



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

***Participación del gen *dlg* (*discs-large*)  
en el desarrollo del ojo de *Drosophila  
melanogaster*.***

**PATROCINANTE**

Dra. Daniela Seelenfreund

Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas.

Universidad de Chile.

**DIRECTOR**

Dra. Jimena Sierralta

Laboratorio de Neurobiología Celular y  
Molecular

Programa de Fisiología y Biofísica

Instituto de Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

**Valeria Albornoz Castro**

**Santiago, 2005**

*A mis Padres que son mi ejemplo.*

*A Giancarlo mi fiel compañero.*

*Y a todos los que me apoyaron para que este trabajo se hiciera realidad.*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	I
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	II
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN .....	IX
SUMMARY .....	XI
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Proteínas de andamio .....	1
1.2. El gen <i>dlg</i> .....	1
1.3. Funciones de Dlg.....	2
1.4. El dominio S97N de las variantes del gen <i>dlg</i> .....	3
1.5. El ojo compuesto de <i>Drosophila</i> como modelo de estudio .....	6
1.6. Desarrollo del ojo compuesto de <i>Drosophila</i> .....	8
1.7. Hipótesis .....	10
1.8. Objetivo General .....	11
1.9. Objetivos Específicos .....	11
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Animales .....	12
2.1.1. Mantención cepas <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	12
2.1.2. Cepas transgénicas .....	13
2.2. Reactivos y soluciones .....	13
2.3. Métodos .....	18
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Análisis de la(s) variante(s) de <i>dlg</i> expresada(s) en discos imaginales de ojo tercer estadio larval. ....	25
3.2. Patrón de expresión de las isoformas que expresan el dominio S97N durante el desarrollo del ojo compuesto de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	28
3.3. Análisis de los efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en el desarrollo del ojo de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	36

3.4.	<b>Análisis de los efectos asociados a la inhibición de la expresión de las variantes del gen <i>dlg</i> que contienen el dominio S97N en el desarrollo del ojo de <i>Drosophila melanogaster</i>.</b> ....	<b>40</b>
4.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
6.	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Variantes originadas del locus <i>dlg</i> . ....	4
Fig. 2.	Diagrama de un omatidio. ....	7
Fig. 3.	Etapas en el desarrollo del ojo de <i>Drosophila</i> . ....	9
Fig. 4.	Esquema del ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	12
Fig. 5.	Esquema del sistema UAS-GAL4 en <i>Drosophila</i> . ....	19
Fig. 6.	Análisis mediante western blot de variantes de procesamiento de <i>dlg</i> expresadas en tejido nervioso y epitelial. ....	26
Fig. 7.	Determinación de la presencia del mRNA codificante para las variantes Dlg-S97 y Dlg-A en discos imaginales de ojo. ....	27
Fig. 8.	Expresión del dominio S97N en discos imaginales de ojo L3. ....	29
Fig. 9.	Localización subcelular del dominio S97N en discos de ojo L3. ....	31
Fig. 10.	Localización subcelular del dominio S97N en pupas tempranas ....	32
Fig. 11.	Localización a nivel subcelular del dominio S97N en estadio pupal tardío. ....	34
Fig. 12.	Expresión axonal del dominio S97N. ....	35
Fig. 13.	Efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en discos imaginales de ojo L3. ....	37
Fig. 14.	Efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg <sub>S97N</sub> y anti-Dlg <sub>PDZ1-2</sub> . ....	38
Fig. 15.	Efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg <sub>S97N</sub> y anti-Crb. ....	39

Fig. 16.	Efectos asociados a la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en discos de ojo L3.....	41
Fig. 17.	Efectos asociados a la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg <sub>S97N</sub> y anti-Dlg <sub>PDZ12</sub> .....	42
Fig. 18.	Efectos asociados a la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg <sub>S97N</sub> y anti-Crb. ....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tabla de Abreviaturas .....	vii
Tabla 2.	Cepas transgénicas de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas en esta tesis.....	13
Tabla 3.	Anticuerpos primarios utilizados para experimentos de inmunofluorescencia y sus correspondientes anticuerpos secundarios.....	21
Tabla 4.	Anticuerpos primarios utilizados para experimentos de western blot y sus correspondientes anticuerpos secundarios.....	23
Tabla 5.	Secuencias partidores para DlgS97, DlgA y actina.....	24

# ABREVIATURAS

Tabla 1. Tabla de Abreviaturas

SIGLA	SIGNIFICADO
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario.
CF	Células fotorreceptoras.
CI	Células interomatidiales.
CPI	Células precursoras interomatidiales.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
Dlg	Discs large.
dp	Desarrollo pupal.
dsRNA	RNA de doble hebra.
DTT	Ditiotreitol.
EST	" <i>Expressed sequence tag</i> ".
GUK	" <i>Guanilate kinase</i> ".
IHQ	Inmunohistoquímica.
L3	Larva tercer estadio.
Lgl	" <i>Lethal giant larvae</i> ".
MAGUK	" <i>Membrane associated guanylate kinase</i> ".
NTPs	Ribonucleótidos trifosfato.
PAF	Fijador de paraformaldehído al 4%.
pb	Pares de bases.



SIGLA	SIGNIFICADO
PBS	Tampón fosfato salino.
PBTG	Amortiguador fosfato de sodio, Triton X-100 0,3%, suero de cabra 5%.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDZ	<u>P</u> SD-95, <u>D</u> iscs large y <u>Z</u> O-1.
PLP	Solución fijadora.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PSD	Proteína de la densidad postsináptica.
PT	Amortiguador fosfato de sodio, Triton X-100 0,3%.
PTw	PBS 1x + Tween 20 al 0,1%.
Ripa	Amortiguador de homogeneización.
RNA	ácido ribonucleico.
RT-PCR	Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa.
SAP	" <i><u>S</u>inapsis <u>a</u>ssociated <u>p</u>rotein".</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SH3	Dominio de homología src tipo 3.
SM	Surco morfogenético.
UAS	" <i><u>U</u>pstream <u>a</u>ctivation <u>s</u>equence".</i>
Wor	" <i><u>W</u>hite <u>o</u>regon".</i>

## RESUMEN

El gen *discs-large (dlg)* de *Drosophila melanogaster* codifica para más de una proteína andamio de la familia MAGUK ("*m*embrane *a*ssociated *g*uanilate *k*inase"), las cuales reclutan a través de sus dominios de interacción proteína-proteína, receptores, canales iónicos, componentes de cascadas de transducción de señales y proteínas del citoesqueleto en complejos multiproteicos asociados a membrana.

A Dlg se le atribuyen funciones como supresora de tumores, mantención de la adhesión y polaridad celular en tejido embrionario y adulto, desarrollo y función correcta de la sinapsis neuromuscular y localización de determinantes de destino neural durante la división asimétrica de precursores neurales.

Los estudios realizados previamente han atribuido todas estas funciones a un único producto del locus *dlg*: DlgA. En nuestro laboratorio se aislaron una serie de transcritos que corresponden a variantes de procesamiento alternativo del gen *dlg*, los que presentan en su extremo 5' una región que codifica un segmento de 65 aminoácidos, llamado S97N y que está ausente en DlgA. Las variantes con este dominio sólo se expresan en el sistema nervioso y en músculo, a diferencia de DlgA que también se expresa en células epiteliales. En estudios realizados en el laboratorio se observaron defectos severos en la neurogénesis del sistema nervioso periférico y central en el embrión, al inhibir la expresión de proteínas que contienen el dominio S97N. Considerando lo anterior y dado que se observó la presencia del dominio S97N en los discos imaginales de ojo, un buen modelo de estudio de la neurogénesis, es el ojo compuesto de *Drosophila*, puesto que defectos pequeños en el patrón de diferenciación son detectables fácilmente en este órgano que presenta un ordenamiento repetitivo y geométrico, permitiendo así analizar fenotipos severos que afecten la neurogénesis sin ser letales para el organismo.

Los resultados obtenidos muestran que las variantes que contiene el dominio S97N se expresan específicamente en neuronas fotorreceptoras durante el desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila*, localizándose a nivel basal a las uniones adherentes en larva L3', retinas tempranas y tardías.y a nivel axonal en estadios pupales. El análisis mediante western blot indica la presencia en discos imaginales de ojo de una variante de *dlg* que contiene el dominio S97N, la cual corresponde a ~ 116 kDa.

La expresión de un RNAi contra el dominio S97N resulta en la disminución de la expresión de la variante que contiene el dominio S97N en discos de ojo y pupas tardías. No se observaron alteraciones aparentes en el tercer estadio larval, sin embargo en pupas de 67% dp la disminución de los niveles de DlgS97 conduce a una deslocalización de los dominios PDZs. La sobreexpresión de la proteína DlgS97N resulta en la localización ectópica de la proteína en discos de ojo y pupas. Se visualiza su expresión en las células precursoras interomatidiales (CPI) y en los axones de L3, no observándose cambios notorios en su morfología. En pupas se detectaron defectos en la membrana apical de los omatidios.

