGUK "tipo Dlg" y del complejo Lin-2/Lin-7/Lin-10 en particular están conservadas evolutivamente. En *Drosophila*, los homólogos de mLin-2, mLin-7 y mLin-10; Caki (Lopes y cols. 2001, Martin y Olo 1996), Dlin-7 (Bachmann y col. 2004) y DMint (Ashley y col. 2005), respectivamente, también se expresan en el sistema nervioso. De las tres proteínas sólo se han descrito mutantes para Caki, las que son viables pero presentan defectos en la locomoción y en la regulación de la liberación de vesículas de neurotransmisor (Martin y Olo 1996, Zordan y col. 2005). Es decir, Caki es dispensable para la neurotransmisión básica pero es necesario para su regulación.

Por lo tanto podríamos especular que el homólogo de SAP97 en neuronas de *Drosophila* es DlgS97, el que formaría un complejo con Caki y Dlin-7 cumpliendo alguna función neuronal como la regulación de la liberación de neurotransmisor. Un antecedente compatible con este modelo es que la localización sináptica de Dlin-7 en la unión neuromuscular de la larva se encuentra totalmente alterada los mutantes *dlg^{X1-2}*. Esta deslocalización se

rescata con la expresión postsináptica de DlgS97 y no con la expresión de DlgA (Bachmann y col. 2004).

Dentro de lo que ha sido llamado "genética reversa" (que se caracteriza por la direccionalidad del análisis: de la secuencia al fenotipo, a diferencia de la "genética directa"; del fenotipo al gen), existen dos tipos de experimentos que se pueden realizar; unos que utilizan los mismos elementos que los de genética directa y que por lo tanto no son dirigidos, como la mutagénesis química y los elementos genéticos móviles, y los que son dirigidos para alterar una secuencia particular. Dentro de este último grupo están las técnicas de reemplazo dirigido de un gen y las de RNAi (RNA de interferencia, Kennerdell y Carthew 1998). Empleando esta última aproximación experimental hemos demostrado que a pérdida de la expresión de DlgS97 embrionario por la inyección de un dsRNA dirigido contra el dominio L27 de DlgS97 de *Drosophila* (técnica de RNAi) se correlaciona con una incorrecta formación del sistema nervioso embrionario (Mendoza y col. 2003) (figura 8). Sin embargo, es necesario mencionar que la técnica de RNA de interferencia por inyección de un dsRNA en embriones de una célula presenta las siguientes desventajas (1) sólo es posible analizar los efectos de la disminución de la expresión de transcritos blanco durante el desarrollo embrionario, (2) se produce una disminución parcial de la expresión de los transcritos y no necesariamente se obtiene una expresión nula, y (3) se puede estar interfiriendo con la expresión de otros transcritos.

En el caso de los elementos genéticos móviles o elementos transposables, éstos mismos son los que pueden causar la mutagénesis por inserción del elemento móvil llamado elemento P en zonas reguladoras o codificantes de un gen. Si la inserción no produce la pérdida de la expresión del transcrito, es posible hacer "saltar" nuevamente al elemento transposable, y producir una mutagénesis por movilización local e imprecisa del elemento P. Esto se debe a que al "saltar" el elemento P puede arrastrar secuencias genómicas adyacentes y producir deleciones genómicas en un lugar determinado (ver figura 10). Al respecto, una reciente búsqueda de genes que proporcionan mayor resistencia a etanol en moscas adultas arrojó dos nuevos alelos de *dlg* llamados *dlg*^{NP0768} y *dlg*^{P1699} (Lee y col. 2005). Estos alelos son viables y producen una disminución de la expresión de DlgS97 en adultos por inserción de un elemento P sin afectar la expresión de DlgA. Hasta el momento no se sabe como DlgS97 podría estar participando en la resistencia y/o metabolismo del etanol.

Finalmente es importante destacar que únicamente a través del análisis de una mutante nula específica de DlgS97 se podrán determinar inequívacamente las funciones del dominio L27 en neuronas de *Drosophila*.

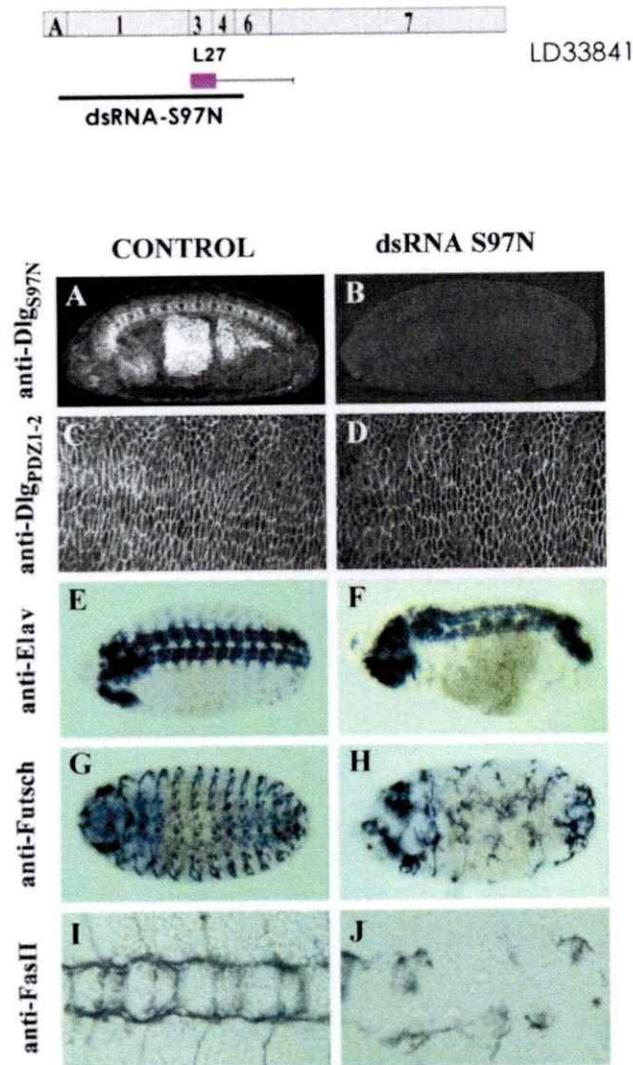


FIGURA 8: La inyección de dsRNA-S97N produce defectos en la neurogénesis embrionaria

Arriba: dsRNA-S97N (1256 pb) obtenido a partir del EST LD33841 utilizado en los experimentos de RNAi. **Abajo A-J:** Inmuntinciones de embriones de estadio 14-16 inyectados con tampón (fila control) o con 3 μ M de dsRNA-S97N marcados con los anticuerpos dlg_{S97N} , dlg_{PDZ} , Elav, Futsch (22C10) y Fasciclina II (Fas II) (tomado de Mendoza y col. 2003).

9.- ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL DESARROLLO DE *DROSOPHILA*

A continuación se resumirán algunos aspectos importantes del ciclo de vida, desarrollo del embrión y del sistema nervioso de *Drosophila* que son importantes para comprender los estadios del desarrollo, los nombres y las estructuras que se mencionarán más adelante en esta tesis (ver Bate y Martínez Arias 1993).

El embrión de *Drosophila* se desarrolla a partir de un huevo fecundado que forma un sincicio celular polarizado. Es una única gran célula con sus territorios anterior/posterior y dorsal/ventral ya definidos. Cuando en estadio 5 han ocurrido 13 ciclos de duplicaciones mitóticas sin sus respectivas divisiones celulares, comienza el proceso llamado de celularización, seguido por el de gastrulación que se extiende hasta estadio 8. El embrión utiliza las proteínas y los mRNAs aportados por el óvulo materno hasta que en estadio 5 comienza la transcripción cigótica. La neurogénesis comienza en estadio 8 cuando los neuroblastos realizan las primeras divisiones mitóticas. Luego que las neuronas adquieren su identidad y posición adecuadas, comienza el proceso de navegación axonal hacia los tejidos blanco, principalmente el músculo que formará la pared muscular de la larva. Finalmente, cada axón establece sinapsis con el tejido blanco de una manera muy específica y que ha sido estudiada con detalle para cada músculo (ver Budnik y Gramates, 1999). La

neurogénesis embrionaria finaliza en estadio 16 cuando se tiene un embrión completamente desarrollado, con sus sistemas digestivo, nervioso, tráqueas, etc. ya maduros. Todo este proceso, desde embrión de una célula hasta embrión de estadio 16 dura 24 horas a 25°C, luego los músculos comienzan a contraerse y se produce la eclosión de una larva de primer estadio. La etapa larval dura 6 días a 25°C, período en el cual se producen dos mudas que definen tres estadios larvales (estadios L1-L3 o 1^{er} a 3^{er} estadio larval) y se produce un crecimiento exponencial del tamaño del individuo. Mientras un embrión prácticamente mantiene su tamaño durante todo su desarrollo (aproximadamente 0,5 mm), las larvas L1 comienzan con unos 0,7 mm, y terminan como una larva de 3^{er} estadio tardío (L3 tardío) con unos 5 mm. Después de L3 se produce la pupación y la larva se convierte en una pupa inmóvil que eclosiona 4 días después en una mosca adulta que requiere de aproximadamente 8 horas a 25°C par completar su madurez sexual.

Considerando (1) que se han sugerido funciones neuronales como la sinaptogénesis y la regulación de la plasticidad sináptica a las proteínas MAGUK "tipo Dlg"; (2) que existen fenotipos epiteliales y neuronales en las mutantes de *dlg* de *Drosophila*; (3) que la variante de procesamiento alternativo de *dlg* llamada DlgS97 que posee un dominio de interacción proteína-proteína L27 ausente en DlgA se expresa en neuronas y no en células epiteliales; (4) que existen funciones neuronales asociadas al dominio L27; y (5) que el RNAi de DlgS97 -por inyección de una dsRNA en embriones- produce defectos en el

desarrollo del sistema nervioso central embrionario; en esta tesis nos propusimos: (1) estudiar el patrón de expresión espacial y temporal de la variante DlgS97 durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* para determinar si existe una regulación diferencial de su expresión con respecto a la variante de expresión epitelial DlgA; y (2) determinar si la variante DlgS97 posee funciones neuronales que la diferencien de DlgA. Para ello, se propuso la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La expresión de la variante de procesamiento alternativo de *dlg* de *Drosophila* llamada DlgS97 posee una regulación de su expresión diferente a DlgA y se asocia a funciones neuronales

OBJETIVOS

1.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si la variante de procesamiento alternativo de *dlg* llamada DlgS97 posee una regulación de su expresión diferente a DlgA y determinar si

DlgS97 posee funciones neuronales durante el desarrollo embrionario y/o en el adulto de *Drosophila*. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Análisis temporal y espacial de la expresión de DlgS97

1.1.- Determinación por RT-PCR, hibridación *in situ* y Western blot de la expresión de las variantes de *dlg* con dominio L27

1.2.- Análisis temporal y espacial de DlgS97 en embriones utilizando el anticuerpo anti-Dlg_{S97N} y diferentes marcadores neuronales

2.- Análisis de la pérdida de expresión de DlgS97 por inyección de dsRNA-S97N en embriones

2.1.- Obtención de dsRNA-S97N y dsRNA-GFP

2.2.- Análisis de la especificidad y dependencia a la dosis del dsRNA-S97N inyectado

2.3.- Análisis de la localización subcelular de Miranda durante la división asimétrica de los neuroblastos al inhibir la expresión de DlgS97 por inyección de dsRNA-S97N

3.- Análisis de la sobreexpresión de DlgS97 en neuronas embrionarias

3.1.- Sobreexpresión de DlgS97 en neuronas embrionarias y análisis de los fascículos axonales marcados por 22C10 y fasciclina II

4.- Generación de una mutante nula de DlgS97 a través de la escisión imprecisa del elemento P de cepa NP7225.

4.1.- Caracterización por Western blot e inmunotinción de embriones de la línea NP7225

4.2.- Transposición y selección de líneas potencialmente nulas de DlgS97

4.3.- Caracterización fenotípica y molecular de las cepas seleccionadas

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MANTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE CEPAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1.1.- MANTENCIÓN CEPAS

Las cepas fueron mantenidas a 18°C en viales o botellas con medio estándar. Los experimentos fueron realizados a 25°C, con excepción de los casos en que se indica a 29°C.

1.2.- CEPAS NATIVAS, MUTANTES Y BALANCEADORES

Las cepas yw y WOR (Oregon w-) fueron utilizadas como cepas pseudo-nativas. Para la transposición se utilizó la cepa NP7225 (*dlg*^{NP7225}) y que posee el elemento P{GawB} insertado 960 pb río arriba de exón 1 del gen *dlg*. Los alelos de *dlg* utilizados fueron: *dlg*^{XI-2}/Basc (Stewart y col. 1972), *dlg*^{m52}/FM6/Dp (Voelker y col., 1985), *dlg*^{NP7225} (GETDB - Gal4 Enhancer Trap Insertion Data-

base), *dlg*^{P1699} y *dlg*^{NP0768} (Lee y col., 2005, y U. Heberlein, resultados no publicados).

Los cromosomas balanceadores utilizados para el primer cromosoma (cromosoma X) se distinguen todos por la presencia del marcador Bar en adultos: Basc, FM7c, FM6 y FM7c-UAS-GFP-twistGal4 (Lindsley y Zimm, 1992). Este último expresa GFP en el patrón del gen twist (mesodermo), y de ahora en adelante será llamado simplemente FM7c-GFP. Del segundo cromosoma se utilizó el balanceador Cyo y del tercer cromosoma TM6B y TM3. La tabla 1 resume las cepas utilizadas y las generadas en esta tesis.

1.3.- CEPAS TRANSGÉNICAS

Se utilizó el sistema de expresión UAS-Gal4 para producir la sobreexpresión o expresión ectópica según sea el caso de *DlgS97*, *DlgA*, *S97N* o GFP. El sistema UAS-Gal4 se basa en el uso del factor transcripcional de levadura Gal4 y la secuencia activadora río arriba ("upstream activation sequence, UAS). Este método (Brand y Perrimon, 1993) requiere dos cepas de moscas transgénicas; la que "responde", en la que el gen de interés se clona bajo la secuencia UAS, y una cepa "guía", en la que Gal4 se expresa bajo el control de un promotor determinado. Cuando ambas moscas se cruzan, la unión de Gal4 a la secuencia UAS produce una fuerte expresión del gen fusionado a UAS en la progenie (ver figura 9). La expresión solo se producirá en los tejidos y en el momento del desarrollo que el promotor fusionado a Gal4 esté activo. La

eficacia tanto de la expresión de Gal4 como de su actividad es dependiente de temperatura, siendo baja a 18°C, intermedia a 25°C y máxima a 29°C.

TABLA 1: Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en esta tesis

NOMBRE CEPA	CARACTERÍSTICA CEPA/EXPERIMENTO	ORIGEN
-------------	---------------------------------	--------

Cepas pseudo-nativas

yw	Mutante <i>yellow</i> (<i>y</i>) y <i>white</i> (<i>w</i> ¹¹⁸)	A. García-Bellido ¹
WOR	Cepa OR mutante <i>white</i>	C. Zuker ²

Cepas UAS

UAS-EGFP-dlgS97	Ganancia de función DlgS97	U. Thomas ³
UAS-S97N-EGFP	Ganancia de función S97N	U. Thomas ³
UAS-3myc-S97N	Ganancia de función S97N	U. Thomas ³
UAS-dlgA-EGFP	Ganancia de función DlgA	V. Budnick ⁴
UAS-Tau-GFP	Expresión de GFP	V. Budnick ⁴

Cepas Gal4

Elav-Gal4 ^{C155} (X)	Gal4 en neuronas maduras/ Experimentos de rescate	Bloomington ⁵ (Nº458)
Elav-Gal4 (III)	Gal4 en neuronas maduras/ Experimentos de sobreexpresión	C. Doe ⁵

Cepas transposición

<i>dlg</i> ^{NP7225}	Elemento a escindir	GETDB ⁷ (Nº7225)
$\Delta 2$ -3Dr/TM2	Transposasa	A. García-Bellido ¹

Alelos de *dlg*

<i>dlg</i> ^{X1-2} /Basc	Mutante hipomorfa/ Análisis mutantes letales obtenidas en la transposición	Stewart y col. 1972
<i>dlg</i> ^{m52} /FM6/Dp	Mutante hipomorfa/ Uso del cromosoma Y con duplicación gen <i>dlg</i> y análisis mutantes letales obtenidas en la transposición	Voelker y col. 1985
<i>dlg</i> ^{P1699}	Mutante de <i>dlg</i> S97, resistencia a alcohol/ Análisis mutantes letales obtenidas en la transposición	U. Heberlein ⁸
15779	Control de <i>dlg</i> ^{P1699} y <i>dlg</i> ^{NP0768} , con elemento P en <i>dlg</i> y sin fenotipo de resistencia a alcohol/ Análisis mutantes letales obtenidas en la transposición	U. Heberlein ⁸
<i>dlg</i> ^{NP0768}	Mutante de <i>dlg</i> S97, resistencia a alcohol/ Análisis mutantes letales obtenidas en la transposición	U. Heberlein ⁸
<i>dlg</i> ^{exc138}	Mutante de <i>dlg</i> S97/Análisis función DlgS97	Esta tesis

NOMBRE CEPA	CARACTERÍSTICA CEPA/EXPERIMENTO	ORIGEN
-------------	---------------------------------	--------

Alelos de *dlg* (cont.)

<i>dlg^{exc138}</i> -elavGal4	Recombinante meiótica de <i>dlg^{exc138}</i> con elav-Gal4 ^{C155} / Expresión de DlgS97 o DlgA en neuronas de mutantes de <i>dlgS97</i>	Esta tesis
<i>dlg^{exc5}</i> -elavGal4	Recombinante meiótica de <i>dlg^{exc5}</i> con elav-Gal4 ^{C155} / Expresión de DlgS97 o DlgA en neuronas de mutantes de <i>dlgS97</i>	Esta tesis

Otras

RN2-GAL4, UAS-mCD8-GFP (7472)	GFP en membrana de neuronas RP2, aCC y pCC/ Controles especificidad dsRNA-S97N/ dsRNA-GFP	Bloomingtonsgton ⁵ (N°7472)
INAD	Mutante ciega/ Control experimentos de fototactismo	W.L Pack (1979)
<i>dlg^{exc150}</i>	Escisión precisa obtenida de la transposición de <i>dlg^{NP7225}</i> / Control de mutantes <i>dlgS97</i>	Esta tesis
WB	Control de <i>dlg^{P1699}</i> y <i>dlg^{NP0768}</i> , sin elemento P/ Análisis mutantes letales obtenidas en la transposición	U. Heberlein ⁸
UAS-βGal, LM-Gal4	β-Galactosidasa en glía de la línea media/Tinciones dobles anticuerpo anti β-gal y <i>dlg^{S97N}</i>	C. Doe ⁶
UAS-βGal, gcm-βGal4	β-Galactosidasa en células gcm (<i>glial cells missing</i>) /Tinciones dobles anticuerpo anti β-gal y <i>dlg^{S97N}</i>	C. Doe ⁶

¹: Antonio García-Bellido, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

²: C. Zuker, School of Medicine, University of California, San Diego, EE.UU.

³: Ulrich Thomas, Leibniz Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania.

⁴: Vivian Budnick, Department of Neurobiology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, EE.UU

⁵: Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu>).

⁶: Chris Q. Doe, Institute of Molecular Biology, Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon, EE.UU.

⁷: GETDB- Gal4 Enhancer Trap Insertion Database (<http://flymap.lab.nig.ac.jp/getdb.html>)

⁸: U. Heberlein, Department of Anatomy, Program in Neuroscience, University of California at San Francisco, San Francisco, EE.UU.

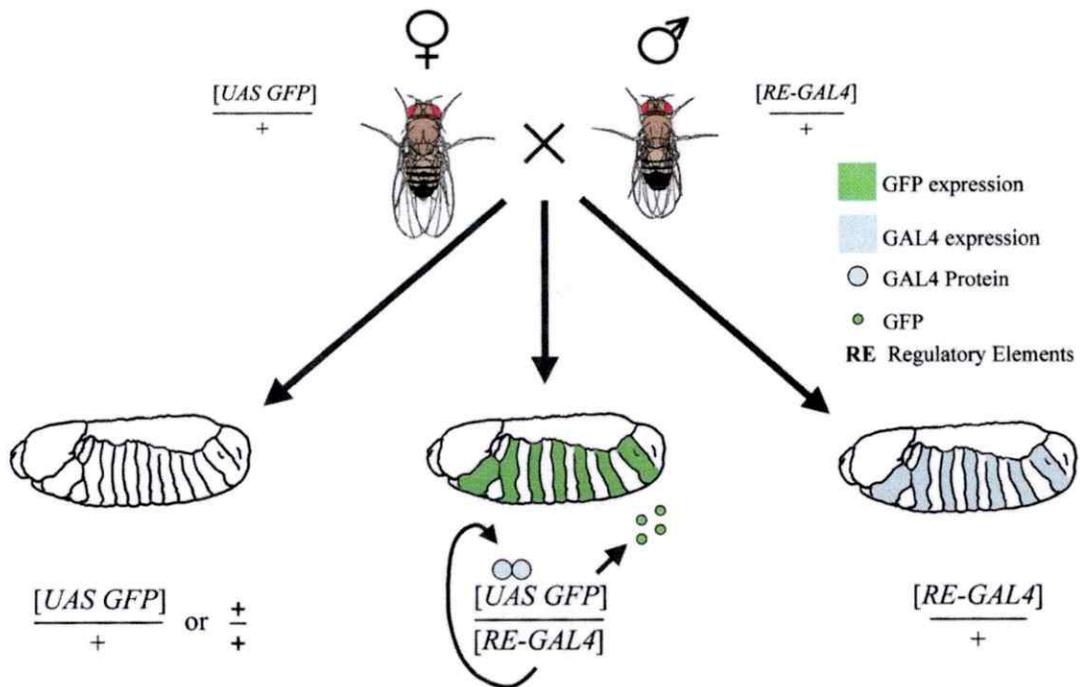


FIGURA 9: Sistema UAS/GAL4 en *Drosophila*

Cuando se cruza una mosca que lleva el elemento de respuesta (en este ejemplo UAS-GFP) con otra mosca que lleva Gal4, la progenie contendrá los dos elementos. La presencia de Gal4 en el patrón segmentado en los embriones representados en la figura produce la expresión de GFP en ese patrón (obtenido de Duffy, 2002).

1.4.- RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Los embriones se recolectaron en vasos plásticos transparentes con placas de recolección de embriones. Las placas con la mezcla de agar y jugo de fruta (ver más adelante) se pusieron en la parte superior abierta de los vasos y con levadura como alimento para las moscas adultas.

1.5.- MICROINYECCIÓN DE dsRNA EN EMBRIONES DE UNA CÉLULA

Para los experimentos de RNAi por inyección de dsRNA se siguieron los procedimientos y técnicas descritas (Kennerdell y Carthew 1998 y Sullivan y col. 2000), los que consistieron en lo siguiente. Los cambios de las placas de recolección de embriones se hicieron cada una hora, 4 veces previo al inicio de la inyección, mientras se preparaba el dsRNA que se iba a inyectar.

Se centrifugó a 12.000 g por 30 minutos una alícuota de 150 ó 200 μ l de dsRNA a una concentración de 2 a 3 μ M mantenido a -80°C en etanol. Se eliminó el sobrenadante, se lavó el dsRNA con etanol al 75% y se volvió a centrifugar a 12.000 g por 30 minutos. Luego se secó el dsRNA 10 minutos a temperatura ambiente, y se resuspendió en 12 μ l de solución de inyección. Se analizaron 0,5-1 μ l del dsRNA en un gel de agarosa no desnaturalante al 0,8% y se cuantificó en espectrofotómetro la absorbancia a 260 y 280nm. Para diluir el dsRNA se utilizó solución de inyección.

Las agujas para la microinyección fueron preparadas con un estirador de capilares (Sutter Instrument co, Novato, California, EE.UU.) con capilares de borosilicato con filamento (Sutter Instrument co., Novato, California, EE.UU.). Para las inyecciones se recolectaron los embriones por periodos de 30 minutos a temperatura ambiente, luego se eliminó el corion con solución de hipoclorito de sodio al 50% por 3-5 minutos, y se alinearon sobre una placa de agar. Se adhirieron en una placa portaobjeto con cinta adhesiva doble faz, y se secaron entre 3-8 minutos en silicagel, tiempo determinado empíricamente cada día de la inyección. Luego se cubrieron con aceite halocarbonado y se inyectaron por posterior-lateral en estadio de una célula o blastodermo sincicial con un volumen de dsRNA o tampón equivalente a 1/3 el volumen del embrión. Se utilizó un inyector Picopump (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Los embriones que no estuvieran en el estadio de una célula no se inyectaron y se destruyeron. Los embriones inyectados se dejaron a 18°C toda la noche en una cámara húmeda hasta alcanzar el estadio en el que se fijaron, 24 horas aproximadamente para alcanzar estadio 15-16.

1.6.- CRUZAS

Todas las cruzas fueron realizadas a 25°C, con excepción de las cruzas UAS X Gal4 que se realizaron a 29°C.

Las cruzas realizadas fueron:

1.6.1 Transposición

A partir de la línea *dlg*^{NP7225}, que es la que posee el elemento P en el sitio más cercano al inicio de la traducción de *dlgS97*, se diseñó una estrategia para su transposición. El objetivo fue obtener una mutante nula de *dlgS97* por escisión imprecisa del elemento P. El elemento P posee el gen *white* (*w*) que confiere color rojo a los ojos y las líneas con los elementos P se establecen en un fondo genético mutante para *w*, de modo que cuando el elemento P salta, se pierde el marcador *w* y los ojos son blancos (*w*-). La idea fue seleccionar y establecer a partir de cruzas únicas, un número adecuado de líneas *w*-. La probabilidad de obtener escisiones imprecisas es de aproximadamente de un 2-6% (Ashburner y col., 2005).

A continuación se esquematizan y explican las cruzas realizadas (ver figura 10B). Considerando los antecedentes de que el gen *dlg* es necesario para la espermatogénesis (U. Thomas resultados no publicados) se reemplazó el cromosoma Y de la cepa con la transposasa por uno que posee una duplicación de *dlg* (figura 10B cruza A). A este cromosoma Y que posee una translocación desde el cromosoma X que incluye al gen *dlg* se le llamó Dp (por poseer una duplicación de *dlg*). En la cruza C (figura 10B) se utilizó una mutante cualquiera del cromosoma X y letal en homocigocisis. Para la cruza D) (figura 10B) se seleccionaron 320 moscas vírgenes *w*- con balanceador FM7c que se expandieron de a una con dos machos Y/FM7c-GFP. Una vez

establecidas las 320 líneas se analizó la expresión de *dlgS97* por Western blot de cabeza de adulto de cada una.

Para realizar la cruce B) (figura 10B), se pusieron 30 viales con machos de ojos blancos (w-) y con el marcador dominante Drop (Dr) obtenidos de la cruce A). Para la cruce C) se pusieron 100 viales y sus réplicas, cada uno con 3 machos de ojos rojos (w+) con el marcador Dr obtenidos de la cruce B) y 6 hembras M*/FM7.

1.6.2.- Análisis mutantes homocigotas letales obtenidas de la transposición

Para determinar si alguna de las 29 líneas homocigotas letales (NP* HL) obtenidas de la transposición resultaron ser mutantes de *DlgS97*, se recurrió al análisis de complementación con el alelo *dlg^{P1699}*. Para ello se realizó la cruce de cada una de ellas con el alelo *dlg^{P1699}* como se esquematiza en la figura 11. Este alelo posee nula expresión de *DlgS97* en adultos (pero no durante su desarrollo) y fue encontrado en una búsqueda de genes que otorgan resistencia a alcohol (Scholz y col. 2005, Lee y col., 2005). Se realizaron Western blot de extractos de cabeza de las hembras adultas de las 29 líneas NP* HL/ *dlg^{P1699}* con el anticuerpo *dlg_{S97N}*.