## SUMMARY

### Involvement of the *dlg* gene (*discs-large*) in eye development of *Drosophila melanogaster*.

The discs-large gene (*dlg*) of *Drosophila* codifies for more than one scaffold protein of the MAGUK family ("*m*embrane *a*ssociated *g*uanilate *k*inase"), which recruits membrane receptors, ionic channels, components of signal transduction pathways and cytoskeletal proteins through its domains of protein-protein interaction to form multiprotein complexes associated to the cell membrane.

Diverse functions have been attributed to the Dlg protein: it is a tumor suppressor gene, it participates in the maintenance of cellular adhesion and cellular polarity both in adult and embryonic tissues, it is involved in the development and correct function of the neuromuscular synapse, as well as in the localization of neural fate determinants during the asymmetric division of neural precursors.

Previous studies have attributed all these functions to the one known product of the *dlg* locus: DlgA. In our laboratory several transcripts were isolated that correspond to alternative processing variants of the *dlg* gene. These splice variants code for a 65 amino acids segment in its 5' end, named S97N, that is absent in DlgA. The variants that contain this domain are expressed exclusively in the nervous system and in muscle, unlike DlgA which is also expressed in epithelial cells. Studies in our laboratory showed that inhibition of expression of proteins containing S97N results in severe defects in neurogenesis of the peripheral and central nervous system in embryos. Considering the presence of the S97N domain in imaginal discs of eyes and the experiments described previously, we considered that the compound eye of *Drosophila* is a good model for the study of neurogenesis, since small defects in the differentiation pattern are easily detected in this organ. The repetitive and geometric organization of

the compound eye, allow the analysis of severe phenotypes that affect neurogenesis without affecting the viability or survival of the organism. Our results show that the variants that contains the S97N domain are expressed specifically in photoreceptor neurons during the development of the compound eye of *Drosophila*, and are located at the basal side of the adherent junctions in third instar larvae (L3) and at basolateral and axonal regions in early and late retinas. Western blot analysis indicates the presence of an eye disc variant of *dlg* of approximately 116 KDa that contains the S97N domain.

The expression of an RNAi against the S97N domain results in a decreased expression of this variant in eye discs and late pupas. We did not observe alterations in third instar stage, nevertheless in pupas of 67% dp the decrease of DlgS97 levels leads to the delocalization of the PDZs domains. Miss-expression of the DlgS97N protein results in ectopic localization of the protein in eye discs and pupas. Detecting expression in the CPI and axons of third instar larvae was detected, but no changes were observed in their morphology. In pupas, defects were detected in the apical membrane of ommatidia.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Proteínas de andamio

Las proteínas de andamio permiten que complejos proteicos específicos se ensamblen en regiones particulares de la célula donde son necesarios para la transducción de señales o para definir dominios subcelulares. Esta característica es especialmente importante para neuronas y células epiteliales que son células altamente polarizadas. Las proteínas de andamio presentan varios dominios modulares de interacción proteína-proteína (Sheng y Sala, 2001). Entre éstos, los dominios PDZ (cuyo nombre proviene de la abreviación de las tres proteínas donde primero se identificaron: PSD-95, Discs large y ZO-1) son de especial relevancia, ya que poseen la capacidad de unirse al extremo carboxilo terminal de proteínas de membrana, permitiendo que éstas sean localizadas en regiones particulares de la célula a través de la unión al citoesqueleto. Muchas proteínas que contienen dominios PDZ están involucradas en la generación y mantención de la polaridad en células epiteliales y en el establecimiento de complejos de transducción en dominios particulares de la membrana, que incluyen la sinapsis (Bilder, 2001).

La familia de proteínas andamio MAGUK ("*membrane associated guanylate kinase*"), ha sido descrita en vertebrados, nemátodos y moscas. Los miembros de esta familia comparten una estructura básica consistente en uno a tres dominios PDZ, un dominio de homología src tipo 3 (SH3) y un dominio homólogo a guanilato quinasa (GUK) (Pawson y Scott, 1997; Sheng y Sala, 2001).

## 1.2. El gen *dlg*

Entre los genes que pertenecen a la familia de las MAGUK en *Drosophila* se encuentra *dlg*, este gen se identificó como el único homólogo de los genes de la subfamilia PSD95/SAP90 cuyos productos pertenecen a la familia de proteínas MAGUK de mamífero asociada a sinapsis (SAP) o presentes en la densidad

postsináptica (PSD) (Woods y Bryant, 1991). *dlg* fue identificado como un gen supresor de tumores en *Drosophila*, puesto que sus mutantes presentan un crecimiento neoplásico del epitelio en los discos imaginales de la larva, tejidos que originan las distintas estructuras en el adulto (Woods y Bryant, 1989). Las mutaciones de *dlg* son letales; los portadores de alelos más severos mueren durante la etapa larval, mientras que los menos severos mueren en estadios tardíos de pupa. Junto con esto, los mutantes de *dlg* presentan defectos en el desarrollo neural, de los cuales el mejor estudiado es la alteración estructural y funcional de la sinapsis neuromuscular de la larva (Budnik y cols., 1996).

El análisis de la expresión de los transcritos y de las proteínas codificadas por el locus *dlg* mediante northern y western blot, ha mostrado la existencia de varios productos del gen *dlg* en larva y mosca adulta (Woods y Bryant, 1989; Woods y cols., 1996). A pesar de esto, la variante más caracterizada es la proteína Dlg-A, que se compone (desde el extremo amino terminal) de tres dominios PDZ, un dominio SH3, un dominio HOOK y un dominio guanilato quinasa (GUK) (Woods y Bryant, 1991).

### **1.3. Funciones de Dlg**

Una de las funciones de *dlg* mejor caracterizada es el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales, donde forma parte integral de la estructura de las uniones septadas (equivalentes a las uniones estrechas de vertebrados), siendo crucial su expresión para la estabilidad de dichas uniones y para la localización de otras proteínas en la membrana (Woods y cols., 1996; Bilder y Perrimon, 2000). Se ha encontrado que cada uno de los dominios de Dlg-A tiene un papel específico en la destinación y localización de la proteína en el dominio de membrana definido por las uniones septadas (Hough y cols., 1997). Los individuos mutantes además de presentar un crecimiento neoplásico de los discos imaginales, tienen defectos en la adhesión celular, en la localización diferencial de proteínas de membrana y presentan pérdida de la polaridad apico-

basal de las células epiteliales. En los tejidos epiteliales se ha descrito la existencia de un complejo formado por Dlg, Scribble (otra proteína con dominios PDZ) y Lgl ("*Lethal giant larvae*", proteína supresora de tumores) en la que cada componente participa de manera cooperativa en la mantención de la polaridad epitelial (Tepass y cols., 2001; Bilder y Perrimon, 2000).

Los estudios de la función de *dlg* en neuronas se han centrado en el papel que juega en la organización y función de la sinapsis neuromuscular en la larva. Dlg se expresa tanto a nivel presináptico como postsináptico en las sinapsis tipo I (glutamatérgicas) y participa en la organización del retículo subsináptico y en la determinación de la cantidad de neurotransmisor liberado (Budnik y cols., 1996). Dlg es fundamental también para la localización sináptica del canal de K<sup>+</sup> tipo Shaker (Tejedor y cols., 1997) y la molécula de adhesión celular Fasciclina II (Fas II). Se ha propuesto que Dlg participa en cambios plásticos de la estructura sináptica asociados al desarrollo (Koh y cols., 1999). Mutantes de *dlg* donde se ha eliminado el 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).

Algunos estudios han señalado la participación de *dlg* en el establecimiento de las divisiones asimétricas en precursores neuronales (Peng y cols., 2000).

#### **1.4. El dominio S97N de las variantes del gen *dlg***

Investigaciones previas del laboratorio mediante el análisis de cDNAs completos obtenido de ESTs y de RT-PCR, han revelado la existencia de una serie de variantes de procesamiento del gen *dlg* (Mendoza y cols., 2003), algunas de las cuales presentan cuatro exones en el extremo 5', ausentes en Dlg-A, que codifican para un segmento que contiene un fragmento de 65 aminoácidos, altamente homólogo al extremo amino terminal característico de SAP97 (rata), DLG-1(*C. elegans*) y hDlg (humano) (Figura 1). Se ha denominado a este dominio, S97N (Wu y cols., 1998).