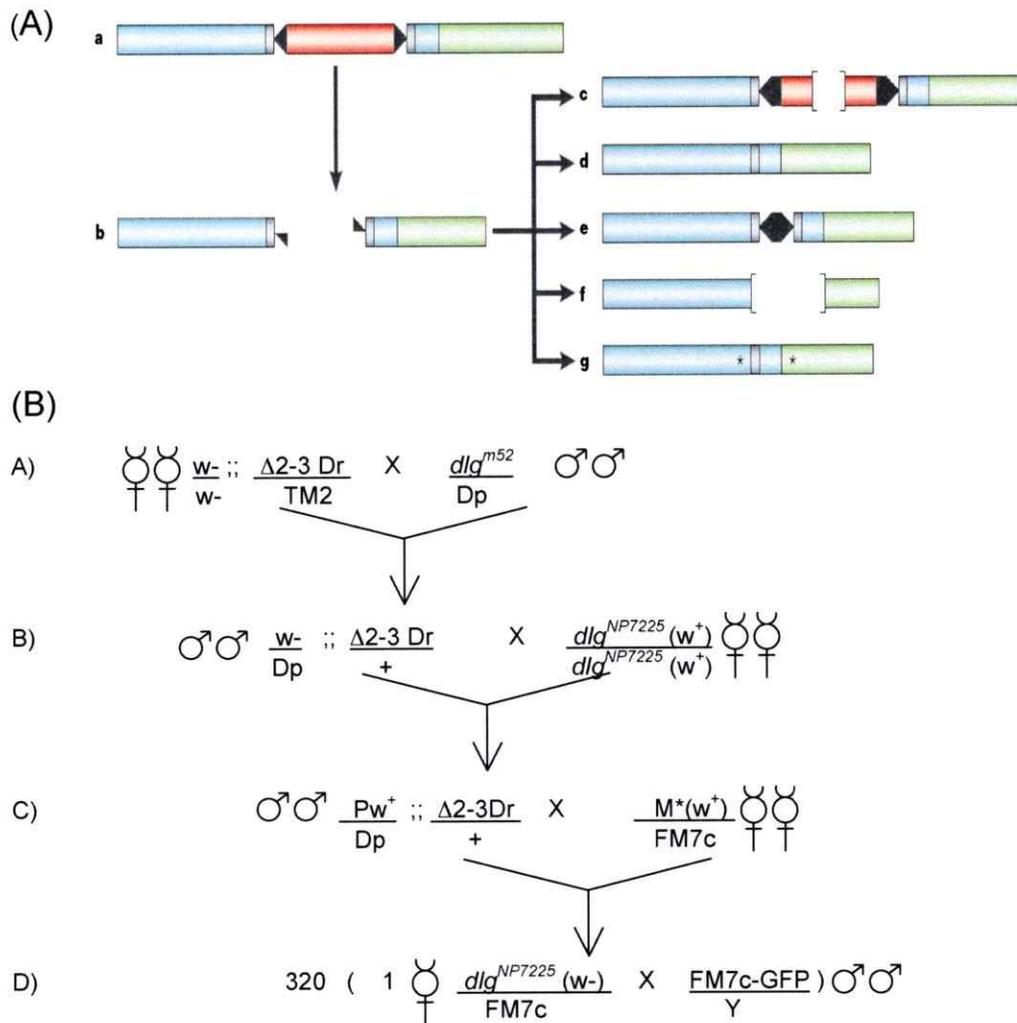


FIGURA 10: (A) Mutagénesis por movilización de un elemento P

Se representa al elemento P en rojo situado en una región genómica cerca de un gen (en verde) y las regiones intergénicas en azul (tomado de Adams y Sekelsky, 2002). La transposa cataliza la escisión del elemento, y a la derecha se representan los posibles productos de reparación. En f) se representa una mutación producida por la pérdida de región genómica en uno o ambos sentidos que es la manera de obtener una mutante nula por movilización local e imprecisa del elemento.

(B) Esquema de cruzas realizadas para obtener una mutante nula de *DlgS97* por movilización imprecisa del elemento P de la cepa *dlg^{NP7225}*

Ver texto para detalles explicativos.

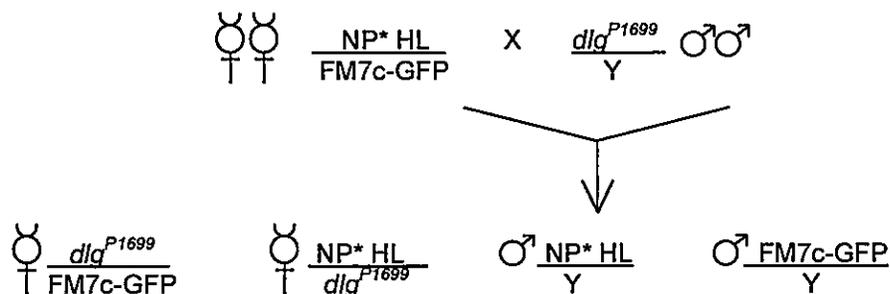


FIGURA 11: Análisis de complementación entre las mutantes homocigotas letales obtenidas de la transposición y el alelo dlq^{P1699}

Si la mutante NP*HL fuera mutante de DlgS97 no debería complementar a dlq^{P1699} o al menos NP*HL/ dlq^{P1699} no debería ser inmunoreactiva al anticuerpo dlg_{S97N} . Ver texto para detalles explicativos.

1.6.3.- Obtención de recombinantes meióticas entre dlg^{exc138} y elav-Gal4 y entre dlg^{exc5} y elav-Gal4

Para rescatar la mutación en dlg_{S97} obtenida en la transposición, se utilizó la cepa transgénica UAS-EGFP-DlgS97 bajo la guía de elav-Gal4, para expresar DlgS97 en todas las neuronas maduras. Como el gen dlg de *Drosophila* está en el cromosoma X (cromosoma 1), el transgen de EGFP- dlg_{S97} en el segundo y elav-Gal4 también en el primero, se recurrió a la selección de las recombinantes meióticas espontáneas entre la mutante de dlg_{S97} y elav-Gal4, de modo que esas nuevas cepas se pudieran cruzar con la cepa UAS deseada (ver cruzas en figura 12). La frecuencia de recombinación en ausencia de balanceadores depende de la distancia en el genoma de los genes en cuestión, siendo mayor la frecuencia mientras mas lejos estén. *Elav* está al principio del cromosoma X (posición citogenética 1B7-8) y dlg está cerca

del medio de éste (posición citogenética 10B6-10), por lo que la probabilidad de recombinación es alta.

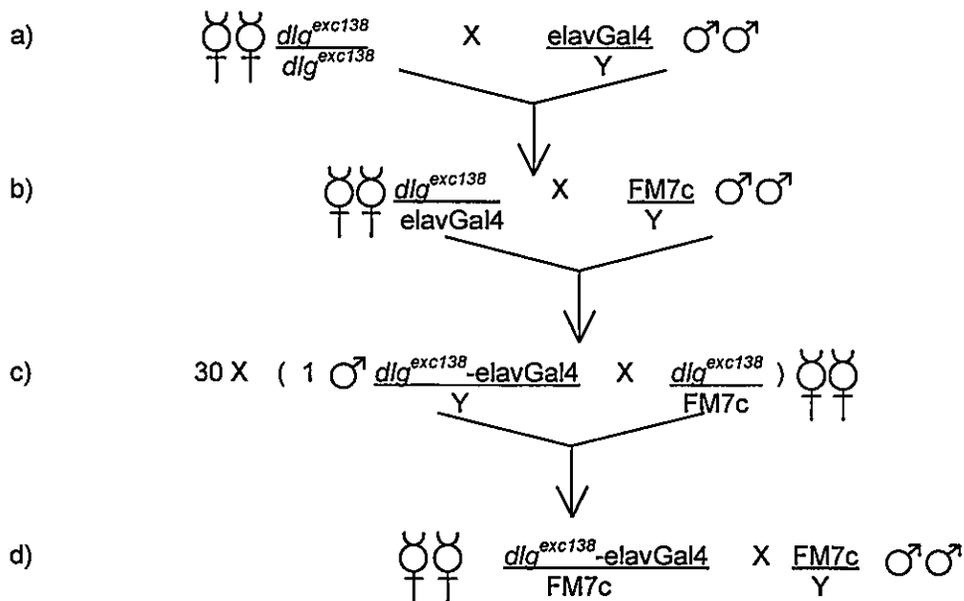


FIGURA 12: Cruzas realizadas para la obtención de recombinantes meióticas entre el alelo dlg^{exc138} y elav-Gal4.

Se realizaron las mismas cruzas para obtener recombinantes entre dlg^{exc5} y elav-Gal4. Ver texto para detalles.

Las mutantes de $dlgS97$ obtenidas en esta tesis son w^- (ojos blancos) y elav-Gal4 es w^+ (ojos rojos), por lo que todas las hembras obtenidas de la cruz A, figura 12 y utilizadas en la cruz B (figura 12) son de ojos rojos y llevan la mutación de $dlgS97$ en solo un cromosoma X. Para hacer las cruzas C) (figura 12) se seleccionaron 30 machos de ojos rojos y se cruzaron de a uno con dos hembras balanceadas dlg^{exc138} o dlg^{exc5} según sea el caso. Los machos

utilizados en la cruce C) pueden haber sido recombinantes (*dlg^{exc138}* - elavGal4 o *dlg^{exc5}*-elavGal4) o simplemente elav-Gal4, por lo que para seleccionar los recombinantes se realizaron Western blot con el anticuerpo de *dlg^{S97N}* de las hembras adultas sin balanceador obtenidas de la cruce D) (figura 12). Cada una de las recombinantes obtenidas se cruzó con moscas UAS-Tau-GFP y se analizó la intensidad relativa de EGFP de la descendencia, seleccionándose las recombinantes que expresaron mas fuerte EGFP para los estudios posteriores.

1.7.- SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA MANIPULACIÓN Y MANTENCIÓN DE CEPAS Y EMBRIONES

- Aceite halocarbonado #700 (Sigma, St. Louis, EE.UU.).
- Acido propiónico (Winkler, Santiago, Chile)
- Hipoclorito de sodio comercial "Clorinda" al 50% en agua, para eliminar el corion de los embriones.
- Levadura "Lefersa" en polvo disuelta en agua destilada como comida para las moscas adultas en vasos con placas de recolección de embriones.
- Medio estándar alimento de viales y botellas: para 5 L (aproximadamente para 500 viales) se hirvieron durante 15 minutos 500 g de levadura fresca con 3 L de agua. Mientras la levadura estuviera lista, se mezclaron con batidora en 2 L de agua caliente, 250 g de harina sin polvos de hornear, 55 g de agar-agar técnico y 400 g de glucosa. Una vez transcurridos los 15 minutos del hervido de la levadura, se agregó la mezcla anterior a la levadura y se hirvió todo durante 15 minutos. Luego se esperó que la temperatura

descendiera a 60°C y se agregaron 30 ml de ácido propiónico, se mezcló y se sirvió en los viales y botellas cuando la mezcla estaba aun caliente.

- Placas de recolección de embriones: 20 g agar técnico, 12,5 g azúcar comercial, 200 ml néctar Watt's concentrado de manzana y agua tibia (aproximadamente a 30°C) hasta completar 1 L. Se calentó y agitó hasta que la temperatura alcanzó los 88°C, se retiró la fuente de calor y cuando la temperatura llegó hasta aproximadamente 60°C se agrega 12 ml de nipagin 10% (10 g de nipagin en 100 ml de etanol). Las placas se guardaron a 4°C como máximo hasta 3 semanas.

2.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1.- GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS

2.1.1.- Plasmidios para la generación de los dsRNAs:

Para la generación de dsRNA-S97N, se clonó el fragmento de 1,2 Kb de la digestión con EcoR V y BamHI del EST LD33841 en el plasmidio pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA), plasmidio al que llamaremos S97N-SK. El fragmento clonado incluye 802 bp de la región 5' no traducida y 414 bp que codifican para la región S97N (exones A, 1, 3, 4 y 6). Para la generación del dsRNA-GFP se utilizó el plasmidio pCS2mt-UGP (cedido gentilmente por A. Rivera).

2.1.2.- Plasmidios para la generación de sondas RNA para hibridación *in situ*:

Para sonda S97N se utilizó el mismo plasmidio que se usó para la generación del dsRNA-S97N, para la sonda específica de dlG_A; E8 (5'UTR dlG_A) se clonó en plasmidio PCR 2.1 (Invitrogen, California, EE.UU.) un producto de PCR de 350 pb (exones B y 8) obtenido con los partidores T3 y PDZ1-rev sobre cDNA de dlG_A en plasmidio pBluescript SK. Para la sonda E7 (3'UTR LD33841); se clonó el fragmento de 1200 pb obtenido de la digestión con la enzima XhoI del clon EST LD33841 en el plasmido pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA). Para la sonda de worniu se utilizó directamente el plasmidio pFLC I del EST RE10012.

2.2.- TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* Y GENERACIÓN DE dsRNAS

En la elaboración de los dsRNAs para los experimentos de RNAi, se transcribieron los RNA a partir de los DNA linearizados de los plasmidios S97N-SK y pCS2mt-UGP (descritos en el punto 2.1)

Dependiendo de la orientación del inserto se usó la enzima de restricción y la RNA polimerasa adecuada para digerir los plasmidios y transcribir (tabla 2). Una vez verificado en un gel de agarosa al 0,8% que los DNAs estaban completamente digeridos, se trataron 25 µg de cada uno con 0,5% de SDS y 100 µg/ml de proteinasa K durante 30 minutos a 56°C, se extrajeron una vez con un volumen igual de la mezcla de fenol básico/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), luego otra vez con cloroformo y se precipitaron con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se

centrifugaron los DNAs a 12.000 g por 30 minutos, se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron los precipitados con etanol 75%, se volvió a centrifugar a 12.000 g por 30 minutos y a eliminar los sobrenadantes. Cada DNA lineal se resuspendió en 40 μ l de agua DEPC y se cuantificó en espectrofotómetro por su absorbancia a 260 nm.

Para la transcripción se siguieron las instrucciones de manufactura de las enzimas RNA polimerasas respectivas, escalando las cantidades 5 veces. Es decir, se puso en un tubo libre de RNAsas 5 μ g de cada DNA lineal, 40 μ l de mezcla de NTPs 2,5 mM, 40 μ l de tampón de transcripción 5X, 4 μ l de la RNA polimerasa respectiva y agua DEPC hasta un volumen final de 200 μ l. Esta mezcla se incubó a 37°C por 3 hrs, se extrajo una vez con un volumen igual de mezcla de fenol ácido/ cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1) y otra con un volumen igual de cloroformo. Luego se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se centrifugaron y lavaron los precipitados como se describió anteriormente, y finalmente cada RNA transcrito con su DNA se resuspendieron en 100 μ l de agua DEPC y se guardó una alícuota de 4,3 μ l de cada uno. Para eliminar el DNA, se agregaron 35 μ l de solución tampón 10X para DNasa I, 15 μ l de DNasa I y agua DEPC hasta un volumen final de 350 μ l. Se incubó esta mezcla a 37°C durante 1 hora y luego se analizaron 15 μ l de cada uno en un gel de agarosa no desnaturante al 0,8%, comparándolos con las alícuotas DNA-RNA guardadas anteriormente. Generalmente este tratamiento fue suficiente para eliminar todo el DNA y dejar

solo el RNA sintetizado *in vitro*. Los RNAs se precipitaron una vez mas y se resuspendieron en 25 μ l de solución de apareamiento. Para el apareamiento de los ssRNA respectivos y producir los dsRNAs, se pusieron cantidades equimolares de cada RNA con sentido y anti-sentido en un volumen final de 11,1 μ l y se calentaron las alícuotas a 100°C en agua hirviendo durante 1 minuto, después se eliminó la fuente de calor y se dejaron enfriar toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron brevemente los tubos y se analizaron 0,5-1 μ l de cada uno en un gel de agarosa no desnaturante, comparándolos con los ssRNA respectivos y un estándar de peso molecular de DNA, ya que el dsRNA migra como el dsDNA según su número de pb. Finalmente los dsRNAs se guardaron precipitados con 1/10 de volumen de acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol 100% a -80°C, y se sacaron alícuotas para su uso el mismo día de la inyección.

TABLA 2: Enzimas de restricción y RNAs polimerasas utilizadas en la obtención de dsRNAs

Nombre dsRNA	Enzima de restricción		RNA polimerasa	
	Hebra con sentido	Hebra anti-sentido	Hebra con sentido	Hebra anti-sentido
dsRNA-S97N	Not I	Hind III	T7	T3
dsRNA-GFP	Not I	EcoR I	SP6	T3

2.3.- OBTENCIÓN DE RNA, PARTIDORES Y RT-PCR

Para el análisis por RT-PCR se recolectaron embriones a 25°C de las siguientes edades: estadios 1-4 (0-3 hrs), estadios 8-11 (3 hrs 20 minutos-7 hrs 20 minutos) y estadios 15-16 (11 hrs 20 minutos-15 hrs) y se seleccionaron además visualmente en lupa por las siguientes características: estadios 1-4 por la ausencia de embriones celularizados o cualquier otro pliegue morfológico, estadios 8-11 por la ausencia de los surcos metaméricos (que dividen cada segmento), y finalmente el intervalo de estadios 15 a 17 por la ausencia de tráqueas.

Se homogenizaron los embriones en 750 µl de Trizol (Invitrogen, California, EE.UU.) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los RNAs se resuspendieron en 50 µl de agua DEPC y se determinó espectrofotométricamente su absorbancia a 260 y la razón 260/280 nm. Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima transcriptasa reversa Superscript II y se siguieron sus instrucciones de manufactura. A partir de los cDNAs obtenidos, se realizaron los PCRs con 0,5 µl de cada partidor a una concentración de 10 µM, 0,5 µl de mezcla de dNTPs, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl ó 2 µl del cDNA respectivo directo o de una dilución 1/10, 1 U de Taq DNA polimerasa y agua destilada estéril hasta 25 µl. El programa de amplificación utilizado fue: 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de: desnaturación a 94°C por 30 seg, apareamiento a la T_m respectiva por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg por cada 500 pb del producto esperado y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

2.4.- OBTENCIÓN DNA GENÓMICO

Para el análisis de las líneas seleccionadas de la transposición se extrajo DNA genómico de una única mosca adulta homocigota. Para ello se puso la mosca en un tubo de 0,6 ml sobre la que se agregaron lentamente 50 μ l de tampón de homogenización para DNA genómico con la proteinasa K agregada recientemente. Con la misma punta de la pipeta se molió suavemente la mosca y se incubó 30 minutos a 37°C. Luego se inactivó la proteinasa K por 2 minutos a 95°C.

2.5.- PCR DNA GENÓMICO

Para los PCRs de productos esperados mayores de 2,5 Kb se utilizó la mezcla de enzimas Taq DNA polimerasas "Elongasa" de Invitrogen, California, EE.UU. Se ajustó la concentración de sales según instrucciones del fabricante, y se determinó que la mejor mezcla fue con 1,9 mM de concentración final de Mg^{++} . El programa utilizado en todos los casos fue: 94°C por 30 seg, 35 ciclos de: 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 1 minutos por cada 1 Kb del producto esperado. Luego 72°C por 10 minutos y 4°C.

TABLA 3: Partidores utilizados

Nombre partidor	Secuencia 5'-3'	Orientación	Templado
Tim8-for	tagattgttcgcttaatcgacacc	5'-3'	Intrón entre exones 2 y 3 de <i>tim8</i>
iA-1-for1	tcgctcatcgctcacataaa	5'-3'	Intrón entre exones A y 1 de <i>dlg</i>
iA-1-for2	cgctggtagggcagtagag	5'-3'	Intrón entre exones A y 1 de <i>dlg</i>
iA-1-for3	gcaaaccaaaggcaaaaataa	5'-3'	Intrón entre exones A y 1 de <i>dlg</i>
iA-1-for4	ccgcttggtcagtggtcactg	5'-3'	Intrón entre exones A y 1 de <i>dlg</i>
iA-1-rev1	tgtgagttggctgctttttg	3'-5'	Intrón entre exones A y 1 de <i>dlg</i>
E1-rev1	gctcctcacattcacattcg	3'-5'	Exón 1 de <i>dlg</i>
ATG-S97N-for	aacaacgctcacagaatgcc	5'-3'	Inicio de la traducción de DlgS97 (exón 1 de <i>dlg</i>)
E2-rev	atcgctctcggacttctcaa	3'-5'	Exón 2 de <i>dlg</i>
i3-4-rev2	ttgaccgcaatcgatctca	3'-5'	Intrón entre exones 3 y 4 de <i>dlg</i>
E4-rev1	ggctccgctgtcttttgtt	3'-5'	Exón 4 de <i>dlg</i>
ATG-DlgA-for	gctcgatgatgacaacgagg	5'-3'	Inicio de la traducción de DlgA (exón 8 de <i>dlg</i>)
E12-for	gcgctaaatagtatgggacagacgg	5'-3'	Exón 12 de <i>dlg</i>
E12-rev	ggctgggggtgattgggatcg	3'-5'	Exón 12 de <i>dlg</i>
PDZ1-rev	cgtataaccagctatcatcgcc	3'-5'	Exón 10 de <i>dlg</i> (dominio PDZ1)
PDZ3-rev	aagcgattgtactcctctg	3'-5'	Exón 14 de <i>dlg</i> (dominio PDZ3)
SH3-rev	ttcatcgtcggaggcattggt	3'-5'	Exón 15 de <i>dlg</i> (dominio SH3)
GUK-rev	ggatcgcacctggacaacgcccg	3'-5'	Exón 24 de <i>dlg</i> (dominio GUK)
5' actina	ggccggactcgtctactcctgc	5'-3'	Actina de <i>Drosophila</i>
3' actina	gagcaggagatggccaccgctgc	3'-5'	Actina de <i>Drosophila</i>

2.6.- HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Las sondas se prepararon según instrucciones del sistema comercial para preparación de sondas RNA marcadas con digoxigenina.

Una vez fijados los embriones (ver protocolo de fijación embriones sin inyectar), se rehidrataron realizando lavados de 5 minutos cada uno, en soluciones de metanol : PTw, de las siguientes diluciones: 7:3, 1:1, 3:7, y finalmente con PTw solo. Luego se post-fijó 20 minutos con agitación y se hicieron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PTw. Se incubó 5 minutos a

temperatura ambiente en solución 1:1 de PTw y Hb-B, luego otros 5 minutos con Hb-B solo (sin agitar) y se prehibridó con Hb-A por lo menos 1 hora a 60°C. Las sondas en Hb-A a una dilución de 1:2000 se desnaturaron a 80°C durante 5 minutos y luego se incubaron con los embriones toda la noche a 60°C. Al día siguiente después de sacar la sonda, se lavaron los embriones 1 hora a 60°C y luego 5 veces durante 20 minutos cada una con Hb-B. Luego se lavaron 5 minutos con mezclas de Hb-B:PTw a las concentraciones 4:1, 1:1 y 1:4, y finalmente se lavó 5 veces con PTw sólo (1 ml en cada lavado). La detección se realizó incubando los embriones toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-digoxigenina previamente preabsorbido 1:10 con embriones, a una dilución de 1:2000 en PTw. Al día siguiente se lavó 5 veces con PTw durante 5 minutos cada vez, y luego 2 por 5 minutos con solución AP. Para la detección se agregaron 4,5 µl de NBT y 3,5 µl de BCIP a 1 ml de solución AP. Las reacciones en general se desarrollaron dentro de la primera hora y se detuvieron con 3 lavados de 5 minutos cada uno en PTw.

TABLA 4: Enzimas de restricción y RNAs polimerasas utilizadas en la obtención de las sondas para las hibridaciones *in situ*

Nombre sonda	Blanco	Enzima de restricción		RNA polimerasa	
		Hebra con sentido	Hebra anti-sentido	Hebra con sentido	Hebra anti-sentido
S97N	<i>dlg</i> (exones 1, 3 y 4)	Not I	Hind III	T7	T3
E7	<i>dlg</i> (exón 7)	Kpn I	Not I	T3	T7
E8	<i>dlg</i> (exones B y 8)	Xho I	BamH I	T3	T7
Wor	worniu (EST RE10012)	BamH I	EcoR I	T7	T3

2.7.- REACTIVOS Y SISTEMAS COMERCIALES DE BIOLOGÍA

MOLECULAR

- Acetato de sodio (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Aceite mineral (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Agarosa ultrapura (Fisher Scientific, New Jersey, EE.UU.)
- Alcohol isoamílico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Alcohol isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Anticuerpo anti-digoxigenina (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- BCIP (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Bromuro de Etidio (GIBCO BRL, California, EE.UU.)
- Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- DNA de salmón (Ambion Inc., Texas, EE.UU.)
- DNAsa I (Ambion Inc., Texas, EE.UU.)
- dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP 100 mM cada uno (Boehringer Mannheim, Alemania)
- DTT (Promega, Madison, EE.UU.)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Estándar de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, California, EE.UU)
- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico/ 25:24:1 (Winkler, Santiago, Chile)
- Fenol saturado ácido (Winkler, Santiago, Chile)
- Formamida (Merck, Darmstadt, Alemania)

- Heparina (Sigma, St Louis, EE.UU.)
- Inhibidor de RNAsa RNAsa Out (Invitrogen, California, EE.UU.)
- Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 500 µg/ml (Invitrogen, California, EE.UU.)
- NBT (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NTPs: ATP, CTP, GTP y UTP 100 mM cada uno (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- RNA de levadura (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- RNAsa H (Biolabs, EE.UU.)
- Sistema comercial de obtención de DNA desde geles de agarosa, (Quiagen, Standford, EE.UU)
- Sistema comercial de obtención de DNA plasmidial (Quiagen, Standford, EE.UU)
- Sistema comercial de obtención de RNA (Quiagen, Standford, EE.UU)
- Sistema comercial para marcar sondas RNA con Digoxigenina (Boehringer Mannheim, Alemania)
- SP6 RNA polimerasa 20U/µl (Ambion Inc., Texas, EE.UU.)
- T3 RNA polimerasa 20U/µl (Promega, Madison, EE.UU.)
- T7 RNA polimerasa 20U/µl (Promega, Madison, EE.UU.)
- Taq DNA polimerasa, tampón de PCR 10X y MgCl₂ 50 mM (Invitrogen, California, EE.UU.)
- Transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, California, EE.UU.)
- Trizol (Invitrogen California, EE.UU.)
- Tween-20 (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

2.8.- SOLUCIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- Amortiguador de electroforesis TAE 1X (Tris-acetato/EDTA)
- Hb-A (solución de hibridación): 50% formamida, 5X SSC, 100 µg/ml de DNA de salmón, 50 mg/ml heparina, 0,1% tween-20, 50 µg/ml RNA de levadura y agua DEPC.
- Hb-B (solución de pre-hibridación): 50% formamida, 5X SSC pH 5 y agua DEPC.
- NTP-DIG mix: mezcla de marcaje de nucleótidos para síntesis de sondas RNA para hibridación *in situ*: 10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP, 6,5 mM UTP y 3,5 mM UTP-DIG.
- Proteinasa K (Invitrogen, California, EE.UU.) 25 mg por 1 ml de agua
- PTw: PBS 1X, 0,1% tween-20
- Tampón de homogenización para DNA genómico: 10 mM Tris-Cl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl y 200 µg/ml Proteinasa K agregada fresca el día de su uso
- SDS 10%
- Solución AP: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 0,1% tween-20 y agua DEPC.
- Solución de alineamiento dsRNA: 1 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA
- Solución de inyección dsRNA: 5 mM KCl y 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,8.
- SSC 20 X: NaCl 3 M y Citrato de sodio 0,3 M pH 7,4.

3.- FIJACIÓN E INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES

3.1.- FIJACIÓN DE EMBRIONES SIN INYECTAR

3.1.1.- Remoción corion: Los embriones se recolectaron con agua destilada desde sus placas de recolección, se pusieron en mallas recolectoras, se les eliminó el corion con solución de hipoclorito de sodio al 50% durante 5 minutos y se lavaron con abundante agua.

3.1.2.- Fijación: con la ayuda de un pincel se pusieron los embriones sin corion en solución de fijación con PEM durante 20 minutos con agitación.

3.1.3.- Eliminación de la membrana vitelina: se utilizó el método de metanol-agitación (Goldstein y Fyrberg, 1994). Para ello, se descartó la fase acuosa inferior que corresponde al formaldehído, y se agregó metanol hasta completar 1 ml. Luego se agitó en vortex a máxima velocidad durante 1 minuto. Los embriones fijados y sin membrana vitelina son los que caen al fondo. Luego se descartó el líquido y se lavaron los embriones 3 veces con metanol. Los embriones así fijados se utilizaron inmediatamente o se guardaron en el metanol de su último lavado a -20°C .