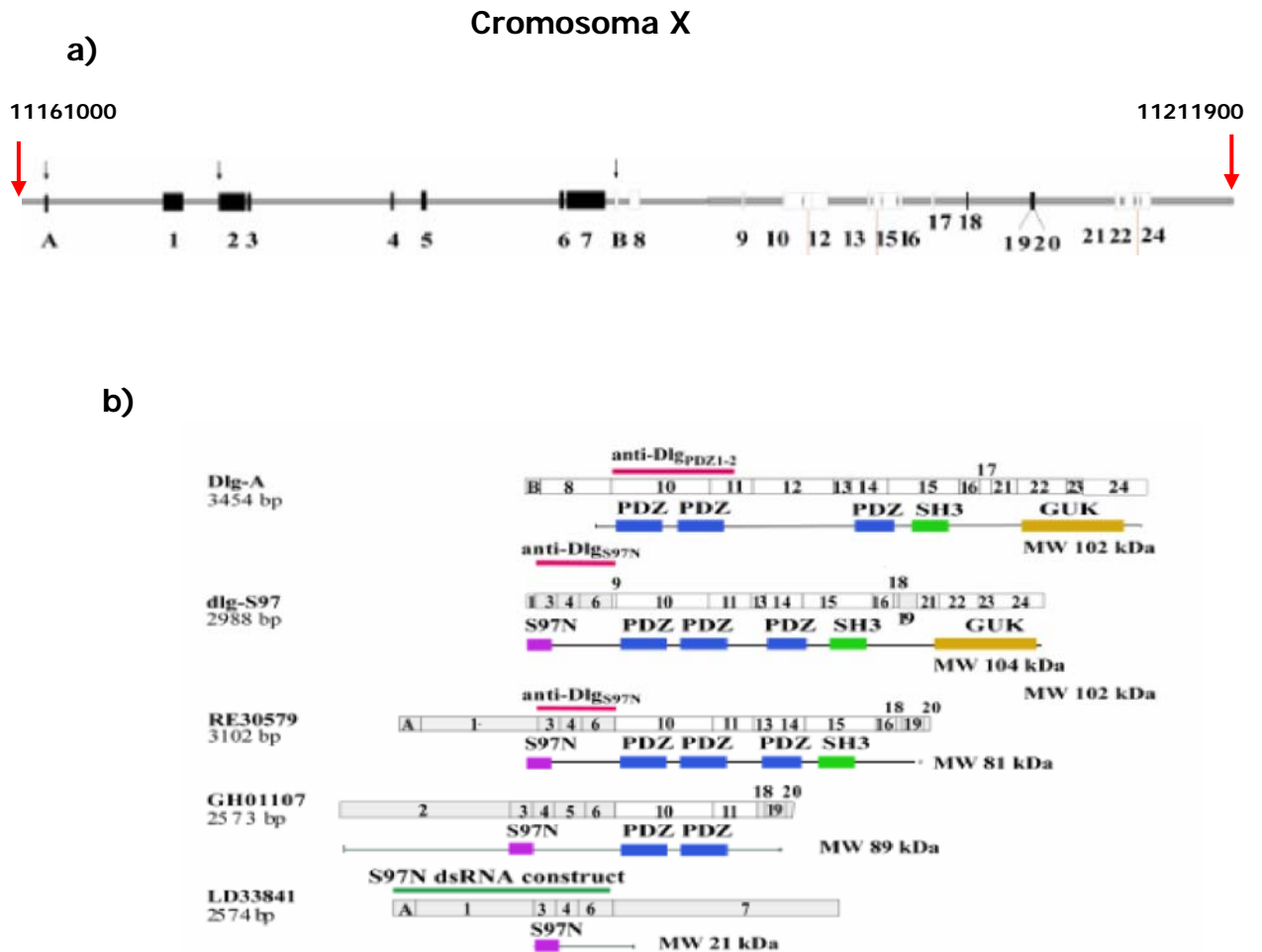


Fig. 1. Variantes originadas del locus *dlg*.

**a). Estructura genómica de *dlg*.** Las cajas negras indican los exones ausentes en el transcrito DlgA. Las flechas verticales negras marcan las supuestas posiciones de los sitios de inicio de la transcripción deducidos de los 5' terminal de varios grupos de clones EST y cDNA.

**b). Composición de los transcritos de *dlg* aislados, incluyendo DlgA.** Cada caja enumerada representa un exón traducido, mientras que las cajas con letras muestran los exones no traducidos. Las cajas sombreadas indican las secuencias nuevas que están ausentes en el transcrito DlgA. Las barras rosadas indican la región del cDNA utilizada para la generación de los anticuerpos anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (Koh y cols., 1999) y anti-Dlg<sub>S97N</sub>. Debajo de cada transcrito se indica la estructura de la proteína deducida y su masa molecular (MW) calculada. La barra verde indica la región contra la cual se diseñó el RNAi para el dominio S97N.

Recientemente el dominio N-terminal de SAP97 fue identificado como un dominio L27 (Chetkovich y cols., 2002), el que se caracteriza por ser un dominio de interacción para homo o heteromultimerización. Esto sugiere la posible multimerización de productos del gen *dlg* con dominio S97N. El dominio L27 en mamíferos ha sido estudiado en epitelios en donde se ha demostrado que es necesario para la unión de SAP97 al citoesqueleto cortical de actina y para su ubicación en la membrana lateral en líneas celulares epiteliales en cultivo (Wu y cols., 1998). También se ha mostrado que este dominio modula la asociación de SAP97 con una de sus proteínas asociadas, GKAP (Wu y cols., 2000). La interacción de SAP97 con la membrana lateral es mediada por su interacción con el dominio L27 de Lin-2/Cask (Lee y cols., 2002). Un papel adicional del dominio L27 parece ser la oligomerización de las proteínas que lo contienen en células de cultivo (Marfatia y cols., 2000). El papel de este dominio en las proteínas expresadas en neuronas se desconoce.

Por medio de un anticuerpo generado en el laboratorio contra el dominio S97N (anti-Dlg<sub>S97N</sub>) de *Drosophila* se ha determinado que las proteínas que poseen este dominio se expresan exclusivamente en tejido nervioso y muscular (Mendoza y cols., 2003), al igual que en discos imaginales de ojo (J. Sierralta, datos no publicados), en contraste con la expresión de Dlg-A que se expresa especialmente en las uniones septadas del epitelio.

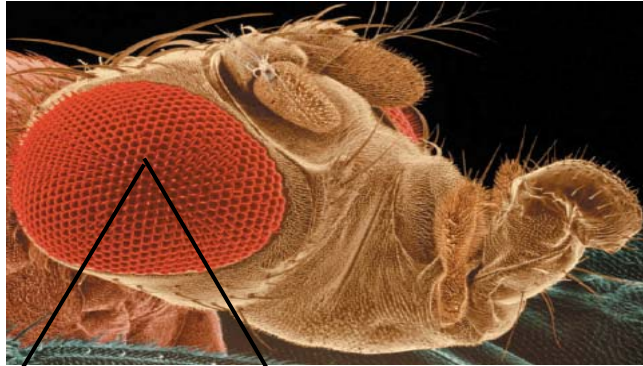
Experimentos de pérdida de función de las variantes de procesamiento de *dlg* que contienen el dominio S97N indican que S97N participa en la neurogénesis embrionaria (Mendoza y cols., 2003), ya que al interferir con la expresión del dominio S97N a través de la inyección de RNA de doble hebra (dsRNA) dirigido contra el dominio S97N (técnica de RNA de interferencia) se observan defectos graves en el desarrollo neural, que afecta desde la morfogénesis del tejido a la navegación axonal. Sin embargo, no se afecta la organización epitelial y la localización polarizada de determinantes moleculares durante la división asimétrica de los neuroblastos.

## 1.5. El ojo compuesto de *Drosophila* como modelo de estudio

El ojo compuesto de *Drosophila* es un muy buen modelo de neurogénesis, ya que defectos pequeños en el patrón de diferenciación son detectables fácilmente en este órgano que presenta un ordenamiento repetitivo y geométrico, lo que permite el análisis de fenotipos severos que afecten la neurogénesis sin ser letales para el organismo.

El ojo de la mosca adulta se compone de aproximadamente 800 subunidades sensibles a la luz llamados omatidios (Figura 2 a), los cuales están dispuestos en un patrón hexagonal. Cada omatidio está compuesto por 8 células fotorreceptoras (CF) y 11 células accesorias. Las células accesorias corresponden a 4 células con las cuales producen una secreción extracelular llamado el lente corneal (cornea) y el pseudocono (que aparece tardíamente en la vida pupal), tres tipos de células de pigmento (1°, 2° y 3°) y las células que agrupan las quetas (pelos sensores). Las CF se pueden clasificar en dos subtipos: seis CF periféricas (R1-R6) rodeando a dos CF centrales (R7 y R8). Los R1-R6 equivalen a los homólogos funcionales de los bastones en vertebrados, expresan un solo tipo de rodopsina (Rh1) y se encuentran involucrados en la detección de movimiento y la visión nocturna. Tienen un rabdómero (estructura fotosensible donde se acumula la rodopsina) de mayor longitud, el cual recorre por entero la profundidad de la retina. R7 y R8 son los homólogos funcionales de los conos, tienen pequeños rabdómeros, recorriendo la mitad de la retina, y se localizan uno arriba del otro (R7 sobre R8 del eje distal-proximal). Estos rabdómeros expresan más de un tipo de rodopsina, tales como Rh3, Rh4, Rh5 y Rh6 y se relacionan con la discriminación del color y la visión diurna (Figura 2 b) (Bate y Martínez, 1993).

a)



b)

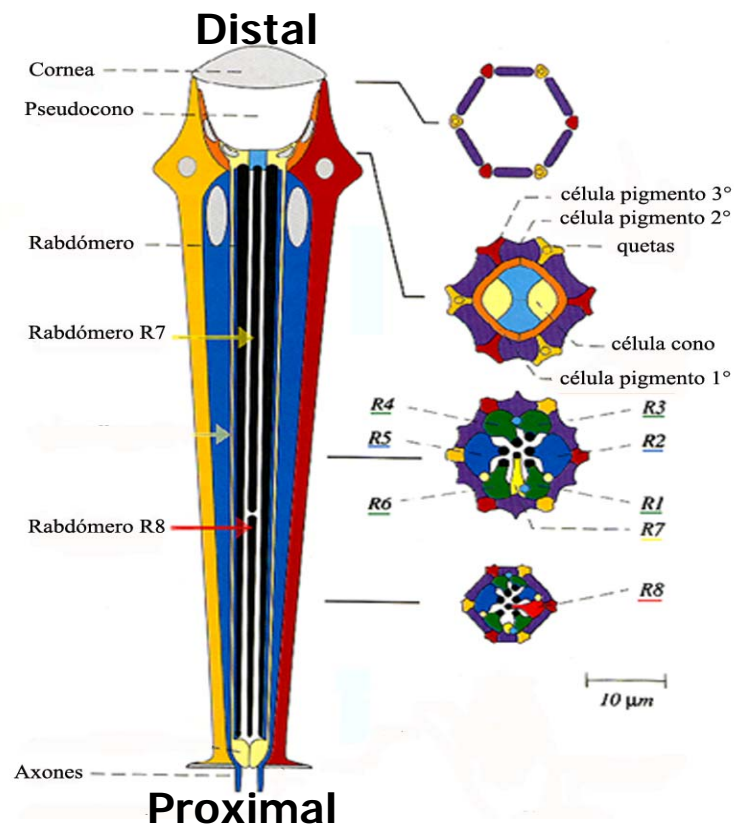


Fig. 2. Diagrama de un ommatidio.

a) Ojo de *Drosophila*. Compuesto de aproximadamente 800 ommatidios. b) Esquema de un ommatidio. De distal a proximal se ubican la cornea y el pseudocono los que son secretados por las células cono, que se encuentran inmediatamente por debajo de estos, las células de pigmento (1°, 2° y 3°), las quetas mecanosensoras, y los fotorreceptores (R1-R8). El R7 se encuentra en un plano más distal que el R8.

## 1.6. Desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila*

El desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila* se inicia en los estadios tardíos de la embriogénesis donde dos grupos de aproximadamente 70 células se invaginan desde la región dorsal del embrión para formar dos sacos epiteliales planos, los cuales durante los periodos larvares darán origen al disco imaginal del ojo-antena (Figura 3 a). La diferenciación de los fotorreceptores se inicia en etapas tempranas del tercer estadio larval, en la región posterior del primordio del ojo. La diferenciación de la retina progresa en sentido anterior en forma de onda, dejando a su paso grupos de fotorreceptores en diferenciación. El frente de esta onda es definido por una depresión del epitelio del disco, que se ha denominado surco morfogenético (SM) (Figura 3 a). Mediante movimientos morfogenéticos el surco avanzará hacia la región anterior del disco imaginal, formando hacia los lados dorsal y ventral columnas de grupos celulares que darán origen a los omatidios del ojo adulto (Figura 2 a).

Durante el tercer estadio larval los fotorreceptores se disponen con una orientación apico-basal semejante al del epitelio indiferenciado (Figura 3 b). Posteriormente durante el desarrollo pupal (dp), cada fotorreceptor gira hacia el interior de la unidad omatídica en 90 grados, quedando el dominio apical hacia el centro y el basal hacia la periferia (Figura 3 c). Finalmente el dominio apical se diferencia subdividiéndose desde apical hacia basal en el rabdómero (dominio donde ocurre la fototransducción), y tallo del rabdómero (Figura 3 d) (Bate y Martínez, 1993).

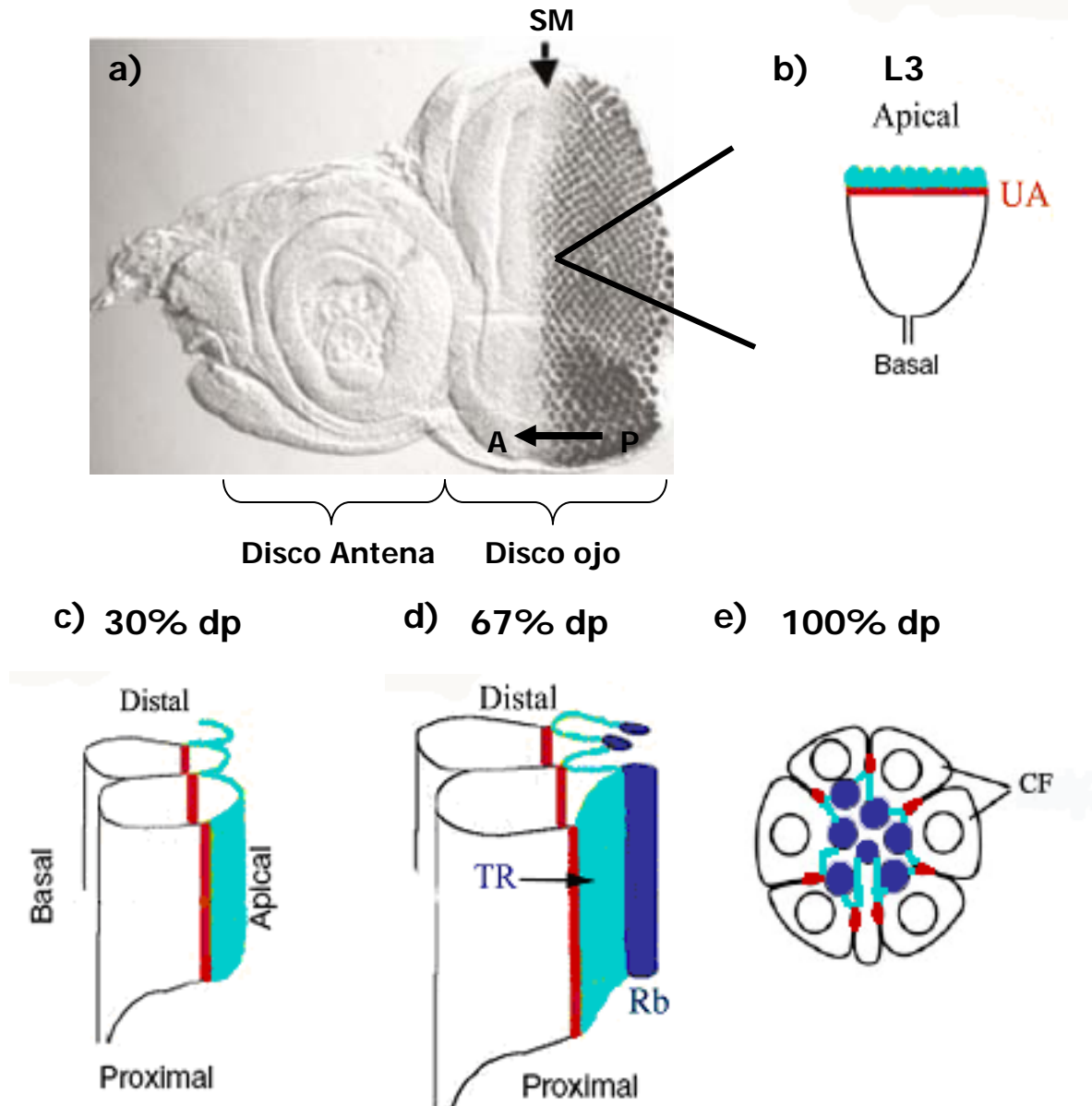


Fig. 3. Etapas en el desarrollo del ojo de *Drosophila*.

**a) Disco imaginal de ojo y de antena tercer estadio larval (L3).** Disco de ojo marcado en la zona posterior al SM, en células fotorreceptoras del epitelio diferenciado. La posición del SM esta indicado con la flecha negra. En este punto el SM ha atravesado aproximadamente la mitad del disco, avanzando de posterior (P) a anterior (A) en la ola de diferenciación.

**b)-d) Diagrama de un corte longitudinal de fotorreceptores. dp: desarrollo pupal. b) Disposición de un fotorreceptor L3.** Dominio apical en celeste y uniones adherentes (UA) en rojo. **c) ~30% dp.** Etapa en que comienzan a rotar los fotorreceptores, ubicándose apical hacia el centro y basal hacia la periferia del cluster. **d) ~67% dp.** Subdivisión del dominio apical a tallo del rabdómero (TR) en celeste y Rabdómero (RB) en azul. **e) ~100% dp.** Diagrama de un corte tangencial de un omatidio adulto. A ← P: eje antero-posterior del ojo.

Las gradientes de morfógenos en sentido antero-posterior y dorso-ventral son importantes para decidir la geometría del ojo adulto, tanto en cada omatidio como en el ojo entero. La capacidad de responder a morfógenos que presentan gradientes de concentración en forma diferencial depende de la capacidad de una célula de discriminar entre las señales que provienen de diferentes dominios celulares. En este modelo esto es muy importante, puesto que los movimientos celulares no sólo son en sentido antero-posterior sino que también apico-basal, pues los núcleos de las células fotorreceptoras se movilizan para permitir que las células cono cubran la zona distal para formar el lente y que las células R7 y R8 se ubiquen una encima de la otra, sugiriendo que podrían existir dominios celulares definidos en células precursoras. Estos dominios celulares son generados por la expresión diferencial de proteínas. Es reconocido el rol de Dlg en la definición de un dominio basolateral en el epitelio embrionario y en la sinapsis neuromuscular de la larva.