Para fijar embriones de 15-22 horas, es decir de estadio 16 hasta antes del inicio de larva de primer estadio, se procedió de igual manera excepto que previo a la inmunotinción los embriones fueron sonicados para que los anticuerpos penetraran fácilmente la cutícula. Para ello, después de la fijación

se rehidrataron los embriones desde metanol, 3 veces 5 minutos y 1 por 30 en PT a temperatura ambiente, y se pusieron 100-150 μ l de embriones por tubo con 500 μ l de PT. Luego se sonicaron en hielo utilizando un sonicador Fisher, intensidad N^o 2, y se dieron 3 pulsos de 3 segundos cada uno, separados por intervalos de 3 segundos. Luego se lavó 2 veces por 5 minutos en PT.

3.2.- FIJACIÓN DE EMBRIONES INYECTADOS

A los embriones inyectados no se les puede eliminar la membrana vitelina con el método de agitación con metanol, por lo que es necesario eliminarla uno a uno con aguja de tungsteno. Para su fijación, se incubaron durante 1 hora en solución de fijación con 2,4 ml de n-heptano, 0,6 ml de formaldehído (37%), 0,16 ml de PBS 10X y 1,64 ml de agua, se pasaron por una malla recolectora para sacar el exceso de n-heptano, y se recolectaron en PT. Para eliminar la membrana vitelina, se ordenaron sobre una placa de agar de recolección de embriones y se transfirieron a una placa portaobjeto con cinta adhesiva doble faz. Los embriones así pegados en la placa se sumergieron en una placa de 10 centímetros de diámetro con PT y con la ayuda de una aguja de tungsteno afilada, se eliminó la membrana vitelina. Los embriones "pelados" se despegan de la placa, se recolectan con pipeta y se transfieren a tubos eppendorff para realizar inmediatamente el bloqueo e inmunotinción.

3.3.- INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES

La inmunotinción de embriones se realizó en tubos eppendorf de 1,5 ml, con el equivalente a 50-150 μ l de embriones en cada tubo. Todos los lavados se realizaron con 1 ml de PBT, con agitación y a temperatura ambiente. Después de fijar, y en los casos de embriones de estadio 16 después del procedimiento de sonicación, se hidrató o lavó 3 por 10 minutos con PBT, y luego se bloqueó con 1 ml de PBTG. La incubación con los anticuerpos primarios (uno, dos o los tres juntos) diluidos en PBTG, se realizó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron 3 veces por 5 minutos y luego 4 veces por 15 minutos con PBT, se bloquearon 30 minutos con PBTG y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el o los anticuerpos secundarios diluidos en PBTG. Luego se lavaron 3 por 5 minutos y luego 4 por 15 minutos con PBT. Cuando se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa (HRP), se incubaron los embriones durante 2 minutos con 200 μ l de solución DAB-Ni, luego se agregaron 10-30 μ l de solución fresca de H₂O₂ 0,3%. Se detuvo la reacción con 2 lavados de 1 minuto cada uno con PT. Luego se lavó 1 minuto con PBS 1X y se agregaron 500 μ l de glicerol 50% a cada tubo. El tiempo de incubación (entre 15 y 60 minutos) con el glicerol 50% a temperatura ambiente y sin agitación dependió de cuanto se quisiera aclarar la tinción con DAB-Ni. Finalmente se removió el glicerol 50% y se reemplazó por glicerol 75%, el que se dejó equilibrándose toda la noche a 4°C. En el caso de las tinciones

fluorescentes, se incubó 1 hora a temperatura ambiente con glicerol 75%, y luego se equilibró a 4°C con el medio de montaje Vectashield.

3.4.- INMUNOTINCIÓN CEREBROS DE LARVA

Se disectaron cerebros de larvas de 3^{er} estadio en solución de disección libre de Ca⁺⁺ fría y se fijaron en formaldehído al 4% en solución PEM con 0,1% de tritón X-100 durante 30 minutos con agitación y a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con solución PT y se bloqueó 1 hora a temperatura ambiente en PT con 1% BSA. Se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó 3 veces por 10 minutos con PT, se incubó 2 horas con el anticuerpo secundario, se lavó 3 veces por 10 minutos con PT. Previo al montaje se equilibró al menos 1 hora con medio de montaje (Vectashield).

TABLA 5: Anticuerpos primarios utilizados para la inmunotinción de embriones y cerebros de larvas

Anticuerpo	Especie	Origen	Especificidad	Dilución
22C10	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Algunas neuronas del SNC y todo el SNP	1:10
β -galactosidasa	Ratón	Promega ³	Enzima β -galactosidasa	1:500
BP102	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Axones del SNC de <i>Drosophila</i>	1:10
Dlg _{PDZ} (4F3)	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Dominio PDZ 2 de <i>dlg</i> de <i>Drosophila</i>	1:500
Dlg _{S97N} (purificado)	Conejo	Mendoza y col. 2003	Región S97N de <i>dlg</i> de <i>Drosophila</i>	1:100
Elav (9F8A9)	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Marcador de neuronas postmitóticas	1:10
Engrailed (4D9)	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Marcador de un grupo grande de neuronas del SNC y algunas del PNS	1:10
Even-skipped (2B8)	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Marcador de un grupo de motoneuronas e interneuronas	1:30
Fas II (1D4)	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Neuronas de las vías MP1 y FN3, y motoneuronas IS y S	1:100
GFP (3E6)	Ratón	Molecular Probes	Proteína fluorescente verde (GFP)	1:500
HB9	Rata	Dr. C.Q. Doe ²	Marcador de un grupo de motoneuronas e interneuronas	1:500
Miranda	Rata	Dr. C.Q. Doe ²	Marcador basal de neuroblastos mitóticos	1:1000
Repo (8D12)	Ratón	Hybridoma Bank ¹	Marcador de glía	1:10

SNC = Sistema nervioso central

SNP = Sistema nervioso periférico

¹: DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, EE.UU.

²: Dr. Chris Q. Doe, Institute of Molecular Biology, Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon, EE.UU.

³: Promega, Madison, EE.UU.

⁴: Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.

TABLA 6: Anticuerpos secundarios utilizados en la inmunotinción de embriones y cerebros de larvas

Nombre anticuerpo	Marca y origen	Dilución
Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.	1:200
Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.	1:200
Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con Alexa Fluor 546	Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.	1:200
Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa Fluor 546	Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.	1:200
Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con Alexa Fluor 633	Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.	1:200
Anti-IgG (H+L) de rata conjugado con Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.	1:200
Anti-IgG (H+L) de conejo acoplado a peroxidasa	Jackson InmunoResearch Labs, West Grove, Pensilvania, EE.UU.	1:500
Anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a peroxidasa	Jackson InmunoResearch Labs, West Grove, Pensilvania, EE.UU.	1:500

3.5.- MARCAJE DE NEUROBLASTOS MITÓTICOS CON IODURO DE PROPIDIO

Después de realizada la inmunotinción de los embriones con el o los anticuerpos primarios y secundarios, se eliminó el PBT del último lavado y se agregó RNasa 10 mg/ml y se incubó a 37°C durante 2 horas. Se removió la RNasa, se lavó con PBT 4 veces por 5 minutos, y luego 4 veces por 5 minutos con PBS1X. Se reemplazó el último PBS por 500 µl de glicerol 50% en PBS, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se reemplazó el glicerol 50% por glicerol 70% en PBS, se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se eliminó el glicerol 70% y se agregó medio de montaje (Vectashield) con yoduro de propidio 1X. Se incubó toda la noche a 4°C y se montaron al día siguiente.

3.6.- REACTIVOS UTILIZADOS EN LA FIJACIÓN E INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES Y CEREBROS DE LARVAS

- BSA: albúmina de suero bovino (Winkler, Santiago, Chile)
- Formaldehído 37% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Glicerol 100% (Winkler, Santiago, Chile)
- H₂O₂ 30% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ioduro de propidio 1000X: 1 mg de ioduro de propidio en 1 ml de agua.
- Medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- n- Heptano (Merck, Darmstadt, Alemania)
- NiCl₂ * 6H₂O (Sigma, St. Louis, EE.UU.) al 8%
- Suero de cabra (Invitrogen, California, EE.UU.)
- Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

3.7.- SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA FIJACIÓN E INMUNOTINCIÓN DE EMBRIONES Y CEREBROS DE LARVAS

- Fijador con PEM: Se preparó en el momento de utilizar. Para 1 ml, se utilizaron 162 µl formaldehído 37%, 338 µl de solución PEM y 500 µl de n-heptano, y luego se agitó 30 segundos para saturar las fases.
- Glicerol 50% y 70% en PBS 1X
- PBS 10 X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 18,06 g NaH₂PO₄ * 2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ pH6,8

- PBT: PT con 1% BSA
- PBTG: PBT con 5% de suero de cabra
- PEM: 100 mM PIPES como sal disódica, 2 mM EGTA y 1 mM MgSO₄
- PT: PBS 1X con 0,1% tritón X-100
- Solución DAB-Ni: 30 µl de solución de DAB, 962 µl de agua y 8 µl de solución de NiCl₂ al 8%
- Solución de diaminobencidina (DAB): 10 mg de DAB (Sigma, St. Louis, EE.UU.) en 1ml de agua destilada
- Solución de disección libre de Ca⁺⁺: 128 mM NaCl, 2 mM KCl, 4 mM MgCl₂ * 6 H₂O, 35,5 mM sacarosa, 5 mM HEPES y 1 mM EGTA, pH 7,2.

4.- PROTEÍNAS

4.1.- EXTRACTOS PROTEICOS

Para los ensayos de Western blot con extractos embrionarios se homogenizó el equivalente a una media placa de puesta de embriones (aproximadamente 50 µg) en homogenizadores de vidrio (Kontes Glass Company, NJ, EE.UU) con 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 150 mM de NaCl, se centrifugó 10 minutos a 800 g a 4°C y se resuspendieron las membranas sedimentadas en solución RIPA con SDS e inhibidores de proteasas 1X. Luego se centrifugó 10 minutos a 800 g a 4 °C , se eliminó el precipitado y se agregó tampón de carga.

Para los ensayos de Western blot de cabezas de moscas adultas se homogenizaron 2 cabezas en 60 μ l de tampón RIPA con SDS y con inhibidores de proteasas, se centrifugó a 800 g por 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se agregó tampón de carga. Se cargó el equivalente a media cabeza por carril.

4.2.- SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

- Mezcla de inhibidores de proteasas 10X (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- PMSF 0,5 mM (Boehringer, Mannheim, Alemania).
- Solución RIPA: 20 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasas (7,7 μ M de PMSF y 1X de mezcla de inhibidores de proteasas).
- RIPA con SDS: solución RIPA con 0,1% SDS.

4.3.- WESTERN BLOTS

Los extractos proteicos en tampón de carga y previamente hervidos 10 minutos fueron separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE, con geles concentradores al 4% y separadores al 8% de acrilamida:bis-acrilamida (1:30), y corridos por 1,5 horas a un voltaje constante de 110 volts. Una vez concluida la electroforesis se transfirieron los geles a membranas de nitrocelulosa por 1

hora 30 minutos a 110 volts constante. Se bloquearon la membranas con solución de bloqueo a temperatura ambiente y con agitación durante 1 hora. Luego se incubó con el anticuerpo primario disuelto en PTw durante toda la noche a 4°C y con agitación. Luego se lavó 4 veces con agitación por 5 minutos a temperatura ambiente con PTw. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo con agitación por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 4 veces con agitación por 5 minutos con PTw. Para el revelado se utilizó el sistema comercial quimioluminiscente ECL (Enhanced Chemiluminescence).

TABLA 7: Anticuerpos utilizados en Western blots

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Anti-Dlg _{S97N} (suero no purificado)	1: 20.000	Anti-IgG de conejo acoplado a HRP	1: 20.000
Anti-Dlg _{PDZ} (4F3, Hibridoma Bank)	1: 5.000	Anti-IgG de ratón acoplado a HRP	1: 10.000
Anti β -tubulina (12G10, Hibridoma Bank)	1: 5.000	Anti-IgG de ratón acoplado a HRP	1: 10.000

4.4.- SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTS

- Acrilamida/ Bisacrilamida 40% (29:1) (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Amortiguador de corrida: TRIS 25 mM, Glicina 80 mM, SDS 1,7 mM, pH 8,3)
- Amortiguador de muestra 6x (SDS y β -mercaptoetanol)

- Amortiguador de transferencia (Glicina 39 mM, TRIS 48 mM, SDS 0,037%, Metanol 20%)
- Membrana de nitocelulosa (BioRad, California, EE.UU.)
- Metanol técnico (TCL, Santiago, Chile)
- Estándar de peso molecular de proteínas de amplio rango (BioRad, California, EE.UU.)
- Placas fotográficas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra).
- PTw: Tween-20 0,5% (v/v) en PBS 1X
- Sistema comercial quimiluminoscente Super Signal West Pico Chemiluminoscent Substrate (Pierce, IL, EE.UU.)
- Solución de bloqueo: leche descremada Svelty 5% en PTw.
- TEMED (Sigma, St. Louis, EE.UU.).
- Tween-20 (Sigma, St. Louis, EE.UU.).
- Persulfato de amonio (Winkler, Santiago, Chile) al 10% v/v en agua.
- Líquidos reveladores y fijadores Kodak

5.- ESTUDIOS DE FOTOTACTISMO

Para estudiar la respuesta a la luz de moscas adultas se realizó el siguiente protocolo (adaptado de Benzer S., 1967); se seleccionaron entre 80 y 130 moscas machos aproximadamente por genotipo anestesiándolas con CO₂ no más de 5 minutos, se pusieron en un tubo de ensayo, y se dejaron 1 hora en

posición horizontal a la luz y a temperatura ambiente. Luego se cambiaron de tubo de ensayo y se dejaron en completa oscuridad en posición horizontal durante 5 minutos. Luego en la misma pieza oscura se encendió una luz halógena de una intensidad de 15 watts como única fuente de luz, dispuesta a una distancia de 3 cm del fondo de un tubo de ensayo vacío conectado también en posición horizontal con el tubo con las moscas (como se indica en la figura 13). El ensayo consistió dejar que las moscas pasaran hacia el tubo que recibe la luz. Ese tubo (no el original) se fue cambiando cada un minuto durante 5 minutos. Finalmente se contaron las moscas que se fueron hacia la luz en el minuto 1, 2, 3, 4 y 5 y se graficó el porcentaje de moscas que permaneció en la oscuridad en cada punto con respecto al total de moscas iniciales. Para cada genotipo el ensayo se repitió entre 3 y 6 veces según se indica y con diferentes moscas. El número total de moscas utilizadas en cada ensayo fue entre 200 y 800.

6.- ADQUISICIÓN Y EDICIÓN DE IMÁGENES OBTENIDAS POR MICROSCOPIA

6.1.- CAMPO CLARO

Las imágenes obtenidas en campo claro fueron tomadas con microscopio Nikon E400 y con cámara digital Nikon Coolpix E5000.

6.2.- CONFOCAL

La microscopía confocal se realizó con un microscopio Zeiss LSM Meta 510. Todas las imágenes fueron procesadas con el programa Photoshop versión 7.0.

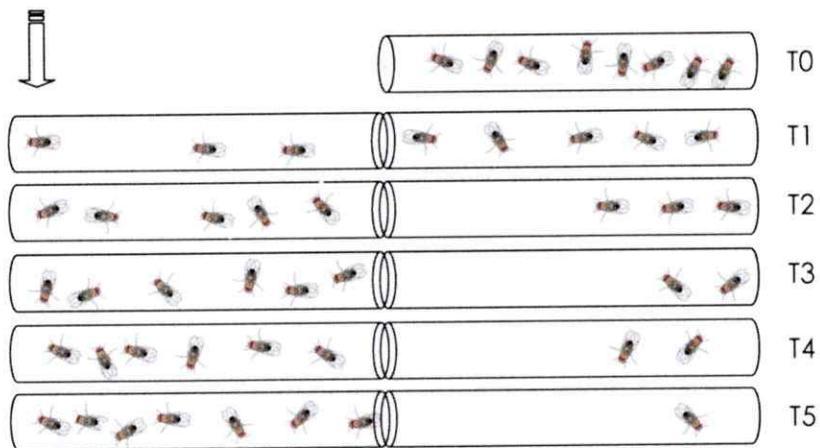


FIGURA 13: Ensayo de fototactismo

El tubo de ensayo de la derecha que contiene las moscas en el tiempo cero es siempre el mismo y el de la izquierda se cambia cada 1 minuto durante 5 minutos (T1 a T5). El tiempo se contabiliza desde que se da el estímulo luminoso. Se cuenta el número de moscas que se va hacia a la luz y que queda en los tubos de la izquierda en cada minuto.

RESULTADOS

1.- ANÁLISIS TEMPORAL Y ESPACIAL DE LA EXPRESIÓN DE DlgS97

1.1.- IDENTIFICACIÓN DE cDNAs EMBRIONARIOS DE *dlg* POR RT-PCR

Se analizó la expresión de DlgS97 durante el desarrollo embrionario a través de ensayos de RT-PCRs, Western blots, hibridaciones *in situ* e inmunotinciones. Para los RT-PCRs y Western blots se utilizaron embriones seleccionados de los siguientes intervalos de estadios: 0-4, 8-11, 12-17 en algunos casos y 15-16 en otros (ver sección materiales y métodos).

Los partidores utilizados para los estudios de RT-PCRs fueron llamados según la región característica a la que se unen, indicando en algunos casos si son en el sentido 5'-3' (for) o 3'-5' (rev) (ver tabla 3 y figura 14). En todas las reacciones de PCR de un mismo estadio se utilizó la misma preparación de cDNA y para cada reacción se agregó la misma cantidad de cDNA (1 μ l de una dilución 1/10 de la reacción de transcripción reversa). Se controló la contaminación por DNA genómico en la preparación de RNA realizando un PCR

con partidores de actina usando como templado RNA total. Si hubiera habido contaminación con DNA genómico en la preparación de cDNA, se habría obtenido una banda de aproximadamente 500 pb (figura 15A). Se utilizó la amplificación de actina como un control interno de la cantidad relativa de material en cada cDNA (figura 15B). El cDNA de actina se detecta desde los primeros estadios debido a la contribución materna y luego durante todo el desarrollo.

Con la pareja de partidores que amplifican el cDNA de dlG completo (ATG-dlG/GUK-rev, figura 14) se amplificó un fragmento de aproximadamente 2900 pb en todos los estadios del desarrollo estudiados y que corresponde en tamaño al de dlG (2880 pb). Además se amplificó otro fragmento de aproximadamente 2500 pb en embriones de estadio 15-17 (figura 15C). Con los partidores que amplifican el cDNA de dlGS97 entero (ATG-S97N/GUK-rev) no se amplificó ningún producto en embriones de estadio 0-4 (figura 15D) y en estadio 15-16 se obtuvo un producto de aproximadamente 2900 pb que corresponde en tamaño con los 2850 pb del cDNA de dlGS97. En embriones del intervalo 0-4 no se observaron productos usando distintos partidores que amplifican regiones parciales de dlGS97; partidore ATG-S97N junto con partidore PDZ1-rev (figura 15H), ATG-S97N/PDZ3-rev (figura 15J) o ATG-S97N/SH3-rev (figura 15L).

El exón 12 sólo está presente en el cDNA de dlG, sin embargo se obtuvieron productos con los partidores ATG-S97N y Exon12-rev en embriones

tardíos aún a temperaturas de apareamiento de 68°C (figura 15F). Se incluyeron en éstos y en todos los PCRs los controles con sólo un partidor, de modo de asegurarse que los partidores no se estuvieran uniendo en forma inespecífica al cDNA. Con los partidores ATG-dlgA/E12-rev (figura 15E) y E12-for/GUK-rev (figura 15G) se obtuvieron bandas únicas de aproximadamente 1300 pb y 2000 pb respectivamente durante todo el desarrollo embrionario, las que corresponden en tamaño a los fragmentos amplificados en dlgA (1340 y 1970 pb respectivamente).

Con el partidor ATG-S97N y un partidor reverso se observaron productos en el intervalo 8-11 (figura 15D, F, H y J), pero fueron bandas muy débiles y en algunos casos (figura 15 F y D) de un tamaño un poco diferente a las obtenidas en los embriones tardíos (intervalo 15-17).

Con otras parejas de partidores que amplifican fragmentos del cDNA de dlgA se obtuvieron más bandas que las correspondientes a dlgA en cDNAs de embriones de estadio 8 en adelante. Con los partidores ATG-dlgA/PDZ3-rev (figura 15I) se obtuvo sólo una banda de aproximadamente 1900 pb en embriones de estadio 0-4 y en embriones del intervalo de estadio 8-17 se obtuvieron dos bandas adicionales de aproximadamente 1800 y 1300 pb cada una. Por su tamaño similar sólo la banda de 1900 podría corresponder a la amplificada en el cDNA de dlgA (1880 pb). Con la pareja de partidores ATG-dlgA/SH3-rev se obtuvo una única banda de aproximadamente 2000 pb en embriones de estadio 0-4 y desde estadio 8 en adelante se obtuvieron otras dos

bandas más de menor tamaño molecular (figura 15K). La banda de 2000 pb corresponde en tamaño a la de *dlgA* (1900 pb). No se encontró alguna otra condición del PCR más estricta que permitiera limpiar el producto de estas bandas adicionales.

Con otras parejas de partidores que amplifican fragmentos del cDNA de *dlgS97* se obtuvieron más bandas que las correspondientes a *dlgS97* en cDNAs de embriones tardíos. Con los partidores ATG-S97N/PDZ1-rev se obtuvieron dobletes de alrededor de 500 pb en cDNA de embriones de estadio 12 en adelante (figura 15H) siendo 480 pb la banda amplificada para *dlgS97*. Con los partidores ATG-S97N/SH3-rev se obtuvo una banda de aproximadamente 1800 pb y otra de mayor tamaño molecular en cDNA de embriones de estadio 15-17, siendo 1800 pb el producto amplificado para *dlgS97*.

Estos resultados sugieren que existen otras variantes de procesamiento alternativo de *dlg*, además de *dlgA* y *dlgS97* que se expresan especialmente en estadios tardíos del desarrollo embrionario. Esas otras variantes difieren en dos regiones, una comprendida entre el dominio L27 y el primer PDZ, y la segunda entre el segundo y el tercer dominio PDZ. Estos resultados además demuestran que la variante *dlgS97* es de expresión cigótica y que su expresión comienza débilmente en algún momento del intervalo de estadios 8-11 y que en estadios tardíos su expresión es muy fuerte.

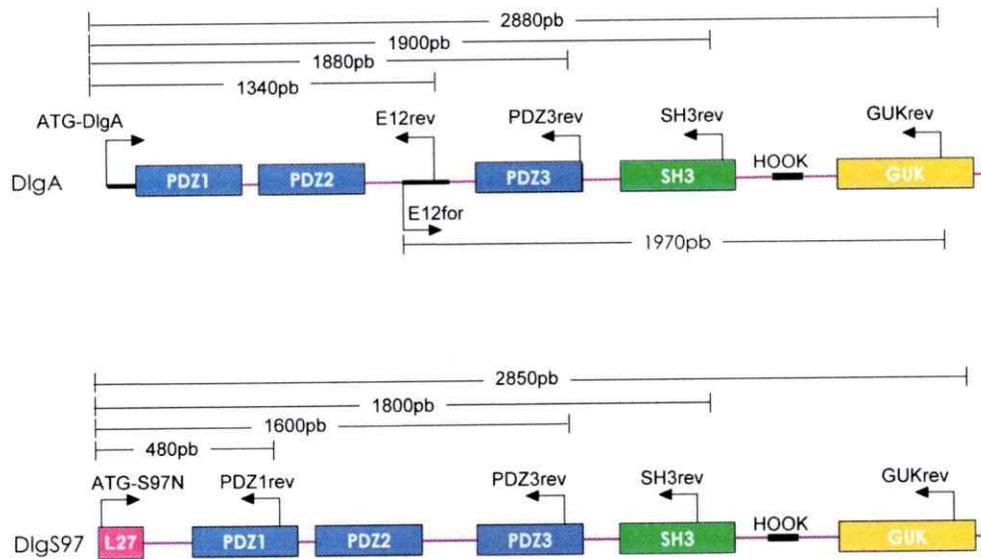


FIGURA 14: Partidores utilizados en los experimentos de RT-PCR de embriones

Esquema de las proteínas DlgA (arriba) y DlgS97 (abajo) con la ubicación relativa de cada partidor en el cDNA correspondiente y los tamaños de los productos esperados. Las cajas coloreadas representan los dominios de interacción proteína-proteína (ver figura 6).

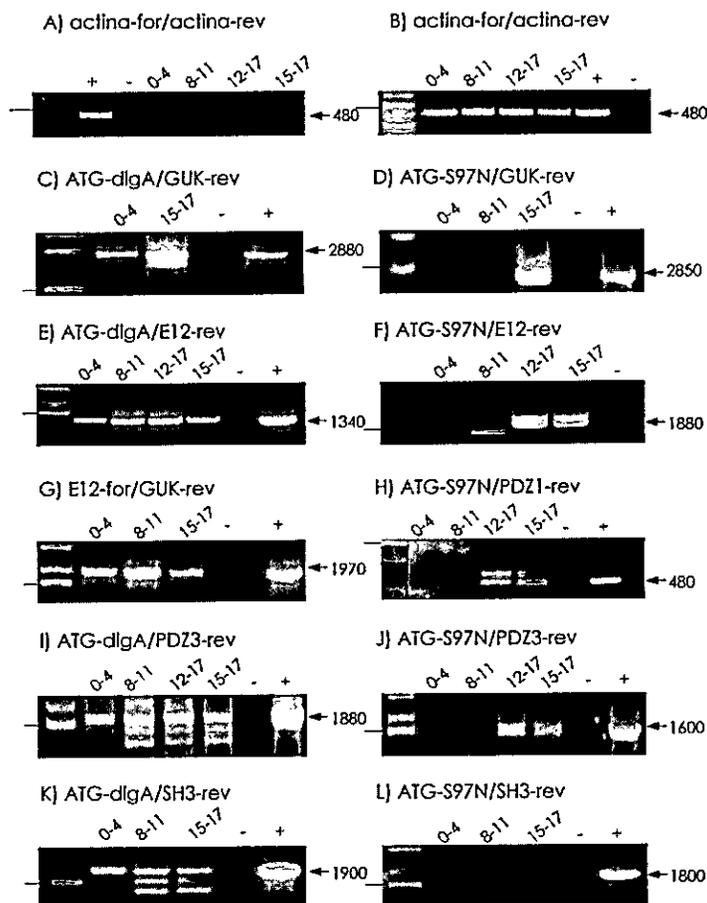


FIGURA 15: RT-PCRs de embriones por estadios

(A) PCR con partidores de actina con cada RNA previo a la obtención de los cDNAs para verificar la ausencia de DNA genómico. (B-L) RT-PCRs. En la parte superior de cada gel se indican los partidores específicos utilizados y los cDNAs utilizados. (C), (E), (G), (I) y (K) Reacciones que amplifican fragmentos de la variante dlgA y (D), (H), (J) y (L) amplifican fragmentos de dlgS97. A la derecha de cada gel se indican los tamaños de los fragmentos amplificados que corresponden a dlgA o dlgS97 según sea el caso (con excepción de F). - y + denotan los controles negativo (sin cDNA) y positivo respectivamente. Los controles positivos fueron DNA plasmidial de actina clonado en pBluescript II (para A y B), dlgA clonado en pBluescript II (para C, E, G, I y K) y dlgS97 clonado en pCRII (para D, H, J y L). La barra dibujada a izquierda de cada gel indica la banda de 1,6 Kb del estándar de peso molecular, con excepción de A y B que indica la banda de 500 pb y de D que indica la banda 3 Kb.

1.2.- IDENTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS DE *dlg* POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* EN EMBRIONES

Para poner a punto la técnica de hibridación *in situ* se realizaron hibridaciones con sondas dirigidas contra transcritos de los que se conoce muy bien su expresión, como son los genes de *even-skipped* (*eve*) y *engrailed* (*en*) (figura 16A, B y C). Para estudiar la expresión de *dlg* se generaron 3 tipos de sondas: una específica para *dlgA* dirigida contra el exón 8 (sonda E8), otra dirigida al exón 7 (sonda E7) que corresponde al 3' no traducido codificado por el EST LD33841 y que es una variante que posee el dominio L27 y ningún otro dominio de interacción proteína-proteína, y finalmente una sonda que comprende los exones 1, 3, 4 y parte del 6 (sonda S97N) (ver parte superior figura 16).