### **1.7. Hipótesis**

Teniendo presente estos antecedentes y dado que se observó la presencia del dominio S97N en los discos imaginales de ojo, se propone la siguiente hipótesis:

***“Los productos del gen *dlg* que contienen el dominio S97N participan en el desarrollo de los fotorreceptores en el ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*”.***

El objetivo de esta tesis es determinar el patrón de expresión de los productos del gen *dlg* con dominio S97N y estudiar la participación de estos productos en el desarrollo y función del ojo compuesto de *Drosophila* mediante experimentos de ganancia y pérdida de función selectivos y en etapas del desarrollo definidas. Para ello se utilizará líneas de moscas transgénicas que expresan RNA de doble hebra contra el dominio S97N (pérdida de función) y otras que expresen DlgS97-EGFP (ganancia de función) en los fotorreceptores.

## 1.8. Objetivo General

Determinar el papel de los productos de gen *dlg* que contienen el dominio S97N en el desarrollo de los fotorreceptores del ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*.

## 1.9. Objetivos Específicos

1. Identificar la(s) variante(s) del gen *dlg* que se expresa(n) en discos imaginales de ojo de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar el patrón de expresión de las isoformas que expresan el dominio S97N durante el desarrollo del ojo en moscas de tercer estadio larval, pupas tempranas y tardías.
3. Analizar los efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en el desarrollo del ojo de *Drosophila melanogaster*, mediante líneas de moscas transgénicas que expresan DlgS97-EGFP en los fotorreceptores.
4. Analizar los efectos de la inhibición de la expresión de las variantes del gen *dlg* que contienen el dominio S97N en el desarrollo del ojo de *Drosophila melanogaster*, mediante líneas de moscas transgénicas que expresan un RNA interferente contra el dominio S97N en los fotorreceptores.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Animales

Se utilizaron moscas *Drosophila melanogaster* adultas, larvas de tercer estadio (L3) y pupas tempranas y tardías (Figura 4) de la cepa pseudo-nativa WOR (*white oregon*) y cepas transgénicas (Tabla N°2).

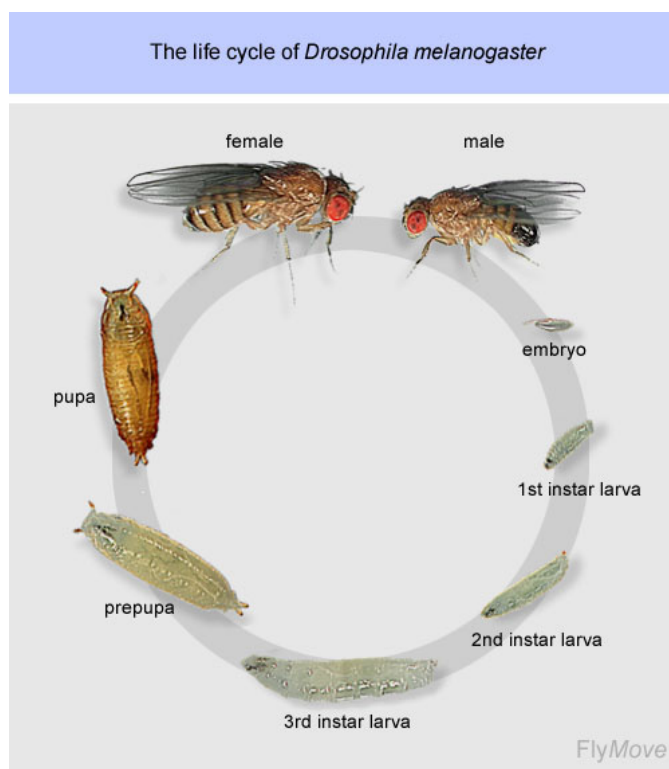


Fig. 4. Esquema del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.  
Etapas del desarrollo desde el embrión hasta la mosca adulta.

#### 2.1.1. Mantención cepas *Drosophila melanogaster*.

Las cepas pseudo nativas y transgénicas fueron mantenidas a 18°C en viales o botellas con medio de cultivo preparado en base a levadura fresca, glucosa, harina y agar. Los experimentos fueron realizados a 25°C.

### 2.1.2. Cepas transgénicas

La cepa transgénica GAL4 utilizada fue Glass multiple reporter- GAL4 (GAL4-GMR) que expresa GAL4 en el disco imaginal de ojo en células que se encuentran posteriores al surco morfogenético. Las cepas UAS utilizadas fueron UAS-S97N-RNAi y UAS-EGFP-DlgS97.

Tabla 2. Cepas transgénicas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en esta tesis.

Nombre	Genotipo	Origen	Experimento
<b>Cepas UAS</b>			
UAS-EGFP-DlgS97		Gentileza U. Thomas, Federal Institute for Neurobiology , Magdeburg	Expresión dlgS97
UAS-S97N-RNAi		Gentileza U. Thomas, Federal Institute for Neurobiology , Magdeburg	RNAi S97N
<b>Cepas GAL4</b>			
Gal4-GMR		Gentileza C.Q.Doe, Institute of Neuroscience University of Oregon, Oregon.	Expresión GAL4 en células posteriores al surco morfogenético

## 2.2. Reactivos y soluciones

### Inmunohistoquímica:

- Paraformaldehido (PAF) (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).
- Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).
- Suero de cabra (GIBCO BRL, MD, California, EE.UU).
- Cloruro de amonio (Merck, Darmstadt, Alemania).

- Amortiguador fosfato de sodio 0,1 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M,  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,2).
- PT: Amortiguador fosfato de sodio, Triton X-100 0,3%.
- PBTG: Amortiguador fosfato de sodio, Triton X-100 0,3%, suero de cabra 5%.
- Solución fijadora PLP (PAF 2%,  $\text{NaIO}_4$  0,01 M, lisina 0,075 M, Amortiguador fosfato de sodio 0,037 M pH 7,2).
- Elastomero de silicona Sylgard 184, para placas de disección de larvas y pupas (Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, EE.UU).
- Pinzas N°5 (Detmoxel no magnéticas).
- Tijeras quirúrgicas.
- Alambres de tungsteno.
- Medio de montaje para fluorescencia Vecta Shield (Vector Lab, Burlingame, California, EE.UU).
- Faloidina conjugada con rodamina (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU).

#### **Western blot:**

- Acrilamida (Winkler, Santiago, Chile).
- Amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 80 mM, SDS 1,7 mM, pH 8,3).
- Amortiguador de muestra 6x (SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol).
- Amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037%, metanol 20%).
- Bis-acrilamida (Winkler, Santiago, Chile).

- Membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, California, EE.UU).
- Metanol técnico (TCL, Santiago, Chile).
- PBS 1X ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,7 mM, NaCl 200 mM, pH 7,4).
- Estándar de peso molecular de proteínas preteñido, rango amplio 6-175 kDa (Bio Labs, Ipswich, Massachussets, EE.UU).
- Placas fotográficas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra).
- PBStw (Tween 20 0,5% (v/v) en PBS 1X).
- Solución de bloqueo: leche descremada en polvo 5%, Tween-20 0,05% en PBS 1X
- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Illinois, EE.UU).
- TEMED (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).
- APS (persulfato de amonio) (Gibco BRL, MD, California, EE.UU).
- Líquido revelador y fijador (Kodak, Brasil).

### **Reactivos para la obtención de extractos de disco imaginal**

- Amortiguador de homogeneización (Ripa): NaCl 150 mM, NP 40 0,5%, desoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, Tris HCl 20 Mm pH 7,5, PMSF 0,5 Mm, leupeptina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pepstatina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Inhibidores de proteasas: Pepstatina A, Aprotinina, Leupeptina. (AppliChem, Darmstadt, Alemania).

- Homogeneizadores de vidrio (Kontes Glass Company, Vineland, New Jersey, EE.UU).

### **Biología molecular**

- Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Alcohol isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
- DEPC, dietilpirocarbonato (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).
- Oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- dNTPs, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Boehringer, Mannheim, Alemania).
- Amortiguador First Strand (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- DTT, Ditiotretitol (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU).
- RNase OUT (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, California EE.UU).
- RNAsa H (Biolabs, Ipswich, Massachussets, EE.UU).
- Amortiguador de PCR 10x sin magnesio (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- MgCl<sub>2</sub> 50Mm. (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- DNA polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- Agarosa ultrapura (Fisher Scientific, New Jersey, EE.UU).
- Bromuro de etidio (GIBCO BRL, MD, California, EE.UU).
- Aceite mineral (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).

- 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- Amortiguador de electroforesis TAE 1X (Tris-acetato/EDTA): tris-acetato

### **Sistemas Comerciales:**

- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Standford, EE.UU.), utilizado para purificar plasmidios de bacterias.

### **Anticuerpos**

#### *Anticuerpos primarios:*

- Anti-Dlg<sub>S97N</sub>, anticuerpo policlonal de conejo generado en el laboratorio contra el producto de la secuencia de 410 pb desde el ATG del clon EST LP07807 (Mendoza y cols, 2003).
- Anti- Dlg<sub>PDZ1-2</sub>, anti- $\alpha$ -Tubulina, anti-Armadillo (homólogo a  $\beta$ -catenina en *Drosophila*), anti-Crumbs, anti-Fasciclina II, anti-Elav, anticuerpos monoclonales de ratón (Hybridoma Bank, Iowa city, Iowa, EE.UU).