Tanto la sonda E7 (figura 16G-I) como la sonda de S97N (figura 16E-H y M-P) marcan en forma específica el sistema nervioso mientras que la sonda E8 (figura 16D-F) tuvo una expresión más amplia y difusa (por comparación con la hibridación con una sonda sentido, no mostrado). Tanto con la sonda E7 como con la sonda S97N se observó marca en el cordón ventral y cerebro desde estadio 12 hasta 16. No se observó marca con la sonda S97N ni con E7 en estadios previos a 10, mientras que con la sonda E8 se observó una marca fuerte y difusa durante todo el desarrollo embrionario. La primera marca de S97N, aunque muy suave pero detectable, fue en estadio 10 (figura 17F) y en toda la futura región neurogénica ventral. En estadio 12 temprano la marca se

hace un poco más fuerte (figura 17G) y en 12 tardío (figura 17H) es aún más notoria. Finalmente, de estadio 14 a 17 la marca se detectó muy concentrada en todo el cordón ventral y cerebro (figura 17N-P).

En la figura 17A-D, 17I-L y 17T-V se puede ver la hibridación *in situ* del marcador de neuroblastos *worniu* (*wor*) en estadios y posiciones similares a las mostradas para S97N. En acercamientos de embriones de estadio 12 temprano se observa que la marca de S97N está en una capa celular más interna que la correspondiente marcada por *worniu* (figura 17Q-V). Por lo tanto, el transcrito de *dlgS97* no se expresa en los neuroblastos.

1.3.- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DlgS97 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

En ensayos de Western blot con el anticuerpo monoclonal que reconoce el dominio PDZ 2 de *dlg* (anticuerpo *dlg*_{PDZ}) se detectó una banda cercana a los 116 KDa durante todo el desarrollo embrionario, siendo mayor su expresión desde estadio 8 en adelante (figura 18B), momento durante el cual aparece una segunda banda de un tamaño un poco menor. Con el anticuerpo policlonal *dlg*_{S97N} se detectó un doblete cerca de los 116 KDa sólo en los extractos correspondientes a embriones tardíos (figura 17A). Por lo tanto, las proteínas codificadas por *dlg* más abundantemente expresadas en embriones corresponden a proteínas de alto peso molecular.

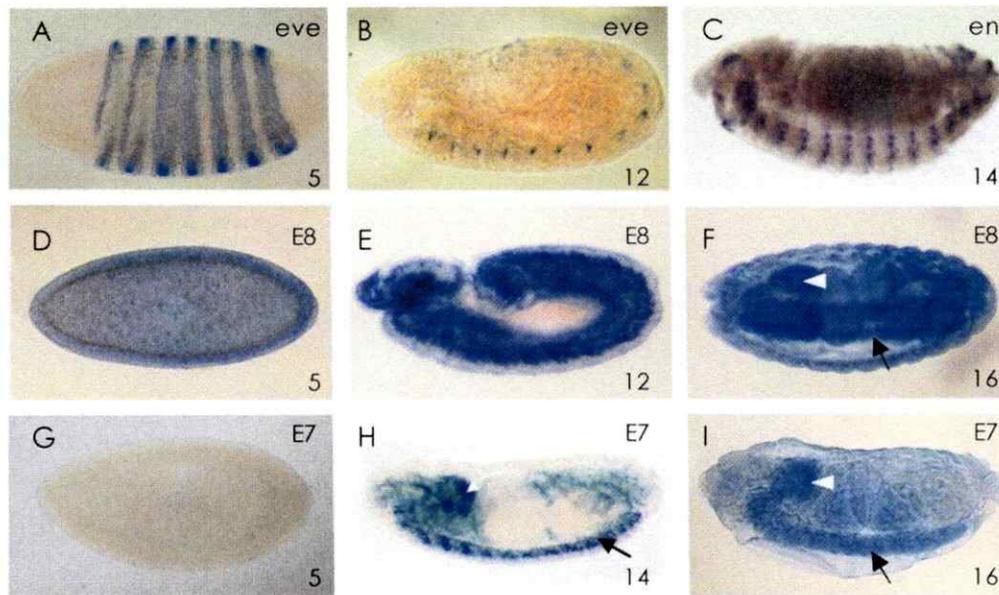
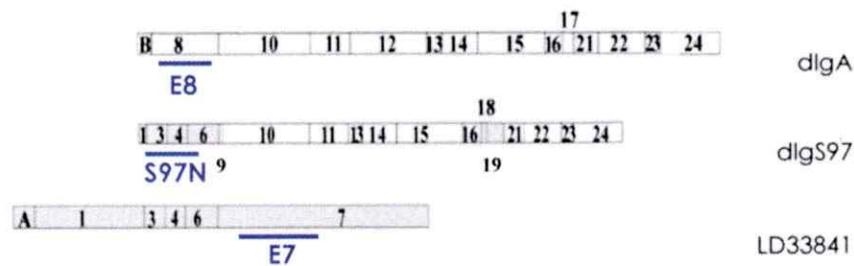


FIGURA 16: Los RNAs de *dlgA* y de variantes con Exón 7 se expresan en el sistema nervioso

Arriba: esquema de la composición exónica de los cDNAs de *dlgA*, *dlgS97* y del EST LD33841 indicando las regiones de reconocimiento de las sondas RNA de *dlg* E8, S97N y E7 respectivamente utilizadas en las hibridaciones *in situ*.

Abajo: Vistas laterales de embriones enteros a los que se le realizó hibridación *in situ* con las sondas indicadas en la esquina superior derecha de cada foto; even-skipped (A-B), engrail (C), E8 (D-F) y E7 (G-I). El estadio embrionario se indica en la esquina inferior derecha. Las flechas negras indican la marca de la hibridación en el cordón ventral y las cabezas de flecha blanca indican la marca del cerebro. En ésta y en todas las figuras anterior se ubica a la izquierda y posterior se ubica a la derecha.

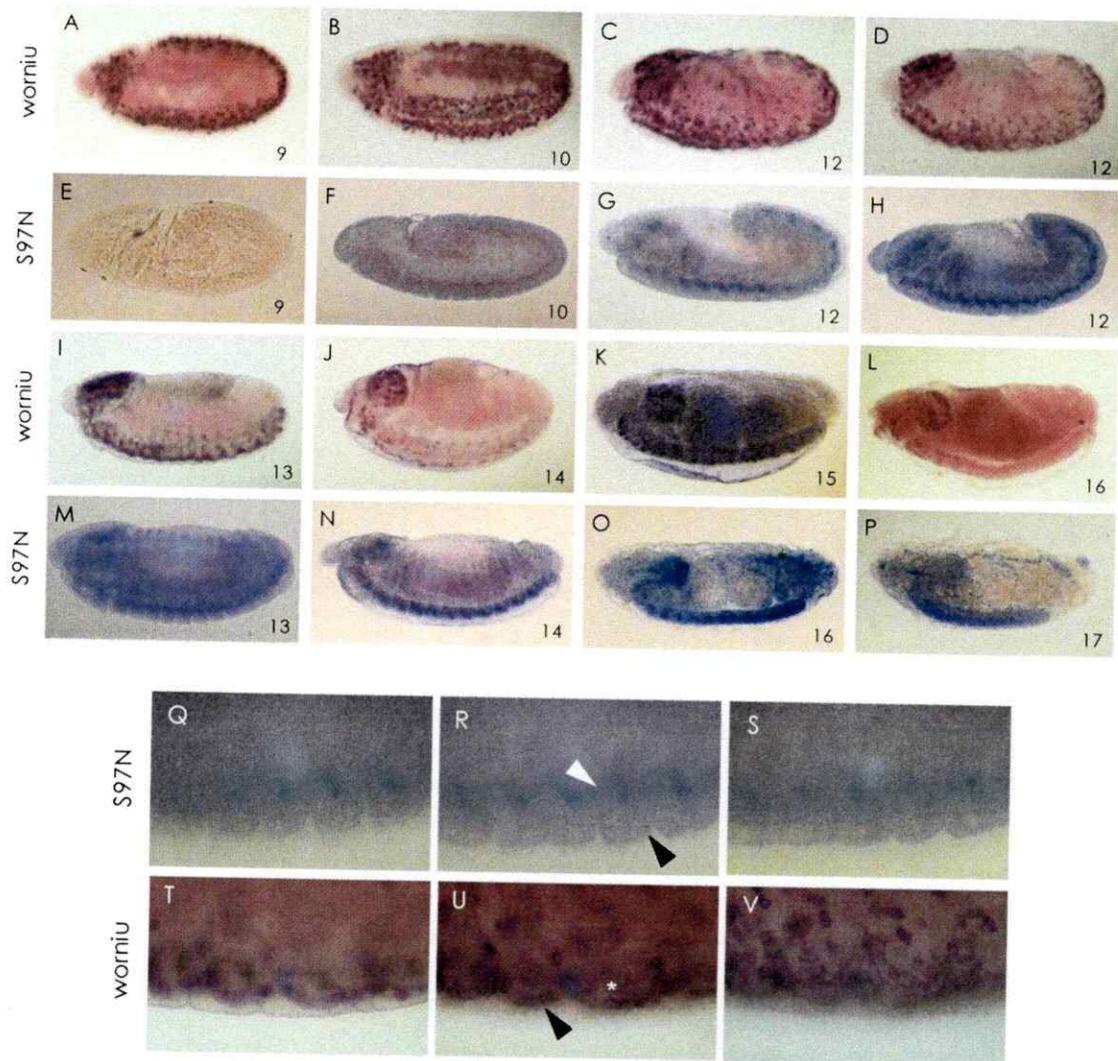


FIGURA 17: Transcritos de *dlgS97* y de *worniu* en sistema nervioso embrionario

Hibridación *in situ* de embriones enteros vistos lateralmente con la sonda de *worniu* (A-D, I-L y T-V) y con la sonda S97N (E-H y M-S). (Q-V) es un acercamiento de embriones de estadio 12 temprano. (Q) y (T) son vistas profundas, (S) y (V) son vistas superficiales y (R) y (U) son vistas intermedias. Las cabezas de flecha negra indican la capa celular marcada con *worniu* y la cabeza de flecha blanca indica la capa celular marcada con S97N. El asterisco blanco indica un neuroblasto.

La figura 19 muestra el patrón de expresión de la proteína DlgS97 durante el desarrollo embrionario utilizando el anticuerpo primario dlg_{S97N} detectado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. La proteína se detecta débilmente en estadio 12 tardío en axones del cordón ventral, pero se hace mucho más notoria desde estadio 14 en adelante. En estadios tardíos se detectó su expresión en cerebro, en las gónadas, y en los tractos axonales de comisuras y conectividades del cordón ventral. También se marcaron las motoneuronas que salen del sistema nervioso central hacia la periferia, y los sitios de unión del músculo.

El anticuerpo 22C10 reconoce a una proteína tipo MAP1B específica de neuronas y es un anticuerpo muy utilizado para marcar el sistema nervioso periférico embrionario ya que marca selectivamente todos los procesos de neuronas sensoriales (figura 20A-C). Con inmunofluorescencia se detectó DlgS97 en el sistema nervioso periférico, donde se observó la marca en los bordes de los somas neuronales y en los axones proximales del órgano cordotonal que es un grupo de neuronas laterales del sistema nervioso periférico (figura 20D-F).

La figura 21A-C muestra cortes ópticos del cordón ventral teñido con el anticuerpo dlg_{S97N} , desde una vista dorsal (figura 21A) hasta una vista ventral (figura 21C), destacando la marca en las raíces de los nervios intersegmentales y segmentales y en las comisuras anterior y posterior. No se detectó DlgS97 en los bordes laterales de las células epiteliales (figura 21D-L).

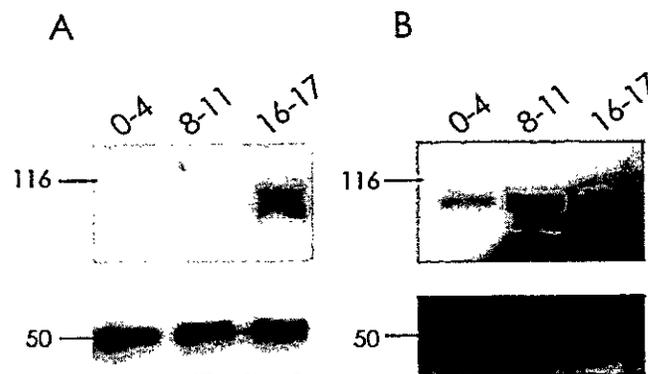


FIGURA 18: DlgS97 y DlgA en Western blot de extractos proteicos embrionarios

Las membranas fueron cortadas y las proteínas de alto peso molecular fueron incubadas con el anticuerpo dlg_{S97N} (A) y dlg_{PDZ} (B) y con anti-tubulina para las de bajo peso molecular (membranas de abajo). En la parte superior se indican los intervalos de estadios de cada extracto. Los tamaños indicados a la izquierda de cada membrana se expresan en KDa.

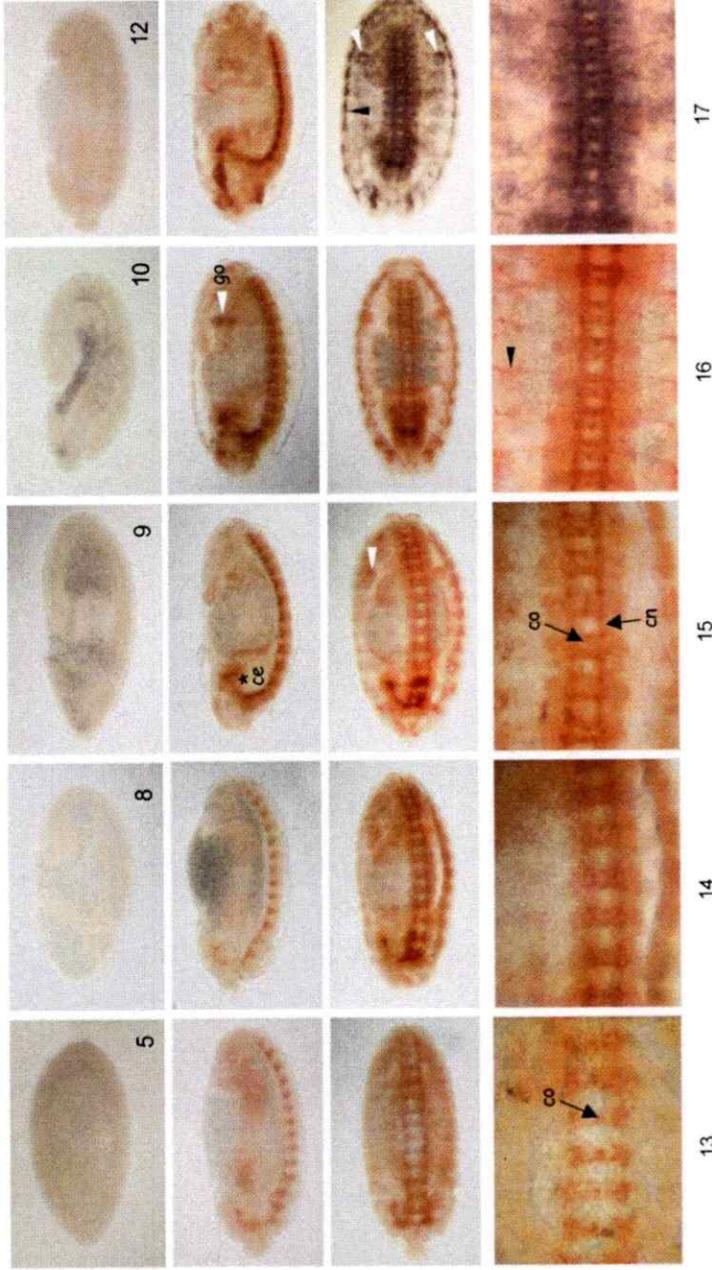


FIGURA 19: Inmunodetección de DlgS97 durante el desarrollo embrionario

Las dos primeras filas corresponden a una vista lateral y las dos últimas a vistas ventrales de embriones teñidos con el anticuerpo dlg_{S97N} . En la primera fila se indican los estadios del desarrollo en la esquina inferior derecha y en las otras tres filas se indican por columna en la parte inferior de cada una. Se ve la marca de DlgS97 desde fines de estadio 12 en adelante. Las cabezas de flecha blanca indican la marca en gónadas (go), el asterisco muestra la marca en el cerebro (ce), la cabeza de flecha negra en el embrión de estadio 17 indica la marca en los sitios de unión al músculo y en el acercamiento del embrión de estadio 16 indica las motoneuronas marcadas que salen del SNC hacia la periferia. Las flechas negras muestran la marca en los tractos axonales de comisuras (co) y conectividades (cn) del cordón ventral.

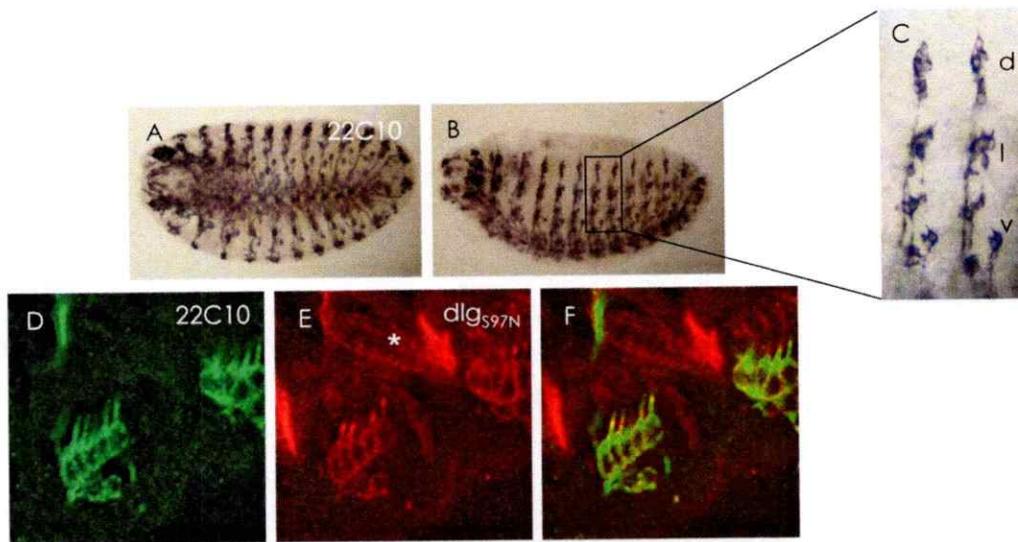


FIGURA 20: DlgS97 se expresa en el sistema nervioso periférico

(A-C) Inmunohistoquímica con anticuerpo 22C10 en embriones enteros. (A) vista ventral, (B) vista lateral y (C) acercamiento de dos segmentos vistos lateralmente, donde d, l y v señalan los grupos de neuronas del sistema nervioso periférico dorsal, lateral y ventral respectivamente. (D-F) Imágenes del órgano cordotonal del sistema nervioso periférico obtenidas por microscopía confocal con los anticuerpos 22C10 en verde (D), dlg_{S97N} en rojo (E) y la superposición de D y E (F).

Tanto el anticuerpo que reconoce los dominios PDZs como el que reconoce el dominio L27 marcaron los axones del cordón ventral (figura 21J-L).

Se realizaron tinciones dobles y en algunos casos triples con el anticuerpo dlg_{S97N} y anticuerpos que reconocen diferentes grupos neuronales (figura 22). Los anticuerpos para Fasciclina II (figura 22A-B) y 22C10 (figura 22C) marcan determinados grupos axonales, mientras que los anticuerpos de Engrail (figura 22D), HB9 (figura 22E) y Even-skipped (figura 22E) reconocen

factores transcripcionales característicos de ciertos grupos de motoneuronas o interneuronas. El anticuerpo anti-Elav en cambio reconoce un factor transcripcional presente en todas las neuronas postmitóticas (figura 22F). Para el marcaje de la glía de la línea media se utilizó la tinción con β -galactosidasa de embriones de la cepa transgénica UAS- β Gal, LM-Gal4, que expresa β -galactosidasa en dicha glía (figura 22G). Para el marcaje de células gliales recién formadas se utilizó la tinción con β -galactosidasa de embriones de la cepa UAS- β Gal, gcm- β Gal4 que expresa β -galactosidasa en las células positivas para el marcador gcm (*glial cells missing*) (figura 22H). La glía madura se marcó con Repo (figura 20I). El anticuerpo dlG_{S97N} marcó todos los axones positivos para FasII y 22C10, y corticalmente en los somas de todas las neuronas positivas para Elav. Por lo tanto DlgS97 se expresa en todas las neuronas maduras. El factor transcripcional Engrail (En) también se expresa en algunos precursores neuronales, pero todas las neuronas positivas para En y Elav fueron positivas para dlG_{S97N}. Todas las neuronas positivas para HB9 e Eve expresaron DlgS97. No se detectó expresión de DlgS97 en la glía (figura 22L).

Estos resultados nos indican que DlgS97 se expresa el soma y en los axones de un grupo heterogéneo de interneuronas y motoneuronas maduras.

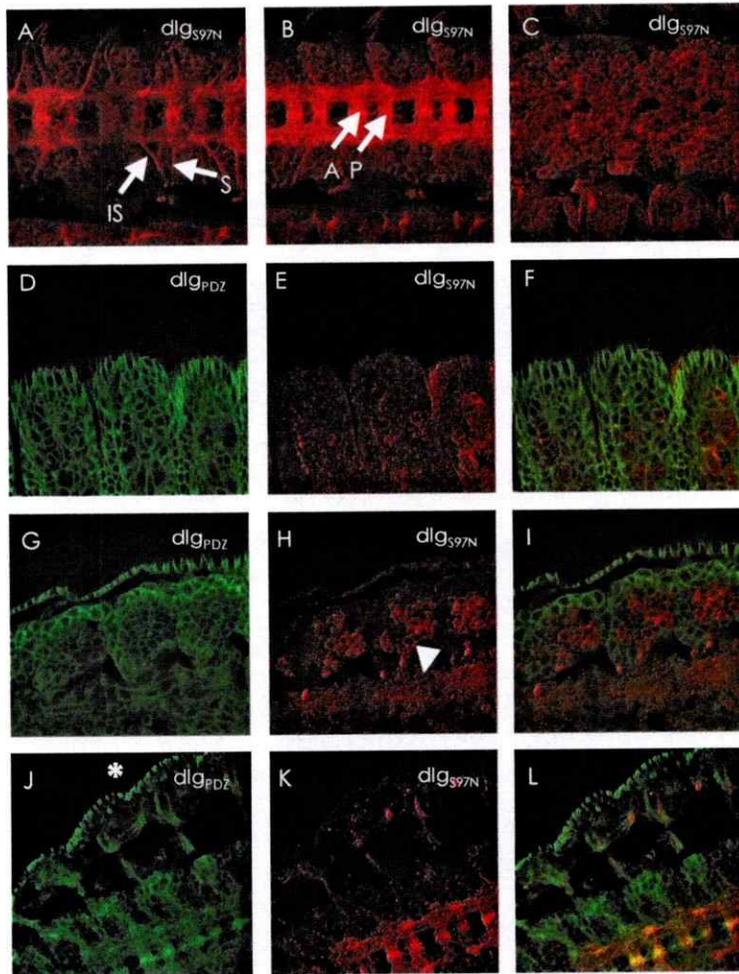


FIGURA 21: DlgS97 se expresa en sistema nervioso y no en los tejidos epiteliales

Inmunofluorescencia de embriones enteros marcados con los anticuerpos dlg_{S97N} y dlg_{PDZ} . (A-C) Secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal de un mismo embrión marcado sólo con el anticuerpo dlg_{S97N} . (A) es una vista dorsal y (C) es la vista más ventral. (D-I) Diferentes cortes ópticos de un mismo embrión de estadio 16, (D-F) vista superficial donde se ve la marca de PDZs en el epitelio y (G-I) vista más profunda donde se ve la marca de ambos anticuerpos en los músculos (cabeza de flecha blanca) en (H). (J-L) Vista dorsal de un mismo embrión de estadio 16. El asterisco indica la marca de PDZs en la región lateral del epitelio, región no marcada con el anticuerpo dlg_{S97N} . Los paneles (F), (I) y (L) corresponden a las imágenes de la superposición de (D-E), (G-H) y (J-K) respectivamente.

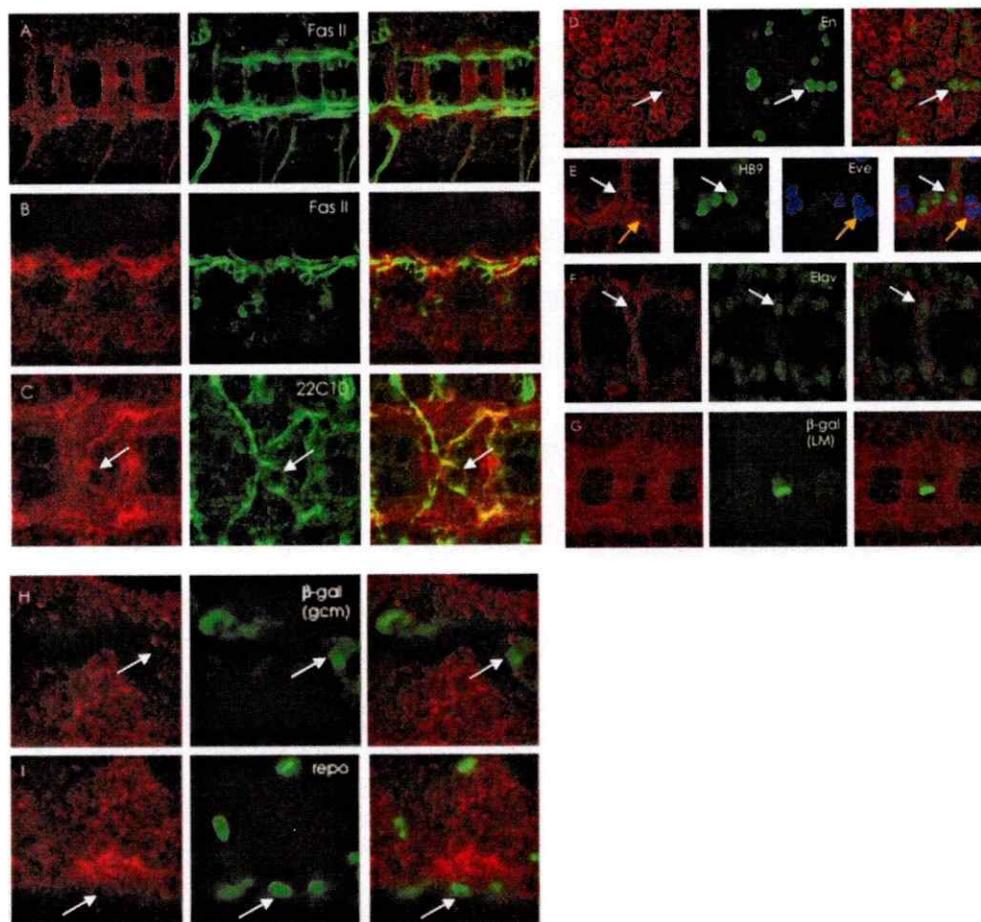


FIGURA 22: DlgS97 se expresa en un grupo heterogéneo de neuronas

Inmunofluorescencia de cordón ventral de embriones marcados con dlg_{S97} (en rojo) y diferentes marcadores neuronales; Fasciclina II (**A y B**), 22C10 (**C**), Engrail (**D**), HB9 e Eve (**E**), Elav (**F**) y repo (**I**). En (**G**) y en (**H**) se realizó la tinción con anticuerpo anti β -galactosidasa en embriones transgénicos que la expresan en glía de la línea media (**G**) y en células células gcm (**H**). Todas son vistas ventrales, menos (**B**), (**H**) e (**I**) que corresponden a vistas laterales. Las flechas indican una misma neurona.