#### *Anticuerpos secundarios:*

- Anti-IgG (H+L) de ratón y conejo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.).
- Anti-IgG (H+L) de ratón Alexa Fluor 546 y 633 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.).
- Anti-IgG de conejo Cy3 (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, Pensilvania, EE.UU).
- Anti-IgG (H+L) de conejo y ratón acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, Pensilvania, EE.UU).

### 2.3. Métodos

**Construcción del sistema de regulación de la expresión de *dlg* mediante el sistema UAS-GAL4:** Se utilizó el sistema de expresión UAS-GAL4 para producir la sobreexpresión o expresión ectópica de la variante *dlg*S97 o la inhibición por medio de un RNAi dirigido contra las variantes con dominio S97N. 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 encuentra bajo el control de la secuencia UAS, y una cepa "guía", en la que GAL4 se encuentra bajo el control de un promotor determinado o un enhancer que dirige su expresión de manera tejido-específica. La progenie de la cruce de moscas homocigotas para estos transgenes que interesa, posee tanto el factor transcripcional como su secuencia de unión, la cual en este trabajo corresponde a una secuencia dirigida contra el dominio S97N (RNAi) o a una secuencia que exprese la proteína *Dlg*S97 unida a EGFP (proteína fluorescente verde) (Figura 5) y de esta manera se activa la expresión río abajo del UAS en el tejido y en el periodo del desarrollo donde se exprese GAL4, que en el caso particular es en las células que se encuentran posteriores al surco morfogenético. La eficacia de este sistema es dependiente de la temperatura, siendo baja a 18°C, intermedia a 25°C y máxima a 29°C. En este caso todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C.

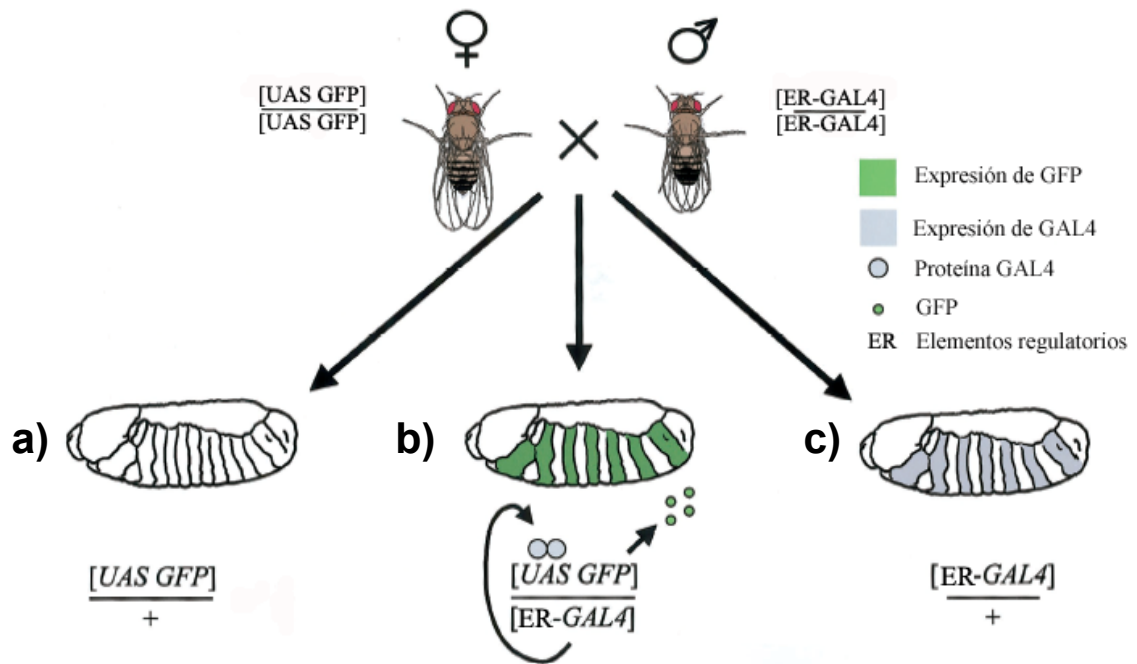


Fig. 5. Esquema del sistema UAS-GAL4 en *Drosophila*.

Las moscas hembras que llevan la secuencia UAS son cruzadas con machos que llevan el factor transcripcional GAL4, obteniéndose tres posibilidades de la F1: una que sólo lleva la secuencia UAS (a), otra que sólo lleva el factor transcripcional GAL4 (c) y la que posee tanto el factor transcripcional GAL4 como su secuencia de unión UAS (b), la cual corresponde a la progenie que activa la expresión río abajo del UAS en el tejido y en el periodo del desarrollo donde se exprese GAL4.

**Inmunohistoquímica.** Se colectaron sólo las larvas que suben por las paredes del vial sin espiráculos visibles, las cuales corresponden a L3. En el caso de retinas pupales se colectaron pupas blancas (0 horas de desarrollo pupal (dp)) las que fueron mantenidas a 25 °C hasta la edad deseada para la disección. Se utilizaron para cada inmunohistoquímica aproximadamente 15 larvas o pupas.

**Disección de discos imaginales de ojo-antena.** Los discos imaginales se obtuvieron de larvas de tercer estadio las cuales fueron disectadas en placas de Petri de 60 mm cubiertas con elastómero de silicona Sylgard 184, que contenían amortiguador fosfato de sodio pH 7,2 en hielo. Utilizando pinzas y agujas de tungsteno los discos ojo-antena se desprendieron del resto de la larva, mediante la tracción de la mandíbula (estructura a la que se encuentran unidos en este



estadio), a la cual quedan unidos y que facilita su posterior manipulación. Los discos así dispuestos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar el tejido 3 veces durante 15 minutos con PT, los discos se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla N°3) diluido en PBTG a 4°C toda la noche. Luego se lavó 3 veces durante 10 minutos con PT y se incubó 2 horas con el anticuerpo secundario (Tabla N°3) a temperatura ambiente. Finalmente se realizó el último lavado y los discos se montaron sin la mandíbula en medio de montaje (vecta shield) sobre un portaobjeto. Las muestras se guardaron a -20°C para su posterior análisis (Sullivan y cols., 2000).

**Disección de retinas tempranas.** La selección de las pupas se realizó bajo el criterio del porcentaje de tiempo de desarrollo pupal (dp), el cual se determina a partir del momento en que se inicia la pupación (prepupa) hasta la eclosión (momento en que la mosca sale del pupario), lo cual corresponde a aproximadamente 120 horas a 25°C. Se disectó pupas en un 30% dp (35 horas aproximadamente) en placas con elastómero de silicona Sylgard 184, a las que se les desprendió su cutícula por medio de pinzas. Luego se decapitaron con tijeras quirúrgicas y sólo se seleccionaron los discos unidos al cerebro. Se fijaron con PAF al 4% durante 40 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PT, para después preincubar con PBTG 30 minutos. Posteriormente los discos se incubaron como se describió anteriormente (Sullivan y cols., 2000).

**Disección de retinas tardías.** Se disectaron retinas de pupas tardías (67% dp, 64 horas aproximadamente), las cuales fueron decapitadas de la misma forma que las retinas tempranas y las córneas fueron removidas con alambres de tungsteno. Las retinas fueron fijadas con PLP durante 30 minutos en hielo. Luego se lavaron 2 veces con cloruro de amonio 50 mM durante 20 minutos, seguido de otros dos lavados con PT y se preincubaron posteriormente 30 minutos con PBTG. La incubación con los anticuerpos es la misma descrita anteriormente (Sullivan y cols., 2000).

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para experimentos de inmunofluorescencia y sus correspondientes anticuerpos secundarios.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario Fluorescente	Dilución
Anti-Dlg <sub>S97N</sub> (purificado)	1/100	Alexa Fluor 488/ Cy3	1/500
Anti-Dlg <sub>PDZ</sub>	1/500	Alexa Fluor 546	1/200
Anti- Fas II	1/5	Alexa Fluor 546	1/500
Anti-Armadillo	1/200	Alexa Fluor 546	1/500
Anti-Elav	1/10	Alexa Fluor 546	1/500
Anti-Crumbs	1/20	Alexa Fluor 546	1/500

**Microscopía confocal de fluorescencia.** La microscopía confocal de fluorescencia se realizó con un microscopio Zeiss LSM Meta 510. Las imágenes se procesaron con el programa Photoshop cs versión 8.0.

**Preparación de extractos de cerebro, pared muscular y discos imaginales de ojo y de ala.** Las larvas de tercer estadio se colectaron de las botellas de crianza y se disectaron separando el cerebro, la pared muscular y los discos imaginales de ojo y de ala, los cuales se colectaron por separado en homogeneizadores de vidrio que contenían 50 µl de amortiguador Ripa y se homogeneizaron sobre hielo. Posteriormente se centrifugó cada extracto a 3000 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos a 4°C. Se separaron alícuotas de 2 µl del extracto para realizar el análisis de cuantificación de proteínas. El resto del homogeneizado se mezcló con amortiguador de carga y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

**Determinación de la concentración de proteínas.** La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) utilizando seroalbumina de bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración.