2.- PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE DlgS97 POR INYECCIÓN DE dsRNA

2.1.- OBTENCIÓN dsRNAs

La figura 23A muestra ejemplos de la obtención de dsRNAs. La técnica de RNAi por inyección de dsRNA ha demostrado ser eficiente en embriones de *Drosophila* utilizando concentraciones desde 0,2 hasta 5 μ M (Kennerdell y Carthew, 1998). Para controlar que los efectos observados sean debido a la inyección del dsRNA y no a la inyección misma o a efectos inespecíficos del dsRNA, se analizó la navegación axonal por tinción con el anticuerpo 22C10 en embriones inyectados con 0,25 μ g/ μ l de dsRNA-S97N y en embriones inyectados con 0,25 μ g/ μ l de dsRNA-GFP. Se utilizaron embriones de la cepa número 7472 de Bloomington Stock Center que expresa GFP en un grupo particular de motoneuronas llamadas neuronas aCC, pCC y RP2.

2.2.- ESPECIFICIDAD dsRNAs EN EMBRIONES

Antes de analizar los efectos de las inyecciones sobre la navegación axonal, se analizó la eficacia de los dsRNA para disminuir la expresión de sus transcritos blanco a una misma concentración. Para analizar la eficacia del dsRNA-GFP se observaron los embriones inyectados sin fijar, vivos bajo microscopio de fluorescencia. En estas condiciones, y bajo el aceite halocarbonado, se observó la fluorescencia en un 79% de los embriones sin

inyectar (N=110) (Tabla 8), mientras que en los inyectados con 0,25 μ M de dsRNA de GFP la fluorescencia se observó en un 13% (N=116) (tabla 8). Se observó una fluorescencia parcial presente sólo en una zona del embrión, principalmente en la región anterior en un 28% de los embriones inyectados con dsRNA-GFP y en un 6% en los embriones sin inyectar.

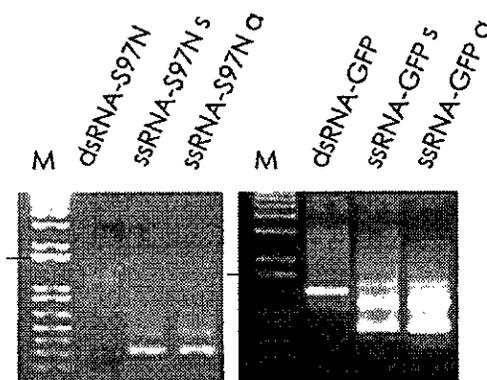


FIGURA 23: Obtención de dsRNA-S97N y dsRNA-GFP

Transcritos *in vitro* de S97N (ssRNA-S97N) y de GFP (ssRNA-GFP) con sentido (s) y antisentido (a) y los dsRNA respectivos que se obtienen. M es el marcador de peso molecular de DNA donde se indica la banda de 1,6 Kb.

TABLA 8: Especificidad inyecciones dsRNA

GFP	+	Parcial*	-	(B + C)	Total
	(A)	(B)	(C)		(A+B+C)
Sin inyectar	87 (79%)	7 (6%)	16 (15%)	23 (21%)	110 (100%)
dsRNA GFP (0,25 μ M)	15 (13%)	33 (28%)	68 (59%)	101 (87%)	116 (100%)

22C10	FAS	Total
dsRNA GFP (1 μ M)	21 (17%)	126 (100%)
dsRNA-S97N (1 μ M)	78 (51%)	153 (100%)

+ = Fluorescencia normal
 Parcial* = Fluorescencia parcial (no todo el embrión)
 - = Sin fluorescencia
 FAS = Fenotipo alterado del sistema nervioso

Con 0,25 μM de dsRNA-S97N disminuyó la expresión de DlgS97 en los embriones inyectados, ya que no se detectó inmunoreacción al anticuerpo dlg_{S97N} en inmunotinciones acopladas a peroxidasa (datos no mostrados).

Se comparó el porcentaje de embriones con alteraciones en la disposición regular de los axones revelado por el anticuerpo 22C10 en los embriones inyectados con 1 μM de dsRNA-GFP, con los inyectados con 1 μM de dsRNA-S97N (tabla 8). Se observaron alteraciones en un 51% de los embriones inyectados con dsRNA-S97N y en un 17% en los inyectados con dsRNA-GFP. Luego, se comparó la disposición de las neuronas aCC, pCC y RP2 en el cordón ventral de los embriones inyectados con solución de inyección con los embriones inyectados con 0,25 μM de dsRNA-S97N. Los embriones fueron fijados y teñidos con anticuerpo anti GFP y revelados con peroxidasa. En un 25% de los embriones inyectados con dsRNA-S97N se observó una alteración en dicha disposición, mientras que en los inyectados con tampón en sólo un 8%. No se observaron cambios en el número de neuronas.

2.3.- EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE dsRNA-S97N EN EMBRIONES

Inyectando 3 μM (1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de dsRNA-S97N se observan alteraciones fuertes en la expresión de 22C10 en aproximadamente un 80% de los embriones (figura 8), pero con una concentración de 0,25 μM sólo en un 20% y con características mucho más suaves, como se puede ver en la figura 24

donde sólo con un acercamiento a la zona indicada se aprecian los defectos en la migración axonal.

La figura 25A-C muestra inmunofluorescencias dobles de embriones con los anticuerpos dlg_{S97N} y el marcador de neuroblastos mitótico anti Miranda. Se observa que los neuroblastos con el cresciente basal de Miranda no expresan DlgS97 . Para descartar que DlgS97 pudiera estar participando o interfiriendo, aunque sea indirectamente, en las divisiones de los neuroblastos, se analizaron los crescentes basales de Miranda en neuroblastos mitóticos de embriones inyectados con $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de dsRNA-S97N . En todos los embriones observados por microscopía confocal se observó que tanto la orientación de la división celular, revelada por la posición de los cromosomas marcados con yoduro de propidio, como la posición subcelular asimétrica de Miranda, no se ven afectados por la inyección del dsRNA-S97N (figura 25).

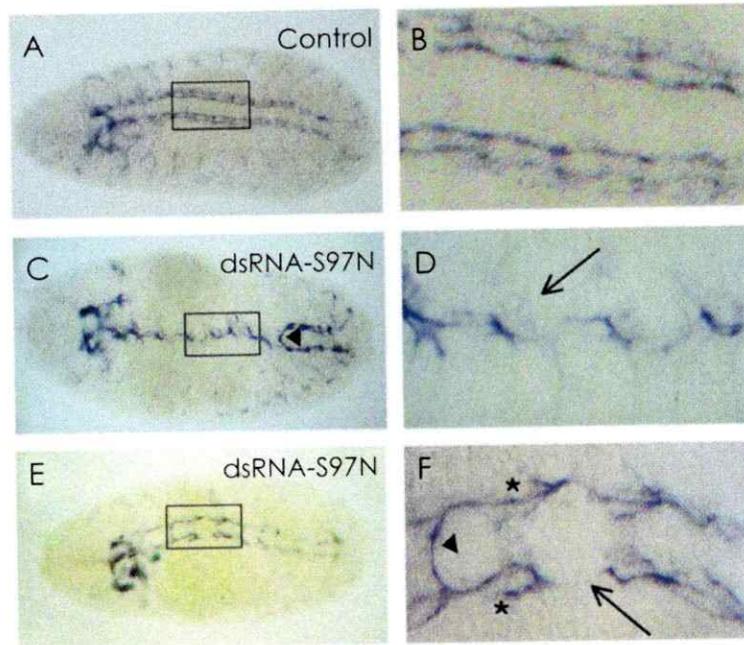


FIGURA 24: Defectos en la migración axonal producidos por la inyección de dsRNA-S97N

Inmunoreactividad a Fasciclina II en embriones de estadio 14-16 inyectados con **(A-B)** solución de inyección y **(C-F)** con dsRNA-S97N. Los paneles en (B), (D) y (F) corresponden a un acercamiento de las zonas enmarcadas en (A), (C) y (E) respectivamente. Las flechas indican sitios de menor inmunoreactividad con respecto a los controles, como los fascículos longitudinales MP1 y FN3. Las cabezas de flecha y asteriscos indican defectos en la migración axonal; las cabezas de flecha indican axones que cruzan la línea media en una manera inusual, y los asteriscos indican axones que salen del eje central del cordón ventral y se devuelven. Cerca del 20% de los embriones inyectados presenta este fenotipo (inyectados con solución de inyección N= 103, e inyectados con 0,25 μ M de dsRNA S97N N=98).

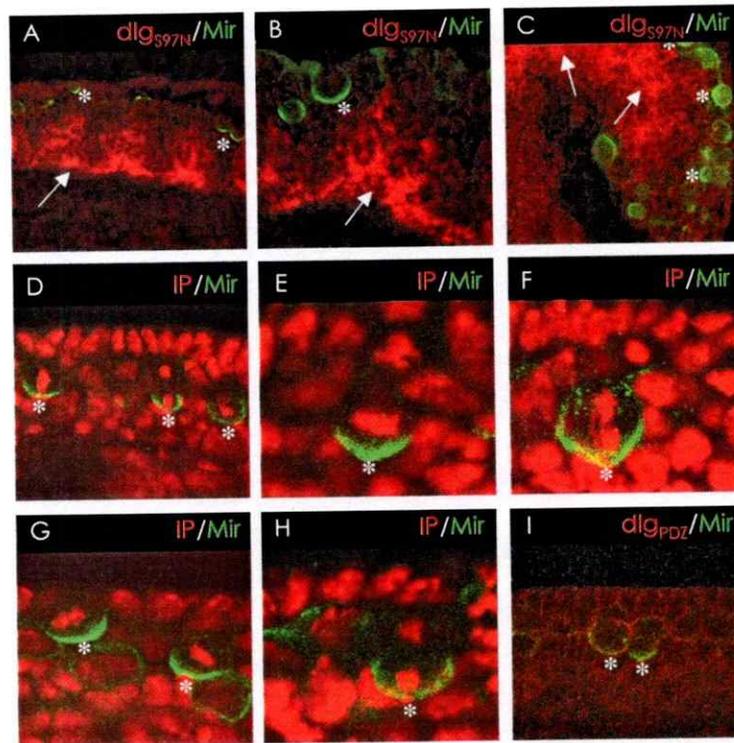


FIGURA 25: DlgS97 no se expresa en los neuroblastos embrionarios y la disminución de su expresión por inyección de dsRNA-S97N no afecta la ubicación basal de Miranda

(A-C) Embriones nativos de estadio 15, (D-F) embriones estadio 12-13 inyectados con solución tampón y (G-I) embriones estadio 12-14 inyectados con dsRNA-S97N, teñidos con Miranda en verde (A-I), dlg_{S97N} en rojo (A-C), yoduro de propidio (IP) en rojo (D-H) o dlg_{PDZ} en rojo (I). Los asteriscos indican crescentes basales de Miranda en los neuroblastos y las flechas en A-C indican la marca de dlg_{S97N} . Todas son vistas laterales de la región neurogénica ventral (con ventral ubicado hacia arriba) con excepción de © que corresponde a una vista ventral de cerebro.

3.- SOBREEXPRESIÓN DE DlgS97 EN NEURONAS EMBRIONARIAS

Para analizar los efectos de la ganancia de función de DlgS97 en neuronas embrionarias se cruzaron hembras vírgenes de la cepa UAS-EGFP-dlgS97 con machos de la cepa elav-Gal4. En la figura 26C se muestran embriones teñidos con los anticuerpos de Fasciclina II o 22C10 que sobreexpresan una copia de EGFP-DlgS97 en todas las neuronas. No se observó ninguna alteración en la formación de los tractos axonales del cordón ventral. Del mismo modo, tampoco se producen alteraciones en neuronas que sobreexpresan DlgA-EGFP (figura 26B). La cepa UAS-EGFP-S97N expresó EGFP enriquecido en los núcleos o somas neuronales y no en los lugares de su expresión endógena (figura 26D).

4.- OBTENCIÓN DE UNA MUTANTE NULA DE DlgS97

Con el objetivo de obtener una mutante nula de DlgS97 por movilización imprecisa de un elemento P que no afectara la expresión de DlgA, se buscaron inserciones de elementos P en el genoma de *Drosophila* en sitios cercanos al inicio de la traducción de dlgS97. Se buscó en Exelisis Collection (<http://drosophila.med.harvard.edu/>), GET DB o Gal4 Enhancer Trap Insertion Database (<http://flymap.lab.nig.ac.jp/~dclust/getdb.html>) y Bloomington

Drosophila Stock Center (<http://fly.bio.indiana.edu/>) encontrándose solo una línea que fue publicada a fines del año 2004, llamada *dlg*^{NP7225} (de GET DB).

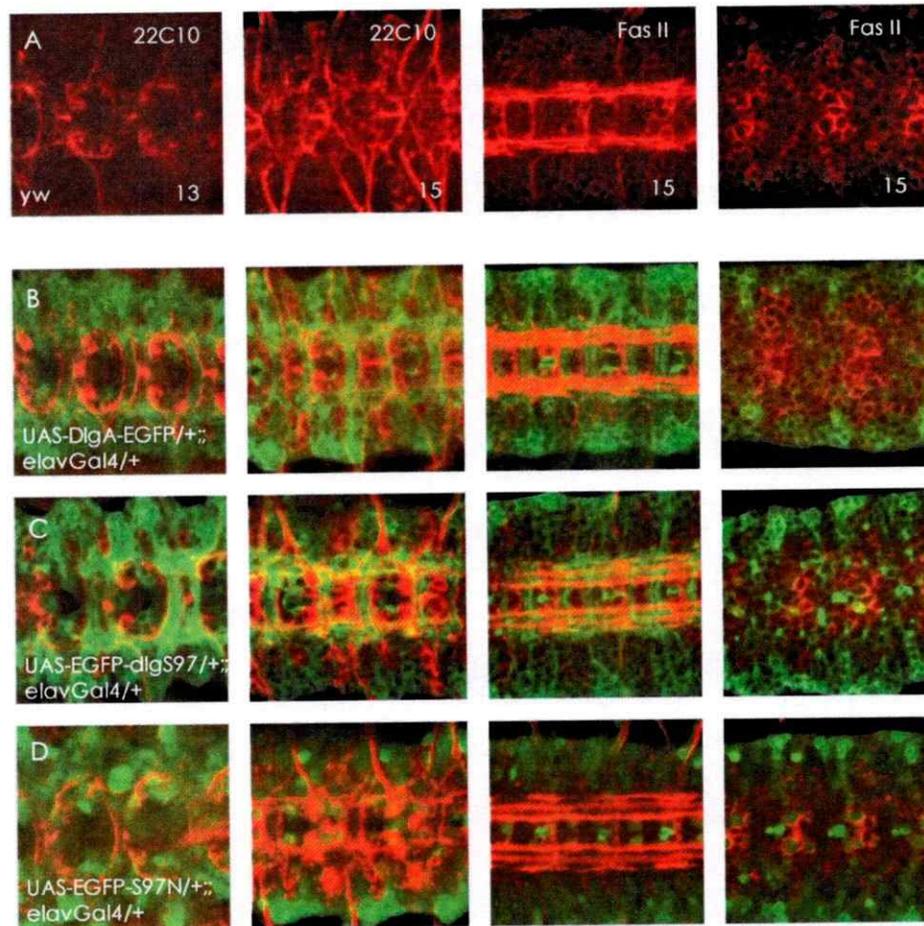


FIGURA 26: La sobreexpresión de DlgS97 o de DlgA no afecta la formación de los fascículos axonales

Fila (A) embriones nativos (yw) y filas (B-D) embriones de los genotipos indicados en la esquina inferior izquierda. Primeras dos columnas corresponden a tinciones con el anticuerpo 22C10 de embriones de estadio 13 y 15 respectivamente y las dos últimas columnas corresponden a una vista dorsal y otra ventral de embriones de estadio 15 marcados con el anticuerpo de Fasciclina II.

4.1.- CARACTERIZACIÓN CEPA *dlg*^{NP7225}

La inserción del elemento P de la cepa *dlg*^{NP7225} está aproximadamente 900 pb río arriba del exón 1 de *dlg*, en el primer intrón comprendido entre los exones A y 1. El tipo de elemento P insertado es GawB y por lo tanto si está insertado en una zona reguladora expresará Gal4. Para determinar si las moscas *dlg*^{NP7225} expresan Gal4 en un patrón particular se cruzaron hembras vírgenes de esta cepa con machos de genotipo UAS-Tau-GFP. No se observó ninguna marca de GFP específica aún a 29°C, temperatura a la cual aumenta la efectividad tanto de la expresión como de la actividad de Gal4 (datos no mostrados).

Se caracterizó a la cepa *dlg*^{NP7225} para determinar si la inserción del elemento causa algún defecto en la expresión de *dlg*. La figura 27 muestra que los embriones *dlg*^{NP7225} presentan una disminución de la expresión de DlgS97 detectada por Western blot de extractos embrionarios (figura 27A) y por inmunotinciones de embriones enteros (figura 27D y G). Al cargar una mayor cantidad de proteína en los Western blots es posible detectar DlgS97 en embriones tardíos (datos no mostrados), así como también revelando más tiempo la tinción con peroxidasa (figura 27E y H). En estadios larvales y de pupa (no mostrado) y de adulto (en Western blot de heterocigotos figura 28A y homocigotos figura 29) la expresión de DlgS97 en *dlg*^{NP7225} es normal.

Por lo tanto, la inserción del elemento P en la cepa *dlg*^{NP7225} no determina la expresión de Gal4, ni tampoco afecta la expresión de *dlg*S97 en

estadios de pupa y adulto, pero sí produce una disminución de la expresión de *dlgS97* durante el desarrollo embrionario.

4.2.- TRANSPOSICIÓN CEPA *dlg*^{NP7225}

Se diseñó una estrategia de cruzas para realizar la movilización del elemento P de *dlg*^{NP7225} con el objetivo de obtener deleciones genómicas que produjeran una mutante nula de *DlgS97*. La figura 10B esquematiza las cruzas realizadas para la transposición y en la sección de materiales y métodos se explican los criterios de selección para cada etapa.

4.3.- ANÁLISIS DE LAS LÍNEAS OBTENIDAS DE LA TRANSPOSICIÓN

Se seleccionaron 320 moscas vírgenes *w-*, las que se expandieron en viales individuales con dos machos *Y/FM7c-GFP*. De las 320, 29 resultaron ser homocigotas letales, por lo que no fue posible analizar a los machos mutantes (*NP*/Y*) ni las hembras mutantes homocigotas (*NP*/NP**). Para analizar si alguna de las 29 líneas homocigotas letales eran mutantes de *dlgS97*, se analizó por Western blot de extractos de cabezas de hembras adultas la complementación con el alelo *dlg*^{P1699}. Este alelo expresa *DlgS97* aunque en menor cantidad en estadios embrionarios y larvales, mientras que en adultos se comporta como nulo.

Para el análisis de complementación se cruzaron hembras vírgenes balanceadas de cada una de las líneas homocigotas letales (NP*/FM7c-GFP) con machos dlg^{P1699}/Y y se analizó por Western blot la expresión de DlgS97 en las hembras adultas dlg^{P1699}/NP^* obtenidas de esta cruce. El Western blot de la figura 28 (parte superior izquierda) muestra que tanto dlg^{NP0768} como dlg^{P1699} en heterocigosis sobre diferentes alelos expresan DlgS97, con excepción de dlg^{m52}/dlg^{P1699} , donde se observa muy poca cantidad de DlgS97. En la misma figura, el Western blot de la parte superior derecha muestra ejemplos de complementación entre dlg^{P1699} y algunas de las líneas homocigotas letales obtenidas de la transposición. Las 29 líneas expresaron DlgS97 en heterocigosis con dlg^{P1699} (banda sobre 116 KDa). Por lo tanto, ninguna de las líneas letales obtenidas de la movilización del elemento P de dlg^{NP7225} es mutante de DlgS97.

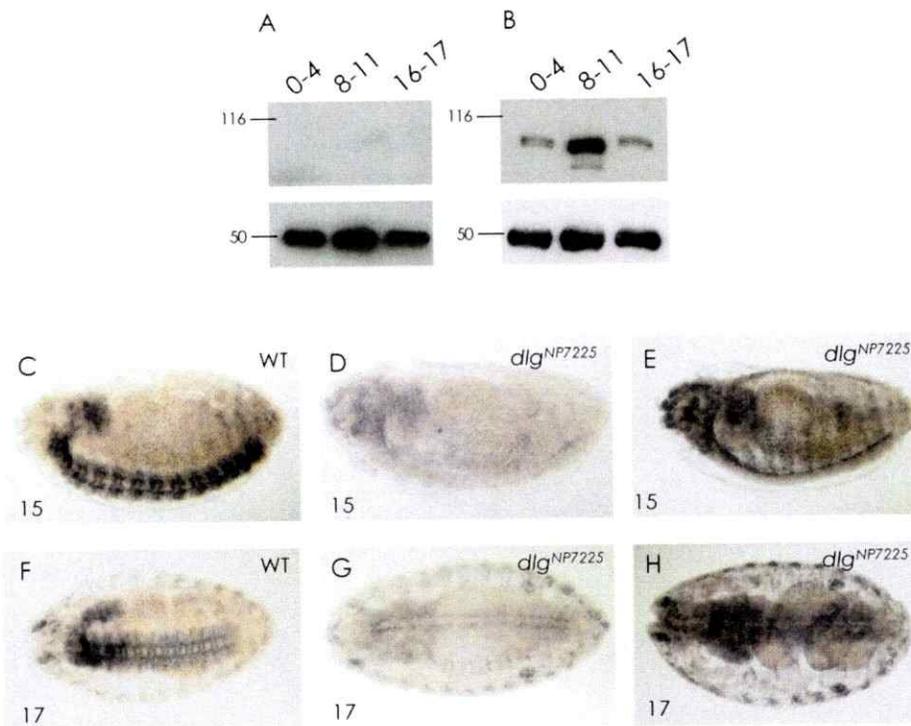


FIGURA 27: La línea *dlg^{NP7225}* presenta una menor expresión de DlgS97 durante el desarrollo embrionario

(A-B) Western blot con los anticuerpos *dlg_{S97N}* (A), *dlg_{PDZ}* (B) y tubulina (paneles inferiores en A y B) de extractos embrionarios de los estadios indicados en la parte superior de cada panel. (C-H) Inmunotinción de DlgS97 en embriones nativos (C y F) y en embriones de la cepa *dlg^{NP7225}* (D-E y G-H). (C-E) corresponde a vistas laterales de embriones de estadio 15 y (F-H) vistas ventrales de embriones de estadio 17. Los embriones (C), (D), (F) y (G) fueron revelados el mismo tiempo, y los embriones (E) y (H) fueron revelados mayor tiempo.

4.4.- CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE DlgS97 OBTENIDAS DE LA TRANSPOSICIÓN DE *dlg*^{NP7225}

Las otras 291 líneas establecidas de las cruza únicas todas fueron homocigotas viables y se establecieron expandiéndolas en homocigosis. Para determinar si alguna de ellas era mutante nula de DlgS97, se analizó la expresión de DlgS97 por Western blot de cabeza de adulto de los machos de cada línea. De todas ellas, sólo dos resultaron negativas para su tinción con el anticuerpo *dlg*_{S97N} las llamadas *dlg*^{exc5} y la *dlg*^{exc138} (figura 29).

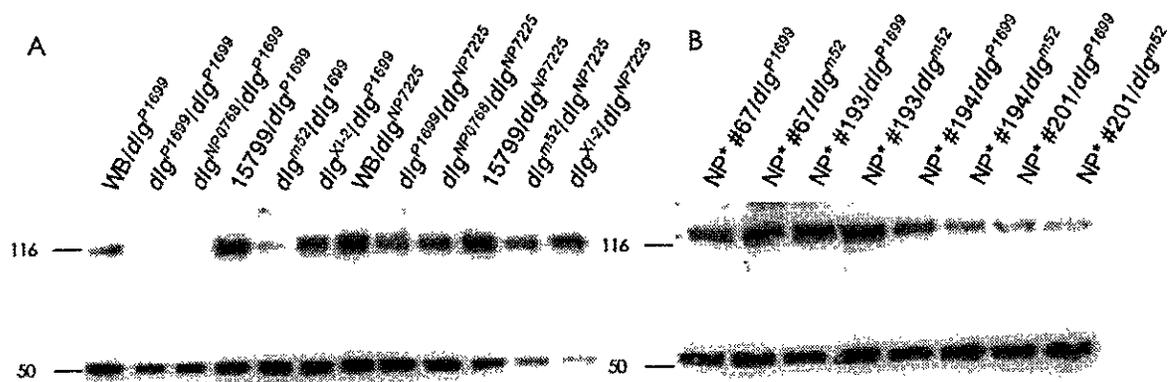


FIGURA 28: Las líneas homocigotas letales obtenidas de la transposición del elemento P en la línea *dlg*^{NP7225} expresan DlgS97

Western blots de extractos de cabezas de moscas adultas con los anticuerpos *dlg*_{S97N} (arriba) y tubulina (abajo). (A) En diferentes condiciones de heterocigosis se detecta DlgS97. (B) Algunas líneas homocigotas letales (NP* #67, #193, #194 y #201) obtenidas de la transposición heterocigotas para *dlg*^{P1699} y *dlg*^{m52} en las que se detecta DlgS97.

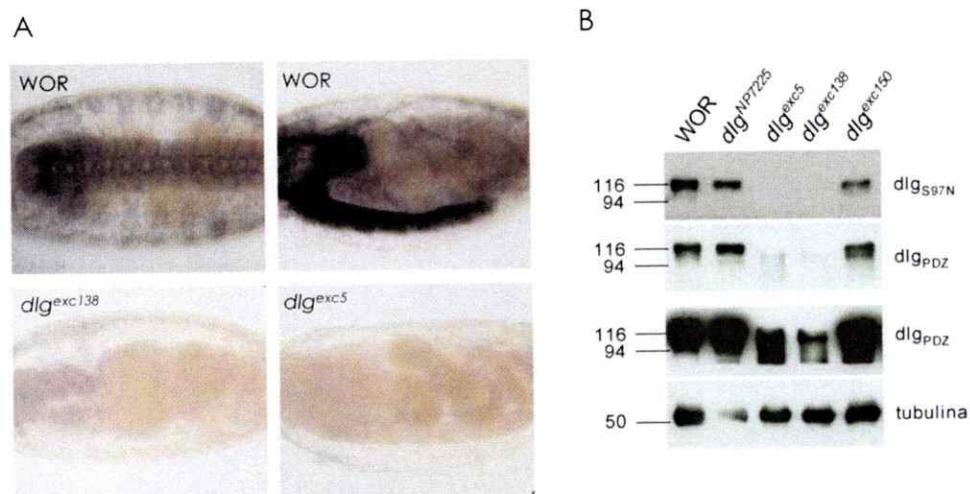


FIGURA 29: Los embriones mutantes *dlg^{exc138}* y *dlg^{exc5}* no expresan DlgS97

(A) Inmunohistoquímica de embriones con el anticuerpo dlg_{S97N} . En la esquina superior izquierda se señala el genotipo de cada embrión. (B) Western blot de extractos de cabezas de moscas adultas de los genotipos indicados en la parte superior de la figura con los anticuerpos indicados a la derecha de cada membrana. A mayores tiempos de exposición no se observó ninguna inmunoreactividad en *dlg^{exc5}* ni en *dlg^{exc138}* con el anticuerpo dlg_{S97N} (no mostrado) pero sí con dlg_{PDZ} . A la izquierda se indican los tamaños en KDa del estándar de peso molecular.

4.4.1.- Caracterización molecular mutantes DlgS97

Se realizó PCR sobre DNA genómico de los alelos *dlg^{exc5}* y la *dlg^{exc138}* con los siguientes pares de partidores: Tim8-for/E2-rev (*tim8* es el gen inmediatamente río arriba de *dlg*) y iA1-for3/E2-rev los que cubren regiones del DNA genómico de aproximadamente 7,4 Kb y 3,9 Kb respectivamente. Sólo se logró amplificar en el control (línea pseudonativa yw) el producto de 3,9 Kb. Sin embargo, utilizando las mismas parejas de partidores en la línea *dlg^{exc138}* se obtuvieron productos únicos de aproximadamente 5 Kb y 1,5 Kb respectivamente. Se secuenció completamente este último producto (partidores P1 y P2 de la figura 30) y se determinó que la mutante *dlg^{exc138}* posee una deleción de 3216 pb que cubre completamente al exón 1 parcialmente al exón 2 y que posee 859 pb del elemento P (que originalmente era de aproximadamente 11 Kb) correspondientes al extremo 5' de pGawB.

Para caracterizar molecularmente a la cepa *dlg^{exc5}* se realizaron PCRs de DNA genómico con diferentes parejas de partidores cubriendo desde el exón A hasta el exón 6. Las reacciones de PCR que utilizan partidores que cubren desde el exón 1 al 4 no amplifican ningún producto usando como templado DNA genómico de *dlg^{exc5}* pero sí usando DNA de cepas nativas. Se realizaron PCRs de DNA genómico de la cepa *dlg^{exc5}* con los siguientes pares de partidores: iA1-for2/E4-rev y iA1-for2/E5-rev, los que en el gen *dlg* nativo cubren regiones de DNA genómico de aproximadamente 13 y 14 Kb, respectivamente, amplificándose productos de aproximadamente 1,2 y 2 Kb, respectivamente.

Ambos productos fueron secuenciados y se determinó que la deleción genómica de la cepa *dlg^{exc5}* es de aproximadamente 12 Kb y comprende los exones 1, 2, 3 y parte del 4 (figura 30). Por lo tanto, en las mutantes *dlg^{exc138}* y en la *dlg^{exc5}* se pierde el inicio de la traducción de DlgS97. En *dlg^{exc138}* se pierde gran parte de la región que codifica para el dominio L27 (exones 1, 3 y parte del 4), mientras que en *dlg^{exc5}* se pierde prácticamente toda la región que codifica para el dominio L27.

Se realizó PCR de DNA genómico de algunas de las líneas homocigotas w- que resultaron con expresión de DlgS97 por el análisis de Western blot y se eligió a una de ellas, llamada *dlg^{exc150}* (Western blot figura 29). Se secuenció la región genómica correspondiente al sitio donde estaba anteriormente el elemento P y resultó ser una escisión precisa sin rastros del elemento P. Por lo tanto, esta cepa posee intacto el gen *dlg* y posee el mismo fondo genético que las mutantes *dlg^{exc138}* y *dlg^{exc5}* y puede ser usada como control en experimentos conductuales.

4.4.2.- Sistema nervioso embrionario en mutantes de DlgS97

La figura 31 muestra la ausencia completa de inmunoreactividad al anticuerpo *dlg_{S97N}* en el cordón ventral de embriones mutantes *dlg^{exc5}* y *dlg^{exc138}*, mientras que la inmunoreactividad a *dlg_{PDZ}* no se ve mayormente disminuida con respecto a embriones controles. El aspecto general del cordón tampoco se ve alterado. Para analizar con mayor detalle el sistema nervioso en

general se realizaron tinciones con diferentes marcadores del sistema nervioso; anticuerpos anti: BP102 (figura 32A-C), Elav y 22C10 (figura 32D-F) y Fasciclina II (figura 32G-J). No se encontró ninguna alteración en la disposición de axones ni somas neuronales.

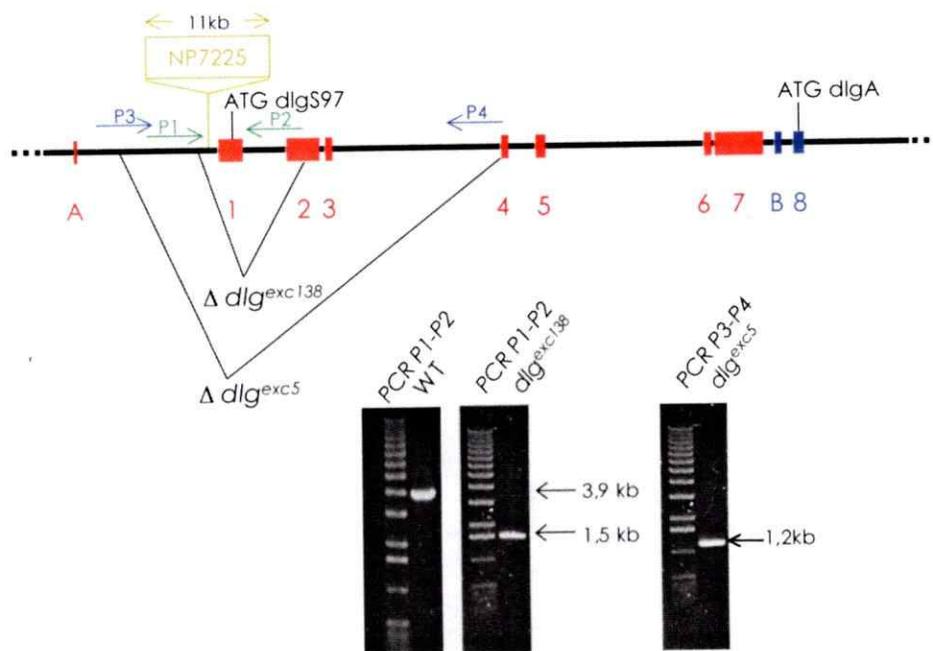


FIGURA 30: Mapeo de las mutaciones en el gen *dlg* de los alelos *dlg*^{exc138} y *dlg*^{exc5}

Arriba: Dibujo de la región genómica correspondiente al extremo 5' del gen *dlg*. Las cajas de color representan a los exones, en rojo se indican los exones que se expresan en DlgS97 y no en DlgA (representados en gris en la figura 6). Se señala el sitio de inserción del elemento P en *dlg*^{NP7225} y la región de reconocimiento de los partidores P1 y P2 (iA1-for-3/E2-rev) y P3-P4 (iA1-for2/E4-rev). Se indican los sitios de inicio de la traducción de las variantes *dlg*S97 y *dlg*A. **Abajo:** Productos de reacciones PCR de DNA genómico de cepa nativa (WT) y de los alelos *dlg*^{exc138} y *dlg*^{exc5} con los partidores indicados en la parte superior de cada gel. La secuenciación de estos últimos productos permitió realizar el mapeo de las mutaciones.

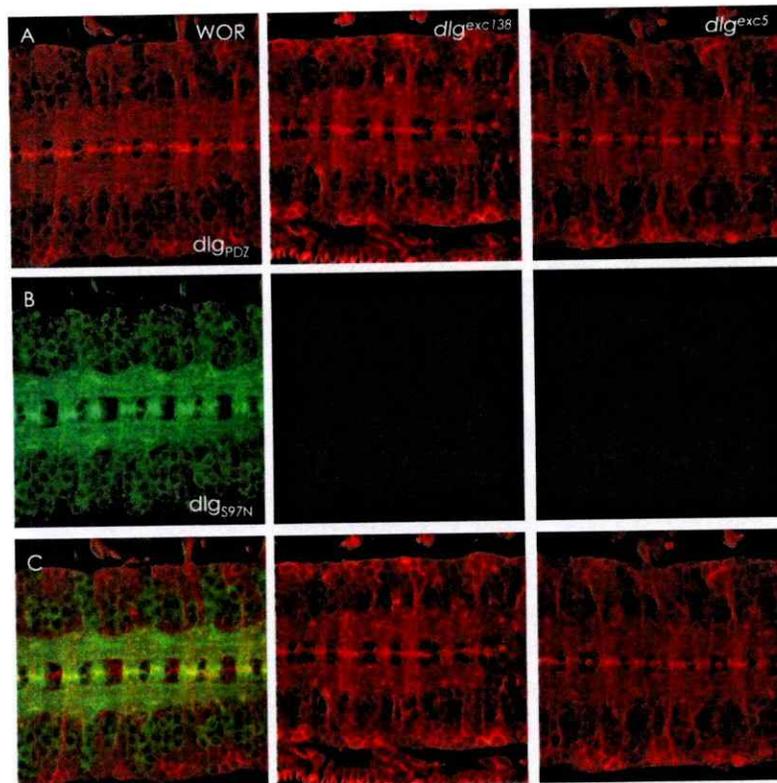


FIGURA 31: Inmunofluorescencia con los anticuerpos dlg_{S97N} y dlg_{PDZ} en embriones mutantes de DlgS97

Cortes ópticos de cordón ventral obtenidos por microscopía confocal de embriones enteros marcados con (A) dlg_{PDZ} (rojo), (B) dlg_{S97N} (verde) y (C) superposición de la imagen respectiva de (A) y (B). En éste y en todos los casos en los que se comparó la inmunofluorescencia entre diferentes individuos, la tinción se realizó en paralelo con la misma dilución de anticuerpo, y las condiciones de la microscopía fueron exactamente las mismas. Los genotipos de los embriones se indican en la esquina superior derecha.

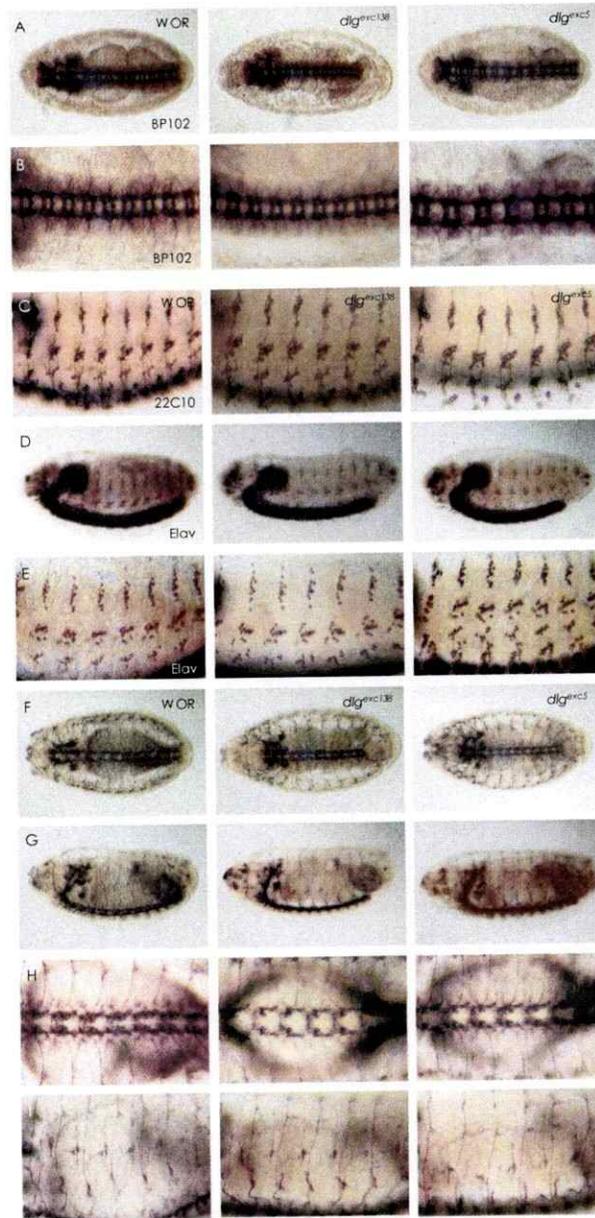


FIGURA 32: El sistema nervioso central y periférico de embriones mutantes dlg^{exc5} y dlg^{exc138} no presenta defectos en la migración axonal

Inmunotinción de embriones enteros vistos ventral (A, B, F y H) o lateralmente (C-E, G e I) marcados con los anticuerpos de BP102 (A-B), 22C10 (C), Elav (D-E) y Fasciclina II (F-I). (B), (E) e (I) corresponden a acercamientos de (A), (D) y (G) respectivamente. Arriba de cada columna se indica el genotipo. El estadio embrionario es el mismo para cada fila.

4.4.3.- Menor inmunoreactividad a Fasciclina II en cerebros de larvas *dlg^{exc138}* de 3^{er} estadio

La figura 33 muestra tinciones con los anticuerpos *dlg^{S97N}* y anti-Fasciclina II en cerebros de larvas de 3^{er} estadio. La expresión de Fasciclina II en disco de ojo y cerebro central es prácticamente la misma que en una cepa control, sin embargo es menor en el lóbulo cerebral (región indicada por la flecha roja).

4.4.4.- Ensayos conductuales de fototactismo en moscas adultas

Dada la fuerte expresión de *Dlg^{S97}* en todo el sistema visual de adultos y larvas (figura 33 y datos no mostrados) se realizó un experimento que permitiera analizar la conducta de las moscas mutantes de *dlg^{S97}* y que involucre la vía visual. Para ello se analizó la respuesta a la luz de moscas adultas de 1-6, 12 y 25-30 días de edad (figura 34A, B y C, respectivamente) según se explica en la sección 5 de materiales y métodos. El ensayo se basa en el fototactismo positivo natural que tienen las moscas adultas.

En la figura 34A gráfico de la izquierda vemos la respuesta a la luz de moscas machos de 1 a 6 días de edad menos de un 32% de las moscas *dlg^{exc150}* (N = 3) y *dlg^{NP7225}* (N = 3) permanecen en la oscuridad al minuto de dado el estímulo luminoso (*dlg^{exc150}* 29±7,5% y *dlg^{NP7225}* 32±8%). A los 5 minutos, el porcentaje de moscas en oscuridad baja a menos del 20% (*dlg^{exc150}* 19±4% y *dlg^{NP7225}* 16±2,3%). En el caso de las mutantes, al minuto cerca de un

70% de las moscas mutantes dlg^{exc138} (N = 3) aún permanece en la oscuridad ($69 \pm 3,5\%$, $P < 0,005$ con respecto a la cepa dlg^{exc150} y $P < 0,05$ con respecto a dlg^{NP7225}). A los 5 minutos, todavía el $55 \pm 4,6\%$ de las moscas dlg^{exc138} queda en oscuridad ($P < 0,05$ con respecto a dlg^{exc150} y a dlg^{NP7225}) (figura 34A). En el caso de la mutante dlg^{exc5} (N = 3), el porcentaje de moscas que permanece en oscuridad al minuto ($69 \pm 6\%$) también es significativamente diferente a los de las cepas dlg^{exc150} y dlg^{NP7225} ($P < 0,05$ en ambos); sin embargo no lo es a los 5 minutos ($42 \pm 18\%$) en comparación con cualquiera de las otras cepas.

Se utilizó la cepa INAD que es una mutante ciega para comparar su respuesta con la de las moscas dlg^{exc138} y dlg^{exc5} . La respuesta de las moscas INAD de 1-6 días de edad ($83 \pm 3,5\%$ al minuto y $76 \pm 5,7\%$ a los 5 minutos, N = 3) no fue significativamente diferente a la respuesta de las moscas dlg^{exc138} y dlg^{exc5} de la misma edad a los 5 minutos, pero sí lo fue al minuto ($P < 0,05$ para ambas mutantes) y con respecto a dlg^{exc150} ($P < 0,005$ para 1 y 5 minutos) (figura 38A).

En moscas de 25-30 días de edad (figura 34C gráfico de la izquierda) se observó que a los 5 minutos quedaron en la oscuridad el $83 \pm 2,9\%$ (N = 6) y el $77 \pm 4,2\%$ (N = 6) de las moscas dlg^{exc138} y dlg^{exc5} respectivamente, mientras que para las moscas dlg^{exc150} quedaron el $52 \pm 12,4\%$ (N = 3). La diferencia en el porcentaje de moscas de 25-30 días que permanece en oscuridad al minuto y a los 5 minutos entre las moscas mutantes y dlg^{exc150} no fue significativa, probablemente debido a el gran error estándar medio obtenido para dlg^{exc150} .

Sin embargo, el porcentaje de moscas de 25-30 días que permaneció en oscuridad de la cepa *dlg*^{NP7225} ($58 \pm 5,7\%$ al minuto 1 y $43 \pm 7,3\%$ al minuto 5) es significativamente diferente al de las moscas *dlg*^{exc138} ($P < 0,005$ para el minuto 1 y para el minuto 5) y también es significativamente diferente al de las moscas *dlg*^{exc5} ($P < 0,005$ para el minuto 1 y para el minuto 5).

Por lo tanto, las moscas jóvenes mutantes de *dlg*S97 se comportan significativamente diferente que moscas de la misma edad y que poseen el mismo fondo genético, pero con el gen *dlg* intacto (*dlg*^{exc150}) al primer minuto de dado el estímulo luminoso. La respuesta diferente se traduce en un mayor porcentaje de moscas que permanece en la oscuridad, es decir se mueve un menor porcentaje de moscas hacia la luz. Por otro lado, las moscas mutantes de *dlg*S97 se comportan como las mutantes ciegas INAD.

Para poder analizar si el fenotipo observado en los experimentos de fototactismo se debe a la ausencia de *Dlg*S97, se realizaron experimentos de rescate del fenotipo. Para ello, se construyeron cepas con la mutación y la guía *elav-Gal4* (expresión de *Gal4* en neuronas) en el mismo genoma, para luego cruzar esas hembras *dlg*^{exc138}-*elavGal4* o *dlg*^{exc5}-*elavGal4* con machos *UAS-EGFPdlgS97* o *UAS-dlgAEGFP* según corresponda (ver sección de materiales y métodos). La búsqueda de las recombinantes meióticas se hizo por Western blot con el anticuerpo *dlg*_{S97N} (ver cruces en figura 12) de extractos de cabezas de adultos. La figura 35 muestra el resultado de esta búsqueda para las recombinantes con *dlg*^{exc138}, donde se ve que de las 29 líneas analizadas 4

resultaron recombinantes (ojos rojos dados por el gen *w* presente en PGal4 y pérdida de inmunoreactividad a *dlg*_{S97N}). Para los siguientes experimentos se utilizó la cepa correspondiente al carril #9 de la figura 35 (llamada *dlg*^{exc138}-elavGal4). Del mismo modo se obtuvieron 5 recombinantes de *dlg*^{exc5}-elavGal4 (no mostrado). La figura 36 muestra que la línea *dlg*^{exc138}-elavGal4 seleccionada es nula para DlgS97 y que permite su expresión cuando se la cruza con la cepa UAS-EGFP-*dlg*S97, así como también permite expresar UAS-*dlg*AEGFP (no mostrado). Lo mismo se observó con *dlg*^{exc5}-elavGal4 (no mostrado).

Al comparar la respuesta de moscas de 1 a 6 días de edad de la cepa mutante *dlg*^{exc138} con expresión de DlgS97 en neuronas (*dlg*^{exc138}-elavGal4; UAS-EGFP-*dlg*S97) se observó que permanecieron en una menor proporción en la oscuridad al minuto y a los 5 minutos (18±3,5% al min 1 y 17±4,6% al min 5, N = 3) que moscas de la cepa mutante *dlg*^{exc138}-elavGal4 (90±5,5% al min 1 y 84±3,8% al min 5, N = 3) (P<0,001 al min 1 y al min 5). Por otra parte, el porcentaje de moscas de 1 a 6 días de edad mutantes *dlg*^{exc138} con expresión de DlgA neuronal (*dlg*^{exc138}-elavGal4; UAS-*dlg*AEGFP) que permaneció en la oscuridad no fue significativamente diferente al de las moscas *dlg*^{exc138}-elavGal4 al primer minuto pero sí al minuto 5 (P<0,01).

Al comparar la respuesta de las moscas mutantes recombinantes de 1 a 6 días de edad y de 12 días (*dlg*^{exc138}-elavGal4 y *dlg*^{exc5}-elavGal4) con INAD, se determinó que no fueron significativamente diferentes (ambas mutantes, de las

dos edades y al minuto 1 y al minuto 5), con excepción de *dlg^{exc138}* al minuto 1 ($P < 0,05$).

Los experimentos de rescate en moscas de 12 días indican que la respuesta de *dlg^{exc138}-elavGal4; UAS-EGFPdlgS97* ($44 \pm 10,2\%$ al min 1 y $33 \pm 9,3\%$ al min 5, $N = 4$) fue significativamente diferente a la de *dlg^{exc138}-elavGal4* ($93 \pm 2,6\%$ al min 1 y $75 \pm 10,5\%$ al min 5, $N = 3$) tanto al primero como al quinto minuto ($P < 0,05$ al min 1 y al min 5). Del mismo modo, el porcentaje de moscas de 12 días que permanece en la oscuridad del genotipo *dlg^{exc5}-elavGal4 ; UAS-EGFPdlgS97* ($44 \pm 1,5\%$ al minuto 1 y $31 \pm 6,3\%$ al minuto 5) es significativamente diferente al de las moscas *dlg^{exc5}-elavGal4* ($85 \pm 9,5\%$, $N = 4$, $P < 0,05$ a ambos tiempos). Luego se analizó el rescate en moscas *dlg^{exc138}-elavGal4* de 25 a 30 días de edad y se determinó que la respuesta de *dlg^{exc138}-elavGal4; UAS-EGFPdlgS97* ($66 \pm 12,9\%$ al min 1 y $44 \pm 10,4\%$ al min 5, $N = 3$) fue significativamente diferente a la de *dlg^{exc138}-elavGal4* ($82 \pm 7,1$, $N = 4$) al minuto 5 ($P < 0,05$), pero no al minuto 1. Al comparar los efectos del rescate con DlgA en vez de con DlgS97 se determinó que las respuestas de *dlg^{exc138}-elavGal4; UAS-dlgAEGFP* ($84 \pm 2\%$ al min 1 y $41 \pm 5,8\%$ al min 5, $N = 3$) y *dlg^{exc5}-elavGal4; UAS-dlgAEGFP* ($72 \pm 6,2\%$ al min 1 y $28 \pm 1,7$ al min 5, $N = 3$) no fueron significativamente diferentes a las de *dlg^{exc138}-elavGal4* y *dlg^{exc5}-elavGal4* respectivamente al primer minuto, pero sí al minuto 5 ($P < 0,05$ en ambos casos).

Aunque no se estudiaron todos los genotipos para todos los intervalos de edades, los resultados anteriormente detallados muestran que la expresión de

EGFP-DlgS97 en las neuronas de las moscas mutantes de *dlgS97* rescató el fenotipo mutante en moscas de 1 a 6 días de edad, 12 días y 25 a 30 días de edad, al minuto 1 y al minuto 5, con la única excepción de *dlg^{exc138}-elavGal4*; UAS-EGFP*dlgS97*, que no rescató a *dlg^{exc138}-elavGal4* al minuto 1. Además la expresión de DlgA-EGFP en las mutantes no rescató el fenotipo mutante al primer minuto, pero sí al minuto 5 para todas las edades estudiadas.

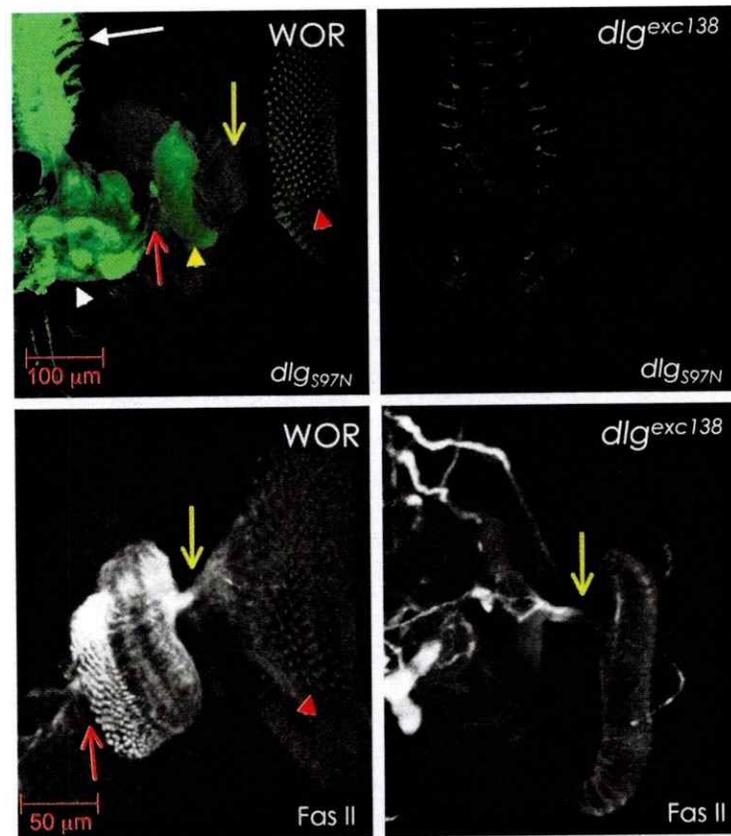


FIGURA 33: Menor inmunoreactividad a Fasciclina II en lóbulo cerebral de mutantes *dlg^{exc138}*

Apilamiento de cortes ópticos obtenidos por microscopía confocal de sistema nervioso central disectado de larvas de 3^{er} estadio, teñidos con los anticuerpos de *dlg^{S97N}* (arriba) y Fasciclina II (abajo) en una cepa control (izquierda) y en *dlg^{exc138}* (derecha). Los paneles inferiores corresponden a acercamientos a una región del lóbulo cerebral (entre flechas amarilla y roja). La flecha blanca indica el ganglio ventral, la cabeza de flecha roja señala el disco imaginal de ojo, la cabeza de flecha blanca el cerebro central. La flecha amarilla señala la primera sinapsis de los axones provenientes del disco de ojo que van hacia el lóbulo óptico y la flecha roja los axones provenientes de la lámina que sinaptan en la médula del lóbulo óptico. Notar la menor cantidad de axones marcados con Fasciclina II en el lóbulo cerebral.

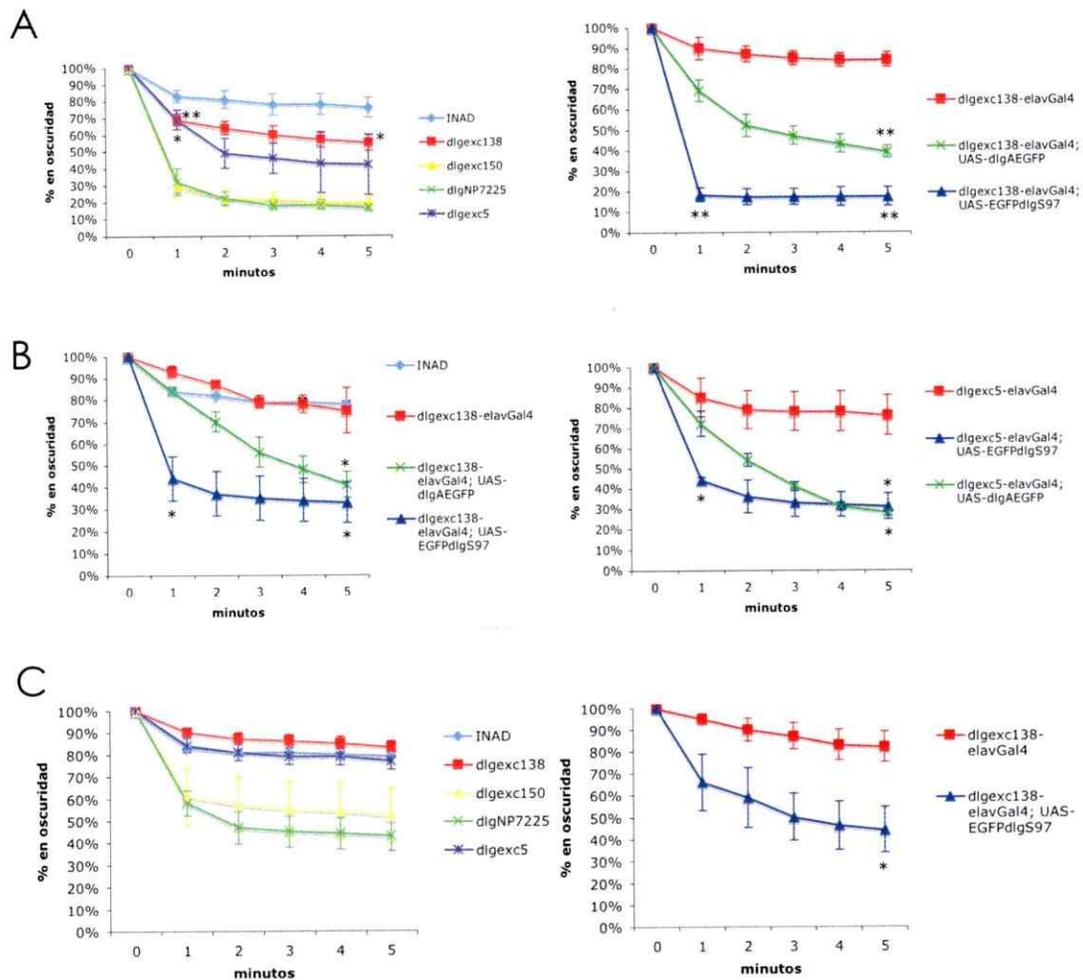


FIGURA 34: Alteraciones en la respuesta de fototactismo en las mutantes *dlgexc138* y *dlgexc5* y el rescate al primer minuto con la expresión neuronal de DlgS97 pero no con DlgA

Porcentaje de moscas que permanece en la oscuridad con respecto al número inicial de ellas para cada intervalo de tiempo. **(A)** Moscas de 1 a 6 días de edad, **(B)** 12 días y **(C)** de 25-30 días. ** = $P < 0,005$ y * = $P < 0,05$ al comparar las cepas mutantes con las cepas control con el fondo genético correspondiente al minuto indicado. Todos los valores corresponden al promedio de los puntos en ese minuto para ese genotipo \pm el error estándar medio o SEM y la significancia se calculó utilizando el ensayo de t-student de dos colas. Ver texto para detalles.