**Western Blot.** Los extractos de tejidos disectados se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Para ello se preparó un gel formado por un gel concentrador al 5% y un gel separador al 8% de acrilamida:bis-acrilamida (1:30). En seguida los extractos se hirvieron durante 5 minutos para desnaturar las proteínas. En cada bolsillo del gel concentrador se cargaron entre 40-80  $\mu$ g de proteína. El gel se sometió a electroforesis durante 1 hora y media a un voltaje constante de 110 volts. Una vez concluida la electroforesis se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas a 110 volts. Una vez terminado este proceso se bloqueó la nitrocelulosa, usando leche descremada al 5% en PBS tween 0,5% y agitación constante a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez transcurrido este período la membrana de nitrocelulosa se incubó con agitación con el primer anticuerpo (Tabla N°4) disuelto en PBS tween 0,5% durante toda la noche a 4°C. Luego, se lavó 4 veces con agitación durante 5 minutos con PBS tween 0,5%. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo (Tabla N°4) disuelto en PBS tween 0,5% con leche descremada al 5% con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y nuevamente se lavó 4 veces con agitación durante 5 minutos con PBS- tween 0,5%. Para el revelado se preparó una solución de sustrato quimioluminiscente ECL ("*Enhanced Chemiluminescence*") en la cual se sumergió la membrana de nitrocelulosa durante 5 minutos, luego se depositó sobre plástico bien estirado con el que también se cubrió y sobre este sándwich se colocó la placa fotográfica y se expuso durante el tiempo necesario para revelar y fijar la película.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para experimentos de western blot y sus correspondientes anticuerpos secundarios.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Anti-DlgS97N	1:200	Anti-IgG de conejo	1:10000
Anti-Disc large	1:3000	Anti-IgG de ratón	1:20000
Anti- $\alpha$ -Tubulina	1:200	Anti-IgG de conejo	1:10000

**Obtención de RNA y preparación de cDNA.** Se disectaron y homogeneizaron 150 discos imaginales de ojo en 200  $\mu$ l de trizol, se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 2-8°C y se transfirió el sobrenadante a tubos libres de RNasa. Se agregaron 40  $\mu$ l de cloroformo, se agitó y se incubó a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 2-8°C y la fase acuosa se traspasó a tubos libres de RNasa. Para precipitar el RNA se añadió 100  $\mu$ l de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos. Se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó resuspendiendo con etanol 75% libre de RNasa. Se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado que luego se disolvió en H<sub>2</sub>O DEPC, seguido de una incubación a 56°C durante 10 minutos.

Una vez concluída esta etapa se procedió a determinar la cantidad de RNA total presente en la muestra. Para esto se midió la absorbancia a 260 y 280 nm de una dilución 3:500 de la muestra. Para preparar cDNA se mezclaron 1  $\mu$ l de oligo dT, 1  $\mu$ l dNTP 10 mM, 1,9  $\mu$ l RNA (5  $\mu$ g) y 8,1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O DEPC, se calentó a 65°C durante 5 minutos, luego se dejó en hielo durante 2 minutos y después se agregó 4  $\mu$ l de amortiguador de reacción ("first strand buffer"), 2  $\mu$ l de DTT (0,1 M) y 1  $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasas (RNase OUT). En seguida se llevó a 42°C durante 2 minutos y se agregó 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa (Superscript II). Se llevó a 42°C durante 50 minutos y después a 70°C durante 15 minutos.

Finalmente se agregó 1 µl de RNasa H y se incubó a 37°C durante 20 minutos para concluir el protocolo a 4°C.

**Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** El cDNA fue amplificado por PCR empleando 2 µl de la mezcla de transcripción inversa en un volumen total de 25 µl de una solución que contiene amortiguador de PCR 1x, dNTPs 200 µM, 200 nM de cada partidor (Tabla N°5) y 1 U de DNA Polimerasa Taq. Como control positivo para cada experimento, se usaron plasmidios que contenían el fragmento a amplificar y como control negativo se usaron mezclas de reacción en las cuales el templado había sido reemplazado por agua. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 5. Secuencias partidores para DlgS97, DlgA y actina.

<b>Nombre partidor</b>	<b><i>Secuencia 5'-3'</i></b>	<b><i>Orientación</i></b>	<b><i>Templado</i></b>
S97N-ATG2	aacaacgctcacagaatgc	5'-3'	Inicio DlgS97
ATG-DlgA	gctgcatatgacaacgagg	5'-3'	ATG de DlgA
GUKrev	gctccatttaatcgccccg	3'-5'	Fin dominio GK
5' actina Dr	ggccggactcgtctactcctgc	5'-3'	Actina de <i>Drosophila</i>
3' actina Dr	gagcaggagatggccaccgctgc	3'-5'	Actina de <i>Drosophila</i>

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análisis de la(s) variante(s) de *dlg* expresada(s) en discos imaginales de ojo tercer estadio larval.

La complejidad de la expresión del gen *dlg* fue anticipada por los análisis mediante northern blot que demostraron la presencia de al menos cinco transcritos *dlg* en larva y mosca adulta (Woods y Bryant, 1989). Los análisis de western blot realizados anteriormente en el laboratorio no sólo mostraron que las variantes *dlg* con dominio S97N se expresan en tejido nervioso y muscular de embrión y larva, sino también que existe un patrón complejo de expresión de las diversas isoformas de Dlg que contienen el dominio S97N.

Con el fin de caracterizar las variantes de procesamiento de *dlg* que se expresan en el disco imaginal de ojo, se realizó un análisis mediante western blot de tejidos disectados de larva silvestre de tercer estadio. Los extractos de tejido utilizados fueron: discos imaginales de ojo (DO), discos imaginales de ala (DA), cerebro (C) y pared muscular (P), los que fueron analizados mediante electroforesis en condiciones desnaturalantes, electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con el anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> (Figura 6 a) o anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (Figura 6 b). Como control de carga proteica se midió  $\alpha$ -tubulina. Es importante recordar que el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> reconoce tanto a DlgA como a las variantes tipo DlgS97N.

En extractos de discos imaginales de ojo se detectó una sola banda inmunoreactiva al anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> de  $\sim 116$  kDa, comparable a la banda encontrada previamente en pared muscular (Mendoza y cols., 2003). También se detectó una banda de peso molecular similar con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> en disco imaginal de ojo. Esta banda revelada por ambos anticuerpos es consistente con la presencia de la variante DlgS97 en disco de ojo, aislada en nuestro

laboratorio por RT-PCR, la que cuenta con la región correspondiente a los dominios PDZ 1 y 2. Sin embargo, no se descarta que la banda revelada por el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> incluya tanto a DlgA como a DlgS97 (cuyos pesos moleculares calculados son 102 y 104 KDa, respectivamente). Los resultados mostrados indican que la variante *dlg* con dominio S97N y PDZs 1 y 2 se expresan en disco imaginal de ojo de tercer estadio larval, la que correspondería a la misma variante detectada en pared muscular.

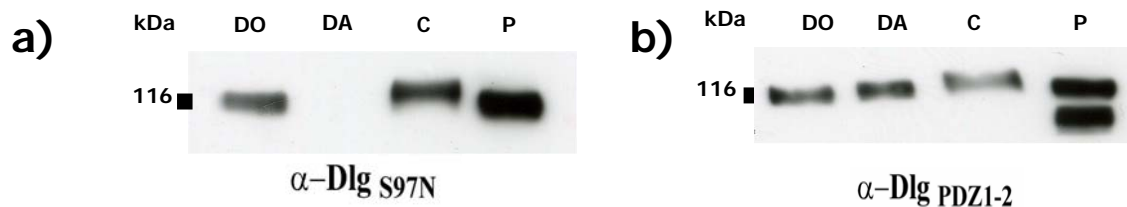


Fig. 6. Análisis mediante western blot de variantes de procesamiento de *dlg* expresadas en tejido nervioso y epitelial.

**Extractos de tejidos de larva tercer estadio:** los extractos proteicos de discos imaginales de ojo (DO), discos imaginales de ala (DA), cerebro (C) y pared muscular (P), fueron separados por electroforesis en condiciones desnaturalantes, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos a) anti-Dlg<sub>S97N</sub> o b) anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub>. Es posible detectar una variante de *dlg* con dominio S97N en disco imaginal de ojo de ~116 kDa, igual a la encontrada en pared muscular. Las cantidades de proteína cargadas fueron DO 80  $\mu$ g, DA 80  $\mu$ g, C 50  $\mu$ g y P 40  $\mu$ g.

Para verificar la presencia de los transcritos DlgS97 y DlgA en discos imaginales de ojo de tercer estadio larval, se realizaron experimentos de RT-PCR, utilizando partidores comunes y específicos para cada variante (Tabla N°5). Usando los partidores para el dominio S97N y el dominio GUK se obtuvo un producto único de 2850 pb (Figura 7 a), de tamaño idéntico al aislado previamente en el laboratorio a partir de cDNA de embriones (Mendoza y cols., 2003) el cual fue usado como templado para el control positivo. Usando los partidores para DlgA se obtuvo también un producto único de 2880 pb (Figura 7 b), que además también es idéntico al obtenido usando el cDNA clonado de DlgA.