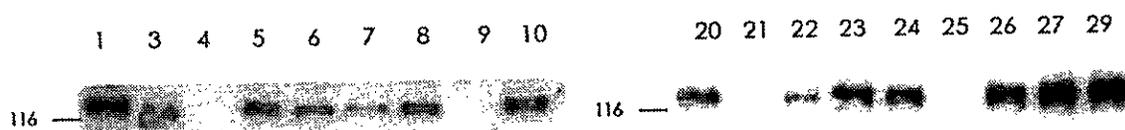


FIGURA 35: Obtención de recombinantes *dlg^{exc138}-elavGal4*

Western blot con el anticuerpo *dlg_{S97N}* de extractos de cabezas de adultos de las 29 líneas únicas obtenidas en la cruce E) de la figura 12 (ver sección de materiales y métodos). Cuatro líneas resultaron ser recombinantes (carriles 4, 9, 21 y 25).

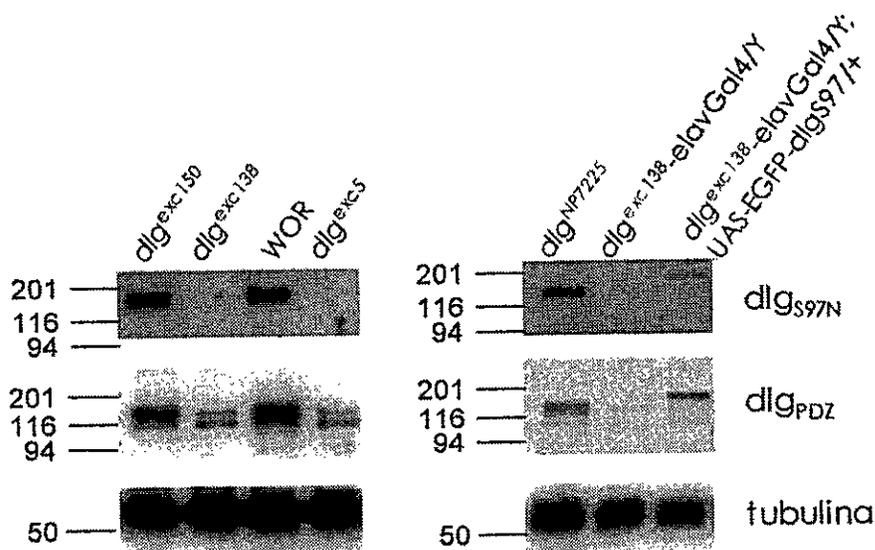


FIGURA 36: *dlg^{exc138}-elavGal4/Y* es mutante de *DlgS97* y permite la expresión de *DlgS97* en neuronas

Western blot de extractos de cabeza de mosca adulta de los genotipos indicados en la parte superior de cada carril. A la derecha se indican los anticuerpos utilizados y a la izquierda de cada membrana se señalan los tamaños del estándar de peso molecular en KDa. Nótese que la banda de *DlgS97* visualizada con el anticuerpo *dlg_{S97N}* (bajo 201 KDa) en *dlg^{exc138}-elavGal4/Y*; *UAS-EGFP-dlg^{S97}* es de un tamaño mayor a la endógena (sobre 116 KDa) debido a la presencia de EGFP.

DISCUSIÓN

En esta tesis se describen los patrones de expresión temporal y espacial del transcrito y de la proteína DlgS97 durante el desarrollo embrionario y se los compara con los de DlgA. Estas comparaciones nos permiten concluir que ambas variantes de procesamiento se regulan de manera diferente durante el desarrollo embrionario; DlgA está presente durante todo el desarrollo y se expresa principalmente en tejido epitelial y en neuronas, mientras que DlgS97 es de expresión cigótica y principalmente neuronal. Además en esta tesis se generaron y caracterizaron dos mutantes nulas de DlgS97 que son el material de partida para mayores análisis de la función del dominio L27 de las proteínas MAGUKs en neuronas. La viabilidad y la formación aparentemente normal del sistema nervioso de las mutantes indican que DlgS97 no es necesario para el desarrollo del individuo hasta la edad adulta ni para el desarrollo correcto del sistema nervioso embrionario. Por lo tanto DlgS97 no es esencial para la neurotransmisión básica ni tampoco lo es para la guía axonal, como se supuso en un primer momento debido a los experimentos de RNAi. En ensayos

conductuales de fototactismo las mutantes adultas de DlgS97 presentaron una respuesta significativamente diferente con respecto a moscas de su mismo fondo genético, pero con DlgS97 intacto, conducta que se rescató con la expresión de DlgS97 en neuronas. Estos estudios miden la respuesta locomotora frente a un estímulo luminoso, pero no se estudió si la respuesta defectuosa fue consecuencia de alteraciones en la fototransducción, locomoción básica o coordinación motora.

1.- REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *dlg*

Los resultados de los RT-PCRs (figura 15), hibridaciones *in situ* (figura 17), Western blots (figura 18) e inmunotinciones (figura 19) de embriones por estadios nos indican que el transcrito de *dlgS97* se expresa desde estadio 10 y la proteína desde estadio 12, mientras que el transcrito y la proteína *dlgA* se detectaron durante todo el desarrollo embrionario. Por lo tanto *dlgA* posee un fuerte componente materno como ya se ha descrito (Perrimon 1988), mientras que *dlgS97* es sintetizado completamente *de novo* por el embrión.

Se sabe que el gen *dlg* se expresa en el epitelio folicular y es necesario para bloquear la invasión celular durante la oogénesis (Bilder y col. 2000, Goode y Perrimon 1997). Lo más probable es que sea la variante *DlgA* la que se exprese en los óvulos y sea la necesaria para la oogénesis. La expresión de *DlgA* durante todo el desarrollo embrionario -inclusive previo al inicio de la transcripción cigótica- y la expresión de la proteína *DlgS97* desde estadio 12 en

adelante en neuronas maduras y no en sus precursores, indica lo diferentes que han de ser los mecanismos que controlan y regulan la expresión del gen *dlg*. A través de estudios genéticos de complementación con diferentes alelos de *dlg* ya se había sugerido previamente la gran complejidad del locus *dlg* (Perrimon 1988, Woods y col. 1996). Los estudios de inmunoreactividad al anticuerpo *dlg*_{PDZ} en el cordón ventral de embriones en las mutantes de *dlg*S97 obtenidas en esta tesis muestran que la inmunoreactividad al anticuerpo es aparentemente normal y los tractos axonales marcados son también aparentemente los mismos que en embriones nativos (figura 32). Esto demuestra que *Dlg*S97 se está coexpresando con *Dlg*A en todas las neuronas del cordón ventral embrionario. Sin embargo el tipo de regulación que se ejerce sobre el gen *dlg* para regular la expresión de los diferentes transcritos es diferente según sea la etapa del desarrollo el individuo, ya que en Western blots de extractos de cabeza de moscas adultas mutantes de *dlg*S97 la inmunoreactividad al anticuerpo *dlg*_{PDZ} está notoriamente disminuida con respecto a extractos de moscas nativas (figura 30B). Por lo tanto, en adultos puede que no todas las neuronas coexpresen ambas isoformas o que la expresión de *Dlg*A sea muy baja en todas ellas. Esto sólo se podrá corroborar una vez que se realicen tinciones con el anticuerpo de *dlg*_{PDZ} en cortes de cerebro de adultos nativos y mutantes de *dlg*S97.

En flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>) y en Mendoza y col. (2003) se han descrito la existencia de otros transcritos de *dlg* (figura 5) que pueden ser

clasificados en tres grupos. Uno de estos grupos es del "tipo dlgS97", que se caracterizan por codificar variantes que poseen dominio L27 (como las variantes dlg1-RC, -RI, -RJ, -RB, -RH y -RF en flybase) y los demás dominios de interacción proteína-proteína (PDZs, SH3 y GUK). El segundo tipo de transcritos son del "tipo dlgA", es decir, codifican para proteínas que poseen dominios PDZs, SH3 y GUK, pero no poseen dominio L27 (como las variantes dlg1-RA, -RE y -RG). Por último, el tercer grupo de transcritos codifican sólo para el dominio L27, poseen exón 7 y un 3' no traducido. Tanto los transcritos del primer como del segundo grupo difieren entre sí por el uso alternativo del exón 5 y/o de exones en la región ubicada entre los dominios SH3 y GUK (región HOOK). Estos sitios de corte y empalme -o de "splicing" alternativo- son los mismos que en las proteínas "tipo Dlg" de vertebrados. Inclusive en el caso de SAP97 se ha descrito que dos variantes de procesamiento alternativo que se expresan en neuronas y que difieren sólo en un par de exones correspondientes a la región HOOK cumplen funciones sinápticas diferentes (Rumbaugh y col. 2003). Si analizamos los resultados de los RT-PCRs y se consideran los tamaños de los otros productos obtenidos que no corresponden a los esperados para dlgA o para dlgS97, vemos que es probable la ocurrencia del uso alternativo del exón 5 y del exón 12. Por ejemplo con los partidores ATG-S97N y PDZ1-rev se amplifican dos bandas que podrían corresponder a los fragmentos entre los dominios L27 y PDZ1 de las variantes dlgS97 y dlg1-RB respectivamente que difieren sólo en el exón 5 (180 pb). Con los partidores

ATG-S97N/GUK-rev y ATG-S97N/PDZ3-rev no se distingue tan claramente una segunda banda que pudiera corresponder al uso alternativo del exón 5.

Los anticuerpos disponibles para Dlg son tres; uno que reconoce al dominio L27 (dlg_{S97N}), otro que reconoce al segundo PDZ (dlg_{PDZ}) y un tercero que reconoce al dominio GUK, por lo tanto ninguno es específico para DlgA. El exón 12 sólo está descrito para variantes "tipo dlgA" y podría ser un candidato para realizar un anticuerpo específico para DlgA. El otro exón que sólo ha sido descrito para dlgA es el exón 8 que es la región que se utilizó para la preparación de la sonda E8 en las hibridaciones *in situ*. Sin embargo lo que se traduce de este exón son sólo los últimos 87 pb, por lo tanto podría ser más útil como sitio de reconocimiento para un anticuerpo monoclonal específico de DlgA. Se obtuvieron productos de las reacciones de RT-PCR de embriones con partidores específicos para dlgS97 y el exón 12. Basándose sólo en el tamaño aproximado de esos productos se puede suponer que corresponden a fragmentos de un transcrito "tipo dlgS97" pero con exón 12. Si existiesen variantes tipo dlgA y tipo dlgS97 ambas con exón 12, los productos de RT-PCR no ser diferenciarían en geles de agarosa con la pareja de partidores E12-for/GUK-rev utilizada. Esto ya que en esa región sólo se diferencian por la región HOOK (entre SH3 y GK); en dlgA están los exones 16 y 17 (178 pb) y en dlgS97 los exones 16, 18 y 19 (229 pb), lo que hace una diferencia de solo 51 pb. Por otro lado también basándose sólo en los tamaños de los productos obtenidos de menor tamaño molecular que los correspondientes a dlgA, se

puede suponer la existencia de transcritos "tipo dlG_A" pero sin exón 12. Por lo tanto, es probable que el exón 12 no sea un buen candidato para reconocer en forma específica a Dlg_A o a variantes de su tipo.

Las variantes que codifican sólo para el dominio L27 y que poseen exón 7 también se expresan como las variantes "tipo dlG_{S97}" en el sistema nervioso embrionario y no antes de estadio 10 (figura 16G-I). Al menos por hibridación *in situ* no fue posible determinar si existe alguna diferencia entre el patrón de expresión de ellas. El hecho de que aparentemente todos los axones del cordón ventral presentan inmunoreactividad a los anticuerpos dlG_{S97N} y dlG_{PDZ} no quiere decir que no haya expresión de proteínas que sólo posean L27, ya que puede ser que se estén expresando en una misma neurona que exprese Dlg_A, como de hecho ocurre fuertemente en embriones. No fue posible analizar los transcritos con exón 7 por RT-PCRs ya que se probaron cuatro partidores en esa región y ninguno se unió eficientemente al cDNA, inclusive las bandas amplificadas en el control positivo con el DNA plasmidial del EST de LD33841 fueron muy débiles (datos no mostrados). Esto puede deberse a que en la región 3' no traducida codificada por el exón 7 hay una gran cantidad de secuencias repetidas que probablemente impiden la correcta elongación de la DNA polimerasa.

Desconocemos si los transcritos con exón 7 expresan las respectivas proteínas, así como también desconocemos dónde se expresan subcelularmente y si se expresan en estadios posteriores al embrionario y su

significado funcional. Ya que estas variantes codifican para un único dominio de interacción proteína-proteína, que es un dominio L27, las proteínas de este tipo podrían actuar como dominantes negativos frente a DlgS97 al formarse complejos heterotetraméricos entre los dominios L27 de la variante con exón 7 y los dominios L27 de la proteína con la que estuviera interactuando normalmente DlgS97 en neuronas, como podría ser la proteína Caki u otra. Si esto ocurriera significaría que la regulación de la expresión de las variantes con exón 7 podría determinar el secuestro de las proteínas que se unen al dominio L27 de DlgS97, y así regular indirectamente la disponibilidad de DlgS97 a las proteínas con las que interactúa a través de sus otros dominios de interacción-proteína-proteína. A través del uso de moscas transgénicas que permitan la sobreexpresión del dominio L27 en la región subcelular donde normalmente se expresa DlgS97 en las neuronas, sería posible analizar si las variantes como la codificada por el EST LD33841 actúan como un dominante negativo de DlgS97. Sin embargo, esto no fue posible de analizar ya que cuando se realizó la sobreexpresión del dominio L27 (EGFP-S97N) en neuronas embrionarias, éste se localizó en los núcleos de las neuronas y no en los axones (embriones UAS-EGFP-S97N;;elavGal4). Una posibilidad que permitiría explicar esta localización nuclear, puede ser el pequeño tamaño molecular de la proteína llamada S97N (15 KDa aproximadamente) y EGFP, de modo que la proteína de fusión EGFP-S97N es arrastrada al núcleo por EGFP. Sin embargo, esto parece no ser el motivo, ya que ocurrió lo mismo con moscas transgénicas con expresan una proteína de fusión entre un epítopo mas pequeño (tres secuencias myc) y la

región S97N bajo la secuencia UAS (no mostrado). Otra explicación de la localización nuclear de la sobreexpresión del dominio L27 es que sea necesaria alguna secuencia de localización para su ubicación en membrana. Con respecto a esto se sabe que la proteína SAP97 de vertebrados necesita de la región llamada I3 y de los dominios PDZ1 y 2 para su localización en membrana (Lue y col. 1996, Hamada y col.2003). En *Drosophila*, también estas regiones son necesarias para la localización de Dlg en membrana (Hough y col. 1997). Tanto la proteína DlgS97 como la proteína DlgA de *Drosophila* poseen dominios PDZs 1 y 2 y la región que es la homóloga a la región I3 (codificada por el exón 16 de la región HOOK), por lo tanto es posible que el dominio L27 expresado solo no pueda ser retenido en la membrana y se localice nuclearmente, con lo que no podría actuar como un dominante negativo de la proteína DlgS97 expresada en los axones. Con respecto a las funciones nucleares que podría tener *dlg*, en McLaughlin y col. (2002) donde los autores describen la localización nuclear sólo de variantes de hDlg con inserto I2 y sugieren que hDlg podría tener diferentes funciones dependiendo del ciclo celular y que las variantes nucleares podrían agrupar complejos proteicos en la matriz nuclear.

En ensayos de Western blot con el anticuerpo *dlg*_{S97N} se detectaron bandas débiles de menor peso molecular a la principal de aproximadamente 116 KDa en extractos embrionarios pero no en extractos de cabeza de adultos (no mostrado). Esas bandas de aproximadamente 50 KDa que no son reconocidas con el anticuerpo *dlg*_{PDZ} pueden corresponder al producto de las

variantes de dlg con exón 7, aunque su peso molecular aparente excede en 20 KDa el calculado por su secuencia. No podemos por lo tanto, descartar la posibilidad de que sólo correspondan a productos de degradación de DlgS97.

Tanto la ubicación del transcrito de dlgS97 en estadio 12 revelado por la marca un tanto difusa de la hibridación con la sonda S97N como las inmunofluorescencias dobles con los anticuerpos de dlg_{S97N} y Miranda indicaron que DlgS97 no se expresa en los neuroblastos. No se realizaron hibridaciones *in situ* dobles, sólo se hizo la comparación de la marca de la hibridación de la sonda S97N con la hecha con una sonda de wormiu que marca neuroblastos. La expresión de la proteína DlgS97 se detectó en los axones y corticalmente en los somas de todas las neuronas maduras del sistema nervioso embrionario, pero no en la glía y en la glía de la línea media.

Las proteínas MAGUK en general y las de expresión neuronal o "tipo dlg" en particular son altamente conservadas durante la evolución. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre los aminoácidos que componen los dominios PDZ1 y 2 de SAP97 de rata y de DlgA de *Drosophila* es de un 63% (Thomas y col. 1997). En cuanto a la distribución espacial, temporal y subcelular de las proteínas MAGUK de vertebrados "tipo dlg" (SAP97, PSD-95, PSD-93 y SAP102) todas se expresan en el sistema nervioso desde por lo menos los primeros días postnatales y casi exclusivamente en las sinapsis. Las proteínas MAGUK "tipo dlg" se expresan prácticamente en las mismas regiones del cerebro; hipocampo, bulbo olfatorio, corteza cerebral, cordón espinal, etc. con la

aparente excepción de las neuronas de Purkinje cerebelares, que sólo expresan PSD-93 (McGee y col. 2001). Sólo SAP97 se expresa además en los sitios de contacto de las células epiteliales y es la única de estas proteínas que se ha descrito asociada en gran proporción a membranas intracelulares (Sans y col. 2001). No se analizó la presencia de DlgS97 en membranas intracelulares por lo que no podemos descartar esta posibilidad y sólo podemos concluir que DlgS97 se expresa a lo largo de todo el axón y en la corteza del soma de todas las neuronas maduras durante todo el desarrollo embrionario y también en los axones de cerebro de larvas. Es importante recordar que en vertebrados además de las cuatro proteínas MAGUK "tipo Dlg", se expresan sus correspondientes variantes de procesamiento también en neuronas. Cada una de estas proteínas, provengan de genes distintos o sean variantes de procesamiento de un mismo gen, suponen funciones únicas asociadas. Considerando los resultados de esta tesis, se puede concluir que en el sistema nervioso de *Drosophila* donde existe sólo un gen "tipo *dlg*" lo que controla algunas de sus diferentes funciones y propiedades es la regulación de la expresión de este único gen.

Algunas veces la ganancia de función puede indicar algo acerca de la función de un gen en particular, que de otro modo no es posible observar. Con moscas transgénicas que permiten la expresión del transgen EGFP-dlgS97 y otras que permiten la expresión del transgen dlgA-EGFP sólo en neuronas maduras, se determinó que la sobreexpresión de DlgS97 o la de DlgA en

neuronas embrionarias no afecta la formación normal de los fascículos axonales. Acerca de la funcionalidad de las proteínas sobreexpresadas se sabe que al menos éstas se expresan efectivamente según lo observado en ensayos de Western blot. Por lo tanto, frente a un exceso de los dominios de interacción proteína-proteína L27, PDZs, SH3 y GUK no se produce un mayor anclaje o "estancamiento" de las proteínas que interactúan con estos dominios que afecte el normal crecimiento y desarrollo axonal embrionario.

La sobreexpresión de SAP97 en neuronas en cultivos produce un aumento de la función sináptica que ha sido atribuido al aumento de receptores AMPA sinápticos. Los experimentos de sobreexpresión realizados en esta tesis fueron dirigidos sólo para analizar su efecto sobre la navegación axonal. No se puede descartar la posibilidad que la sobreexpresión de DlgS97 en neuronas de *Drosophila* esté afectando otros procesos neuronales.

2.- EXPERIMENTOS DE RNAi EN EMBRIONES

Los defectos en la navegación axonal observados en los experimentos de RNAi en embriones no fueron debido a la pérdida de la expresión de DlgS97, ya que los embriones genéticamente nulos de dlgS97 generados en esta tesis no presentan esos defectos. La desorganización en la navegación o curso que siguen los tractos axonales en los embriones inyectados con dsRNA-S97N no

fue una consecuencia de la concentración de dsRNA utilizado, ya que utilizando un dsRNA dirigido a GFP a una misma concentración que el dsRNA-S97N se observaron defectos en una menor proporción (51 versus 17%). Además se observó una fuerte dependencia a la dosis de dsRNA-S97N inyectado en la obtención del fenotipo neuronal alterado. Por lo tanto, las alteraciones observadas en el sistema nervioso embrionario se deben a la inyección del dsRNA de S97N y no a la inyección misma o al efecto tóxico inespecífico de un dsRNA de ese tamaño.

La técnica de RNA de interferencia o de RNAi por inyección de dsRNA en embriones de *Drosophila* de una célula posee una serie de desventajas que dificultan el análisis de los resultados. Estas desventajas son principalmente la variabilidad que se produce entre inyección e inyección, la difusión no homogénea del dsRNA en todo el embrión con lo que se producen fenotipos más fuertes en los sitios cercanos a la inyección. Además mediante esta técnica no es posible analizar los efectos de la pérdida de función en otros estadios del desarrollo que no sea el embrionario.

Los dsRNAs utilizados en esta tesis fueron efectivos en disminuir la expresión de sus transcritos blancos, aunque no se realizó una correlación entre las diferentes concentraciones de dsRNA utilizados y la expresión de DlgS97. Para el caso de GFP se observó una fluorescencia parcial de GFP en los embriones inyectados con dsRNA-GFP que fue principalmente en la región anterior (la inyección se hace por posterior). Por lo tanto puede que el dsRNA

no sea suficiente para actuar por dilución en todo el embrión, especialmente si se utilizan concentraciones bajas.

Una posible explicación de los fenotipos observados en los experimentos de RNAi es que el dsRNA inyectado esté reconociendo algún otro RNA, y que la disminución de ese otro transcrito sea el responsable del fenotipo. Según el mecanismo de acción de los dsRNA para producir RNAi en *Drosophila*, los dsRNA son cortados en fragmentos de 21-23 pb, y son esos fragmentos los responsables directos del RNAi. De todos los posibles fragmentos de 21 pb que se pueden formar con los 1200 pb de dsRNA-S97N inyectados, existen sólo diez fragmentos que son idénticos a regiones exónicas de otros genes, y todos corresponden a los 21 últimos pb del dsRNA-S97N. No existe otra secuencia idéntica mayor o igual a 21 pb en todo el genoma. De entre estos diez genes, solo dos tienen un fenotipo descrito neuronal (los codificados por los genes *Dfd* y por el CG9821), que podrían explicar en parte el fenotipo observado en las inyecciones. Por ejemplo, en Ivanov y col. 2004, a través de RNAi por inyección de dsRNA en embriones de *Drosophila* los autores describen genes necesarios para el correcto desarrollo del sistema nervioso. Uno de los genes descubiertos es el codificado por el gen CG9821, cuyo fenotipo es el menor desarrollo de las comisuras del cordón ventral y una hipoplasia del sistema nervioso periférico, que podría ser compatible con lo observado en las inyecciones de dsRNA-S97N. Hay que considerar sin embargo, que proporcionalmente existirían muchísimos más fragmentos de 21 pb homólogos a *dlg* que los homólogos a

estos 21 pb homólogos a CG9821 y *Dfd*. Por ejemplo, en el sitio web de www.dkfz-heidelberg.de, que es una base de datos de RNAi genómico de *Drosophila*, los autores utilizan seis sondas para *dlg*, que van de 141 pb hasta 515 pb. Con una de esas sondas de 141 pb, se generan 121 fragmentos de 21 pb de los cuales cuatro fragmentos son homólogos a *Dfd*, y sólo uno lo es con CG9821. Para corroborar si el fenotipo observado con el dsRNA-S97N se debe a estos 21 pb sería necesario inyectar los 1200 pb de S97N, pero sin estos 21 pb finales.

3.- MUTANTES NULAS DE *DlgS97*

A través de la movilización local e imprecisa del elemento P de la cepa *dlg*^{NP7225} se obtuvieron dos mutantes de *DlgS97*, llamadas *dlg*^{exc5} y *dlg*^{exc138}. Ambas son homocigotas viables y con nula expresión de *DlgS97* durante el desarrollo embrionario y en el adulto. Por lo tanto, *DlgS97* es prescindible para el desarrollo del individuo hasta la edad adulta.

La delección genómica de la mutante *dlg*^{exc138} abarca completamente el exón 1 y parte del exón 2, y la mutante *dlg*^{exc5} posee una delección que cubre los exones 1, 2, 3 y parte del 4. Por lo tanto en ambas mutantes se pierde completamente el inicio de la traducción de *dlgS97* y de las variantes que comienzan con exón 2. El inicio putativo de la transcripción de *dlgS97* está en el exón A y el de *dlgA* en el exón B. Para que haya un nuevo marco de lectura que

permitiera la obtención de variantes con dominio L27 tendría que producirse un corte y empalme nuevo entre el exón A y la mitad del exón 2, o entre el exón A y el 3, situación que no se observa en ninguna de las variantes existentes de *dlg*. En el supuesto que esto se produjera, se necesitaría además generar un nuevo marco de lectura. Sin embargo, no se encuentra un sitio ATG de inicio de la traducción apropiado hasta el exón 6, el que de usarse generaría una proteína de menor peso molecular, pero que aún sería reconocida por el anticuerpo *dlg*_{S97N}. El dominio L27 está codificado por los últimos pb del exón 1, el exón 3 completo y la mitad del exón 4. Por lo tanto, la mutante *dlg*^{exc5} no posee la región que codifica para el dominio L27. El anticuerpo policlonal que permite identificar a la proteína DlgS97 (anticuerpo *dlg*_{S97N}) está diseñado contra la región codificada por los últimos pb del exón 1, los exones 3 y 4 completos y la mitad del exón 6. No descartamos la posibilidad de que en las mutantes pudiera ocurrir la expresión de proteínas que fueran codificadas desde el exón 4. Si esto ocurriera se producirían proteínas inestables o el marco de lectura sería tal que se terminaría antes la traducción, ya que en ensayos de Western blot no se detectaron proteínas de alto peso molecular con el anticuerpo *dlg*_{S97N}. No se detectaron transcritos con L27 en cabeza de adulto (experimentos de RT-PCRs en las mutantes de *dlg*S97, no mostrado).

Las cepas de la colección a la que pertenece *dlg*^{NP7225} (Gal4 Enhancer Trap Insertion Database, <http://flymap.lab.nig.ac.jp/~dclust/getdb.html>) son creadas para detectar sitios potenciadores ("enhancer") o promotores. El

elemento P contiene la secuencia Gal4 que puede insertarse en un sitio regulador de un gen determinado. Estas regiones usualmente se ubican en la región 5' del gen y los elementos móviles se insertan en estas regiones con mayor frecuencia (sitios "hot spot"). De este modo, si el elemento P se inserta en una región reguladora que es capaz de activar la transcripción de Gal4 de acuerdo al patrón de este gen en particular, este patrón puede ser revelado al cruzar la mosca que tiene el elemento PGal4 con otra transgénica que expresa un marcador como GFP bajo la secuencia UAS. Por lo tanto, se puede determinar donde y cuando el gen se expresa por la visualización del marcador, por ejemplo GFP. En el caso de la cepa *dlg*^{NP7225} no se observó ninguna marca de GFP específica aún a 29°C, temperatura a la cual es mayor la eficiencia de la expresión de Gal4 y su actividad (no mostrado). Por lo tanto, la región donde está insertado este elemento que es 900 pb río arriba del exón 1 de *dlg* según la secuencia publicada por la misma base de datos, no es capaz de dirigir la expresión de Gal4, lo que sugiere que esa región no contiene regiones activadoras de la transcripción.

Por otra parte, también es posible que la misma inserción del elemento P produzca una inestabilidad del pre-mRNA y disminuya la expresión del gen donde está insertado o inclusive haya nula expresión de él. En el caso de la cepa *dlg*^{NP7225} se observó una disminución de la expresión de DlgS97 durante el desarrollo embrionario, pero no así en adultos. Lo anterior nuevamente apunta a la complejidad de la regulación de la expresión del gen *dlg*, tanto espacial

como en este caso temporalmente. Ocurre algo similar con las cepas *dlg*^{NP0768} y *dlg*^{P1699} que poseen nula expresión de DlgS97 en adulto, pero expresan algo de proteína en embriones y en larvas. En estos alelos, el elemento P está insertado entre los exones 7 y el 8, es decir alrededor de 18 Kb río abajo del inicio de la traducción de DlgS97.

Drosophila es una especie holometábola, en la que los individuos embrionarios o larvales son muy diferentes de sus contrapartes adultas, por ejemplo se sabe que no todas las neuronas embrionarias llegan a adulto, algunas inclusive no llegan a larva. El uso de factores de transcripción también es diferente en los distintos estadios del desarrollo, por ejemplo el factor transcripcional prospero se expresa sólo en los neuroblastos de embriones mientras que en larvas se expresa en las neuronas diferenciadas. Esto debe considerarse en el momento de realizar estudios comparativos entre embriones, larvas, pupa o adultos, sean estos estudios morfológicos, de expresión génica, o conductuales. Por esta razón, es más apropiado destacar la existencia de una compleja regulación temporal y espacial de la expresión de *dlg* en una misma etapa del desarrollo, como por ejemplo la embrionaria.

La mutación por movilización del elemento P se produce por los eventos llamados de "escisión imprecisa", que son en realidad "saltos" del elemento P que arrastran regiones genómicas adyacentes. De esta forma se puede producir un "salto" hacia una región vecina y una posterior "escisión imprecisa" en ese sitio. Esta puede ser lo que haya ocurrido en las líneas homocigotas

letales que se obtuvieron de la transposición de *dlg*^{NP7225}, algunas de las cuales fallaron en complementar en un 100% a la mutante *dlg*^{m52}, observándose larvas gigantes, porque lo que lo más probable es que estas mutantes correspondan a nuevos alelos de *dlgA*.

No se observó ninguna alteración morfológica gruesa en el sistema nervioso de las mutantes *dlg*^{exc5} y *dlg*^{exc138} durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto *DlgS97* es prescindible para la correcta navegación axonal embrionaria. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que el locus *dlg* completo sea necesario para la neurogénesis, es decir tanto la variante *DlgA* como *DlgS97*. Para poder abordar este asunto habría que analizar mutantes dobles nulas para *DlgS97* y para *DlgA*. En este tipo de experimento *DlgA* debiera estar mutado sólo en las neuronas diferenciadas para evitar el problema de la pérdida de la polaridad celular en los epitelios y en las divisiones asimétricas de los neuroblastos ya que pueden afectar indirectamente la neurogénesis.

Analizando el sistema nervioso de las mutantes en estadios posteriores al embrionario, se detectó una menor inmunoreactividad a Fasciclina II en algunas regiones del cerebro larval, específicamente en la región de la médula del lóbulo óptico. Fasciclina II se expresa entre otras neuronas en los axones que van desde los fotorreceptores a la primera sinapsis en el lóbulo óptico llamada lámina, y en los axones que conectan las vías desde la lámina a la segunda sinapsis central, la médula del lóbulo cerebral.

Dlg interactúa a través de su primer y segundo dominio PDZ con Fasciclina II en los botones sinápticos de la unión neuromuscular, determinando así la localización y función sináptica de Fasciclina II. Los estudios que han determinado como las mutaciones de *dlg* afectan el crecimiento y estabilidad sináptica a través de la pérdida de la asociación con Fasciclina II se han realizado con las mutantes *dlg^{XI-2}* y *dlg^{m52}*. Estos alelos afectan la expresión de DlgA y de DlgS97 en los botones de la sinapsis neuromuscular, por lo que es posible que sean los dominios PDZs de DlgS97 o de DlgA los que se asocien a Fasciclina II. Si la falta de inmunoreactividad a Fasciclina II en el lóbulo óptico de larvas *dlg^{exc138}* se debe a una deslocalización de ésta, podría ser que en esas neuronas DlgS97, sólo -o conjuntamente con DlgA- podría estar localizando a Fasciclina II.

4.- ALTERACIONES CONDUCTUALES EN LAS MUTANTES DE DlgS97

Considerando (1) que no se observaron grandes alteraciones en la estructura del sistema nervioso embrionario ni larval en las mutantes de *dlgS97*, con excepción de la menor inmunoreactividad a Fasciclina II en algunos axones del lóbulo cerebral de larvas de 3^{er} estadio; (2) que se han descrito funciones conductuales en otros alelos de *dlgS97* (resistencia a alcohol en cepa *dlg^{P1699}*, Lee y col, 2005); y (3) que las mutantes nulas de las proteínas MAGUK "tipo *dlg*" presentan defectos en aprendizaje y memoria; se analizó la participación de

DlgS97 en un proceso neuronal complejo en el adulto como lo es la conducta frente a un estímulo determinado.

El ensayo conductual escogido fue el movimiento de las moscas durante 5 minutos hacia un estímulo luminoso. El ensayo demostró ser consistente, ya que repetidamente las cepas se comportaron de la misma manera, con errores estándares medios pocas veces superiores al 12%. Además las cepas que pueden considerarse como "nativas" (como *dlg^{exc150}* y *dlg^{NP7225}*) se comportaron según se ha descrito para otras cepas nativas; es decir aproximadamente el 70% de las moscas migra hacia la luz al primer minuto (Benzer 1967).

En ambas mutantes de DlgS97 se observaron defectos en la respuesta normal (fototactismo positivo) frente al estímulo, es decir, sólo un pequeño porcentaje de las moscas migró hacia la luz durante todo el ensayo, especialmente al primer minuto. En los experimentos conductuales es muy importante lo que ha sido llamado fondo genético, es decir el resto de pequeñas mutaciones o alelos de todo el genoma que acompañan a una mutación determinada. Es por esto que las comparaciones se realizaron con la cepa que posee el fondo genético más parecido: las mutantes *dlg^{exc138}* y *dlg^{exc5}* se compararon con la escisión precisa *dlg^{exc150}*, y en los experimentos de rescate se comparó a las mutantes recombinantes *dlg^{exc138}-elavGal4* con *dlg^{exc138}-elavGal4*; UAS-*dlgAEGFP* o *dlg^{exc138}-elavGal4*; UAS-EGFP*DlgS97*, y *dlg^{exc5}-elavGal4* se comparó con *dlg^{exc5}-elavGal4*; UAS-*dlgAEGFP* o *dlg^{exc5}-elavGal4*; UAS-EGFP*DlgS97*.

La respuesta alterada se observó principalmente al primer minuto de aplicado el estímulo luminoso y se rescató completamente con la expresión de DlgS97 en neuronas de moscas jóvenes (1 a 6 días) de edad, en moscas de 12 días y en moscas viejas de 25-30 días. La significancia del rescate sólo fue analizada el primer y al último minuto del ensayo, ya que entre el minuto dos y el minuto cinco fueron en general muy pocas moscas las que se movían hacia la luz (ver en los gráficos de la figura 34, la poca pendiente de las curvas entre los minutos 2 y 5).

La sobreexpresión de DlgA en las neuronas de las moscas mutantes de DlgS97 sólo fue capaz de revertir el fenotipo mutante al minuto 5 del ensayo y no al primer minuto como lo hace DlgS97. Es decir DlgA puede reemplazar a DlgS97 pero no puede mejorar la velocidad de la respuesta. Esto podría deberse a que el dominio L27 es necesario para la rapidez de la respuesta.

A pesar de tener fondos genéticos diferentes, al comparar el porcentaje de moscas que queda en la oscuridad a los 5 minutos en las moscas INAD con el que queda en la oscuridad en las mutantes *dlg^{exc138}*, *dlg^{exc5}*, *dlg^{exc138}-elavGal4* o *dlg^{exc5}-elavGal4* se observó que todas las mutantes de *dlgS97* no se comportan significativamente diferentes que la mutante ciega, a diferencia de las moscas *dlg^{exc150}* y *dlg^{NP7225}* que sí lo hacen.

La mutantes jóvenes de *dlg^{exc5}* no fueron significativamente diferentes que *dlg^{exc150}* a los 5 minutos, del mismo modo que las moscas de 25-30 días de edad *dlg^{exc138}-elavGal4*; UAS-EGFP*dlgS97* no lo fueron de *dlg^{exc138}-elavGal4* al

primer minuto, probablemente debido al alto error estándar medio en ambos casos (18 y 13% respectivamente).

Es probable que a edades mayores de 25 días la respuesta de las moscas en general se vea afectada por la senectud más que por otra causa específica, pero aún así DlgS97 rescató la respuesta alterada de la mutante *dlg^{exc138}* a los 5 minutos.

Aunque no se muestra en esta tesis, las mutantes de *dlgS97* presentan electroretinogramas normales, es decir el defecto asociado a la conducta de respuesta a la luz no se origina en la recepción del estímulo, ni en la fototransducción. Por lo tanto, la respuesta conductual alterada en las mutantes de *dlgS97* puede ser consecuencia de defectos en la locomoción básica o coordinación motora, debido a alteraciones que pueden originarse en la transmisión y/o en la coordinación de la respuesta en las sinapsis centrales, periféricas y/o neuromusculares, que afecten la eficiencia de la transmisión o de la coordinación de la información. Por ejemplo, DlgS97 (solo o en conjunto con DlgA) podría estar facilitando el agrupamiento de canales y moléculas de adhesión celular como Fasciclina II, y de este modo mejorar la eficacia de la transmisión, aumentando la velocidad de la respuesta. Esto, ya que se sabe que Dlg localiza a Fasciclina II y al canal de potasio tipo Shaker en la unión neuromuscular (Zito y col. 1997, Tejedor y col. 1997), y que Fasciclina II controla la estabilización y crecimiento sináptico (Schuster y col. 1996).

Se sabe que Dlg se expresa en la retina, en la médula y lámina del cerebro de adultos y en otras estructuras del sistema nervioso (Ruiz-Cañada y col. 2002). Además en Western blot de extractos de cabezas se detectó DlgS97 en cabeza de adultos y además se sabe que se expresa en médula y lámina (no mostrado). No sabemos si en el cerebro de moscas adultos mutantes de *dlgS97* también hay una disminución de inmunoreactividad a Fasciclina II como la observada en cerebros de larvas (para ello habría que realizar inmunotinciones en cortes de cabeza). Si fuese así, querría decir que DlgS97 estaría localizando a Fasciclina II en algunos sitios de las sinapsis centrales del adulto y estaría modulando la plasticidad sináptica como lo hace en la unión neuromuscular.

La proteína que es el mejor candidato para ser la que normalmente interactúe con el dominio L27 de DlgS97 de *Drosophila* (Lee y col. 2002) es la proteína Caki (llamada también Camguk). Las mutantes de Caki presentan defectos en la locomoción (Martin y Olo 1996) y en la regulación de la liberación de las vesículas de neurotransmisor (Zordan y col. 2005). Además Caki/Cask forma un complejo conservado con las proteínas Dlin7/MALS y Mint, y MALS también regula la exocitosis de vesículas sinápticas. Por lo tanto, DlgS97 podría estar formando en neuronas un complejo con Caki y este complejo podría regular la liberación de vesículas sinápticas en conjunto con otras proteínas.

En síntesis, considerando la inmunoreactividad remanente al anticuerpo dlg_{PDZ} en las mutantes de $DlgS97$, se puede concluir que $DlgA$ se expresa en sistema nervioso de embriones en mayor proporción que $DlgS97$, mientras que en adultos $DlgS97$ es la variante principal. Así mismo, la variante $DlgS97$ no es necesaria para el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila*, pero sí lo es para la conducta normal del adulto.

CONCLUSIONES

1. Existen diferentes variantes de procesamiento alternativo del gen *discs-large* que se expresan en el mismo estadio del desarrollo embrionario.
2. DlgS97, a diferencia de DlgA, no posee componente materno. Es sintetizado completamente por el cigoto.
3. La variante DlgS97 se expresa en un grupo heterogéneo de neuronas maduras: motoneuronas, neuronas sensoriales e interneuronas, además de músculo y gónadas. No se expresa en epitelios, neuroblastos, glía, ni en la glía de la línea media.
4. DlgS97 no participa en la división asimétrica de los neuroblastos.
5. La sobreexpresión de DlgS97 en neuronas embrionarias no afecta la correcta formación de los fascículos axonales.
6. DlgS97 no es necesario para el desarrollo correcto del sistema nervioso embrionario, al menos al nivel de microscopía utilizada en esta tesis, ni tampoco lo es para el desarrollo del individuo hasta la edad adulta.

7. DlgS97 y no DlgA es necesario para la correcta respuesta a la luz en moscas adultas.

REFERENCIAS

- Adams M.D. y Sekelsky J.J. 2002. From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nature Review Genetics* 3: 189-198.
- Ashburner M., Golic K.G. y Hawley R.S. 2005. *Drosophila: A laboratory handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2ª edición.
- Ashley J., Packard M., Ataman B. y Budnik V. 2005. Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J. Neurosci.* 25:5943–5955.
- Bachmann A., Timmer M., Sierralta J., Pietrini G., Gundelfinger E.D., Knust E. y 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 Science* 117: 1899-1909.
- Bate M. y Martínez Arias A. 1993. The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Capítulos 18, 19 y 20
- Bellaiche Y., Radovic A., Woods D.F., Hough C.D., Parmentier M.L., O'Kane C.J., Bryant P.J. y Schweisguth F. 2001. The Partner of inscuteable/discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* 106: 355-366.
- Benzer S. 1967. Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Genetics* 58: 1112-1119.
- Bilder D. 2004 Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes and Development* 18: 1909-1925.
- Bilder D., Li M. y Perrimon N. 2000. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289: 113-116.
- Bilder D. 2001a. PDZ proteins and polarity: functions from the fly. *Trends Genet.* 17: 511 – 519.
- Bilder D. 2001b. Cell polarity: Squaring the circle. *Curr. Biol.* 11: R132–R135.

- Brand A. y Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Brumby A., Secombe J., Horsfield J., Coombe M., Amin N., Coates D., Saint R. y Richardson H. 2004. A genetic screen for dominant modifiers of a cyclin E hypomorphic mutation identifies novel regulators of S-phase entry in *Drosophila*. *Genetics* 168: 227-251.
- Budnik V. y Gramates L.S. 1999. Neuromuscular Junctions in *Drosophila*. International review of Neurobiology, Volumen 43, Academic Press, EE.UU.
- Budnik V., Koh Y-H., Guan B., Haugh C., Woods D. y Gorczyca M. 1996. Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron* 17: 627-640.
- Butz S., Okamoto M. y Südhof T.C. 1998. A Tripartite Protein Complex with the Potential to Couple Synaptic Vesicle Exocytosis to Cell Adhesion in Brain. *Cell* 94: 773-782.
- Cai C., Li H., Rivera C. y Keinänen K. 2006. Interaction between SAP97 and PSD-95, two MAGUK proteins involved in synaptic trafficking of AMPA receptors. *J. Biol. Chem.* 281: 4267-4273.
- Caruana G. y Bernstein A. 2001. Craniofacial dysmorphogenesis including cleft palate in mice with an insertional mutation in the *discs large* gene. *Mol Cell Biol.* 21: 1475-1483.
- Chetkovich D.M., Bunn R.C., Kuo S.H., Kawasaki Y., Kohwi M. y Bredt D.S. 2002. Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. *J Neurosci.* 22: 6415-6425.
- Doerks T., Bork P., Kamberov E., Makarova O., Muecke S. y Margolis B. 2000. L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. *Trends Biochem. Sci.* 25: 317-318.
- El-Husseini A.E., Schnell E., Chetkovich D.M., Nicoll R.A. y Bredt D.S. 2000a. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290: 1364-1368.
- El-Husseini A.E., Topinka J.R., Lehrer-Graiwer J.E., Firestein B.L., Craven S.E., Aoki C. y Bredt D.S. 2000b. Ion channel clustering by membrane-associated guanylate kinases. Differential regulation by N-terminal lipid and metal binding motifs. *J. Biol. Chem.* 275: 23904-23910.
- El-Husseini A.E., Craven S.E., Chetkovich D.M., Firestein B.L., Schnell E., Aoki C. y Bredt D.S. 2000c. Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and Ion Channel Clustering. *J. Cell Biol.* 148: 159-171.

- El-Husseini A.E., Schnell E., Dakoji S., Sweeney N., Zhou Q., Prange O., Gauthier-Campbell C., Aguilera-Moreno A., Nicoll R.A., y Bredt D.S. 2002. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108: 849–863.
- Fanning A.S. y Anderson J.M. 1999. Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 432-439.
- Feng W., Long J.F., Fan J.S., Suetake T. y Zhang M. 2004. The tetrameric L27 domain complex as an organization platform for supramolecular assemblies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 475-80.
- Funke L., Dakoji S. y Bredt D.S. 2005. Membrane-Associated Guanylate Kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 219–45.
- Garner C.C., Nash J. y Haganir R.L. 2000a. PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* 10: 274-280.
- Garner C.C., Kindler S. y Gundelfinger E.D. 2000b. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 321-327.
- Goldstein L.S.B. y Fyrberg E.A. 1994. *Drosophila melanogaster*. Practical uses in cell and molecular biology. *Methods in cell biology*, volumen 44, Academic press.
- Goode S. y Perrimon N. 1997. Inhibition of patterned cell shape change and cell invasion by Discs large during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 11: 2532-2544.
- Hanada T, Takeuchi A., Sondarva G. y Chishti A. H. 2003. Protein 4.1-mediated membrane targeting of human Discs large in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 34445–34450.
- Harris B.Z. y Lim W.A. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Science* 114: 3219-3231.
- Hough C.D, Woods D.F., Park S. y Bryant P.J. 1997. Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs-large. *Genes Dev.* 11: 3242-53.
- Humbert P., Russell S. y Richardson H. 2003. Dlg, Scribble and Lgi in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* 25: 542-553.
- Ivanov A.I., Rovescalli A. C., Pozzi P., Yoo S., Mozer B., Li H.-P., Yu S.-H., Higashida H., Guo V., Spencer M. y Nirenberg M. 2004. Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46: 16216-16221.
- Jan Y.N. y Jan L.Y. 1998. Asymmetric cell division. *Nature* 392: 775-778.
- Jan Y.N. y Jan L.Y. 2001 Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 2: 772-779.

- Kaech S.M., Whitfield C.W. y Kim S.K. 1998. The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* 94: 761-771.
- Karnak D., Lee S. y Margolis B. 2002. Identification of multiple binding partners for the amino-terminal domain of synapse-associated protein 97. *J. Biol. Chem.* 277: 46730-46735.
- Kennerdell J.R. y Carthew R.W. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95: 1017-1026.
- Kiyono T., Hiraiwa A., Fujita M., Hayashi Y., Akiyama T y Ishibashi M. 1997. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 11612-11616.
- Klocker N., Bunn R.C., Schnell E., Caruana G., Bernstein A., Nicoll R.A. y Bredt D.S. 2002. Synaptic glutamate receptor clustering in mice lacking the SH3 and GK domains of SAP97. *Eur J Neurosci.* 16: 1517-1522.
- Koh Y.H., Popova E., Thomas U., Griffith L.C. y Budnik V. 1999. Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* 98: 353-363.
- Lahey T., Gorzcyca M., Jia X.-X. y Budnik V. 1994. The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron* 13: 823-835.
- Lee S., Berger K.H., Kong E. y Heberlein H. Role of DSAP97, an isoform of Discs-large DLG, in ethanol tolerance. Meeting on Neurobiology of *Drosophila*, 5-9 de Octubre 2005, Cold Spring Harbor, New York.
- Lee S., Fan S., Makarova O., Straight S. y Margolis B. 2002. A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1778-1791.
- Lindsley D.L. y Zimm G.G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc., publicado por Harcourt Brace Javanovich.
- Lopes C., Gassanova S., Delabar J.M. y Rachidi M. 2001. The CASK/Lin-2 *Drosophila* homologue, *Camguk*, could play a role in epithelial patterning and in neuronal targeting. *Bio. Biophys. Res. Commu.* 284:1004-1010.
- Lu B., Jan L. y Jan Y.N. 2000. Control of cell divisions in the nervous system: Symmetry and asymmetry. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 531-556.
- Lue R.A., Marfatia S.M., Branton D. y Chishti A.H. 1994. Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the *Drosophila* discs large

- tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9818-9822.
- Lue R.A., Brandin E., Chan E.P. y Branton D. 1996. Two independent domains of hDlg are sufficient for subcellular targeting: the PDZ1-2 conformational unit and an alternatively spliced domain. *J. Cell Biol.* 135: 1125-1137.
- Martin J-R. y Olo R. 1996. A new *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (Caki) is localized in the central nervous system and implicated in walking speed. *EMBO J.* 15: 1865-1876.
- Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G.H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M. Toyoshima, K. y Akiyama T. 1996. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science* 272: 1020-1023.
- McGee A.W., Topinka J.R., Hashimoto K., Petralia R.S., Kakizawa S., Kauer F.W., Aguilera-Moreno A., Wenthold R.J., Kano M. y Bredt D.S. 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.
- McLaughlin M., Hale R., Ellston D., Gaudet S., Lue R.A. y Viel A. 2002. The distribution and function of alternatively spliced insertions in hDlg. *J. Biol. Chem.* 277: 6406-6412.
- Migaud M., Charlesworth P., Dempster M., Webster L.C., Watabe A.M., Makhinson M., He Y., Ramsay M.F., Morris R.G.M., Morrison J.H., O'Dell T.J. y Grant S.G. 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 39: 433-439.
- Mendoza C., Olgún P., Lafferte G., Thomas U., Ebitsch S., Gundelfinger E.D., Kukuljan M. y Sierralta J. 2003. Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 23: 2093-2101.
- Muller B., Kistner U., Veh R., Cases-Langhoff C., Becker B., Guldenfinger E. y Garner C. 1995. Molecular characterization and spatial distribution SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP-90 and the *Drosophila* Discs-Large tumor suppressor protein. *J. Neurosci.* 15: 2354-2366.
- Nakagawa T, Futai K, Lashuel HA, Lo I, Okamoto K, Walz T, Hayashi Y y Sheng M. 2004. Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions. *Neuron* 44: 453-467.
- Ohshiro T., Yagami T., Zhang C. y Matsuzaki F. 2000. Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* 408:593-596.
- Olsen O., Moore K.A., Fukata M., Kazuta T., Trinidad J.C., Kauer F.W., Streuli M., Misawa H., Burlingame A.L., Nicoll R.A. y Bredt D.S. 2006. Neurotransmitter release regulated by a MALS-liprin- α presynaptic complex *J. Cell Biol.* 170: 2005 1127-1134.

- Olsen O., Moore K.A., Nicoll R.A. y Brecht D.S. 2006. Synaptic transmission regulated by a presynaptic MAL3/Liprin- α protein complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:223–227.
- Pak, W. L. 1979. Study of photoreceptor function using *Drosophila* mutants. In *Neurogenetics: Genetic Approaches to the Nervous System*, X. O. Breakfield, ed., New York: Elsevier, pp. 67-99.
- Pawson T. y Scott J.D. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080.
- Peng C., Manning L., Albertson R. y Doe C.Q. 2000. The tumour suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 408: 596-600.
- Perrimon N. 1988. The maternal effect of *lethal(1)discs-large-1*: a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 127: 392-407.
- Petrosky K.Y., Ou H.D., Löhr F., Dötsch V. y Lim W.A. 2005. A general model for preferential hetero-oligomerization of LIN-2/7 Domains. Mechanism underlying directed assembly of supramolecular signaling complexes. *J. Biol. Chem.* 280: 38528–38536.
- Regalado M.P., Terry-Lorenzo R.T., Waites C.L., Garner C.C. y Malenka R.C. 2006. Transsynaptic signaling by postsynaptic synapse-associated protein 97. *J. Neurosci.* 26: 2343–2357.
- Ruiz-Cañada C. Koh Y.H., Budnik V. y Tejedor F.J. 2002. DLG differentially localizes Shaker K channels in the central nervous system and retina of *Drosophila*. *Journal of Neurochemistry*, 82: 1490–1501.
- Rumbaugh G., Sia G-M., Garner C.C. y Huganir R.L. 2003. Synapse-associated protein-97 isoform-specific regulation of surface AMPA receptors and synaptic function in cultured neurons. *J. Neurosci.* 23: 4567–4576.
- Sans N., Racca C., Petralia R.S., Wang Y-X., McCallum J. y Wenthold R.J. 2001. Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J. Neurosci.* 21:7506–7516.
- Scheiffele P., Fan J., Chioh J., Fetter R. y Serafini T. 2000. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101: 657–669
- Schuster C.M., Davis G.W., Fetter R.D. y Goodman C.S. 1996. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17: 641–654.
- Setou M., Nakagawa T., Seog D-H. y Hirokawa N. 2000. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288: 1796-1802.

- Sheng M. y Kim E. 2000. The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell Sci.* 113 : 1851–1856.
- Sheng M. y Sala C. 2001. PDZ Domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1–29.
- Sierralta J. y Mendoza C. 2004. PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity. *Brain Research Reviews* 47: 105–115.
- Stewart M., Murphy C. y Fristrom J.W. 1972 The recovery and preliminary characterization of X chromosome mutants affecting imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 27: 71-83.
- Sullivan W., Ashburner M. y Hawley R.S. 2000. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulo 9.
- Tejedor F.J., Bokhari A., Rogero O., Gorczyca M., Zhang J., Kim E., Sheng M., y Budnik V. 1997. Essential role for dlg in synaptic clustering of Shaker K⁺ channels *in vivo*. *J. Neurosci.* 17: 152-159.
- Tepass U., Tanentzapf G., Ward R. y Fehon R. 2001. Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 35:747–784.
- Thomas U., Kim E., Kuhlendahl S., Koh Y.-H., Gundelfinger E.D., Sheng M., Garner C.C. y 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.
- Voelker R.A., Wisely G.B., Huang S.M. y Gyurkovics H. 1985. Genetic and molecular variation in the RplI215 region of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 201: 437-445.
- Wodarz A. 2002. Establishing cell polarity in development. *Nature Cell Biol.* 4: E39-E44.
- Woods D.F. y Bryant P.J. 1989. Molecular cloning of the lethal (1) Discs large-1 oncogene of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 134: 222-235.
- Woods D.F. y Bryant P.J. 1991. The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66: 451-64.
- Woods D.F., Hough C., Peel D., Callaini G. y Bryant P.J. 1996. Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.* 134: 1469-82.
- Wu H., Reuver S., Kuhlendahl S., Chung W.J. y Garner C. 1998. Subcellular targeting and cytoskeletal attachment of SAP97 to the epithelial lateral membrane. *J. of Cell Science* 111: 2365-237.

Wu H., Reissner C., Kuhlendahl S., Coblenz B., Reuver S., Kindler S., Gundelfinger E.D. y Garner C.C. 2000. Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *EMBO J.* 19: 5740-5741.

Wu H., Nash J.E., Zamorano P. y Garner C.C. 2002. Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI. Implications for AMPA receptor trafficking. *J. Biol.Chem.* 277: 30928–30934.

Zhang M. y Wang W. 2003. Organization of Signaling Complexes by PDZ-Domain Scaffold Proteins *Acc. Chem. Res.* 36: 530-538

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

Zordan M.A., Massironi M., Ducato M.G., Kronnie G., Costa R., Reggiani C., Chagneau C., Martin J-R. y Megighian A. 2005. Drosophila CAKI/CMG Protein, a homolog of human CASK, is essential for regulation of neurotransmitter vesicle release. *J. Neurophysiol* 94: 1074–1083.