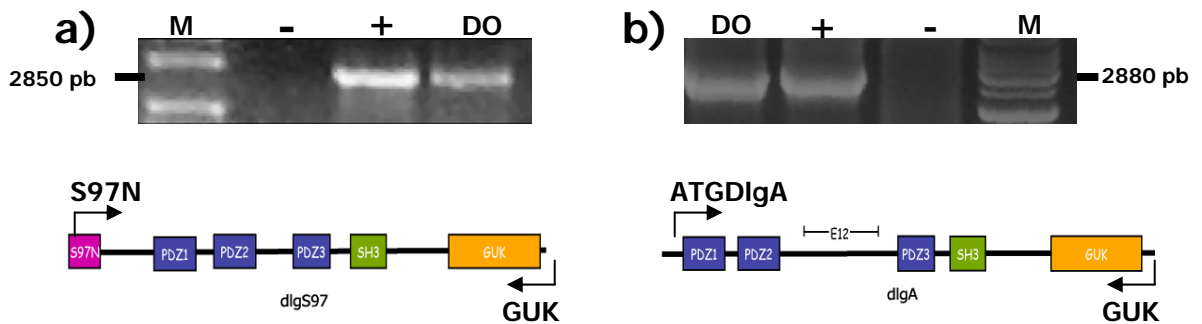


Fig. 7. Determinación de la presencia del mRNA codificante para las variantes Dlg-S97 y Dlg-A en discos imaginales de ojo.

Utilizando la técnica de RT-PCR se amplificó DlgS97 y DlgA mediante partidores comunes y específicos para cada variante, a partir de RNA aislado de discos imaginales de ojo. La figura a) corresponde a la variante DlgS97, con un producto esperado de 2850 pb. En b) se muestra la variante DlgA, con un producto esperado de 2880 pb. Los carriles corresponden a: disco imaginal de ojo (DO); M, marcador de peso molecular; -, control negativo usando agua como templado; +, control positivo usando DlgS97 o DlgA clonado en plasmidio como templado.



### **3.2. Patrón de expresión de las isoformas que expresan el dominio S97N durante el desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*.**

Para caracterizar el patrón de expresión de proteínas que contienen el dominio S97N en el desarrollo del ojo de *Drosophila*, se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para llevar a cabo esto se utilizó el anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> y una serie de otros marcadores moleculares para definir claramente la localización subcelular del dominio S97N tales como: anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub>, un anticuerpo monoclonal que está dirigido contra los dominios PDZ1 y PDZ2; anti-Elav, el cual se utilizó como marcador de fotorreceptores diferenciados; anti-Arm (Armadillo) marcador de uniones adherentes de los epitelios en general, el cual separa los dominios apical y basal; anti-FasII (FasciclinaII) como marcador de axones; anti-Crumbs, un marcador de membrana apical y faloidina, un marcador del rabdómero.

Por medio de microscopía confocal de discos imaginales de ojo de tercer estadio larval incubados con el anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub>, se observó inmunoreactividad del anticuerpo en el epitelio diferenciado posterior al surco morfogenético (SM) (Figuras 8 a, d y g). Para determinar específicamente en qué células se localizó la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub>, se utilizó el anticuerpo anti-Elav, el cual marca los núcleos de los fotorreceptores (Figura 8 h), confirmando así que la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> está en las neuronas fotorreceptoras (Figura 8 i), donde la marca de elav se encuentra rodeando la marca del dominio S97N. Los anticuerpos anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> y anti-Arm marcan epitelio diferenciado e indiferenciado (Figuras 8 b y e, las flechas indican epitelio indiferenciado). No se encontró reacción utilizando el anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> en epitelio indiferenciado anterior al SM, ya que no se detectó colocalización con

anticuerpos que marcan esta zona como anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> y anti-Arm (Figuras 8 c y f).

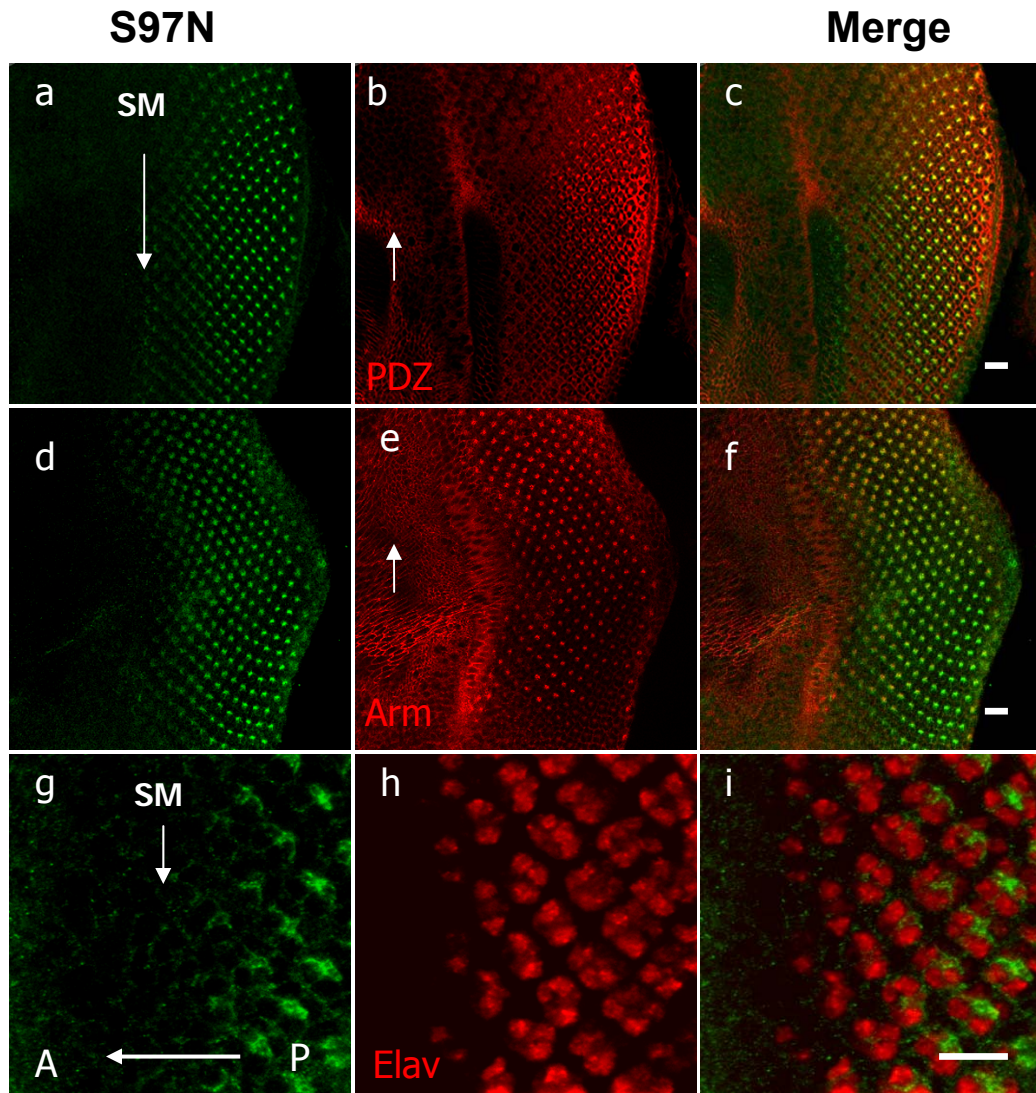


Fig. 8. Expresión del dominio S97N en discos imaginales de ojo L3.

**Patrón de expresión de la variante que contiene el dominio S97N en discos de ojo,** se observa su localización posterior al surco morfogénico (SM) (**a**, **flecha: SM**), exclusivamente en neuronas fotorreceptoras (**i**). Se muestran inmunohistoquímicas (IHQ) dobles: Anti-Dlg<sub>S97N</sub> (**a**, **d** y **g**) revelado con anticuerpo anti-conejo conjugado con alexa 488 (verde), anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**b**), anti-Arm (**e**) y anti-Elav (**h**), revelados con anticuerpo anti-ratón conjugado con alexa 546 (rojo). **c**, **f** y **i**: Imágenes compuestas. Anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> y anti-Arm marcan epitelio diferenciado como indiferenciado (**b** y **e**, **flecha: epitelio indiferenciado**). A ← P indica eje antero-posterior del disco de ojo. Barra: 10 μm.

En una reconstrucción óptica en el eje longitudinal de un cluster de fotorreceptores de larva L3 (Figura 9 a, ver círculo) se pudo observar que la inmunoreactividad al dominio S97N se detectó en la membrana basolateral (Figuras 9 a', b', c' y d') y colocalizó con la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> en los fotorreceptores (Figura 9 a'), pero no en los precursores de las células intermatidiales (Figura 9 a, flecha). Se detectó marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> hasta el nivel donde se ubican los núcleos en los fotorreceptores, los cuales fueron marcados con el anticuerpo anti-Elav (Figura 9 b'), con localización basal al marcador de uniones adherentes Armadillo (Figura 9 c') y al marcador apical Crumbs (Figura 9 d').

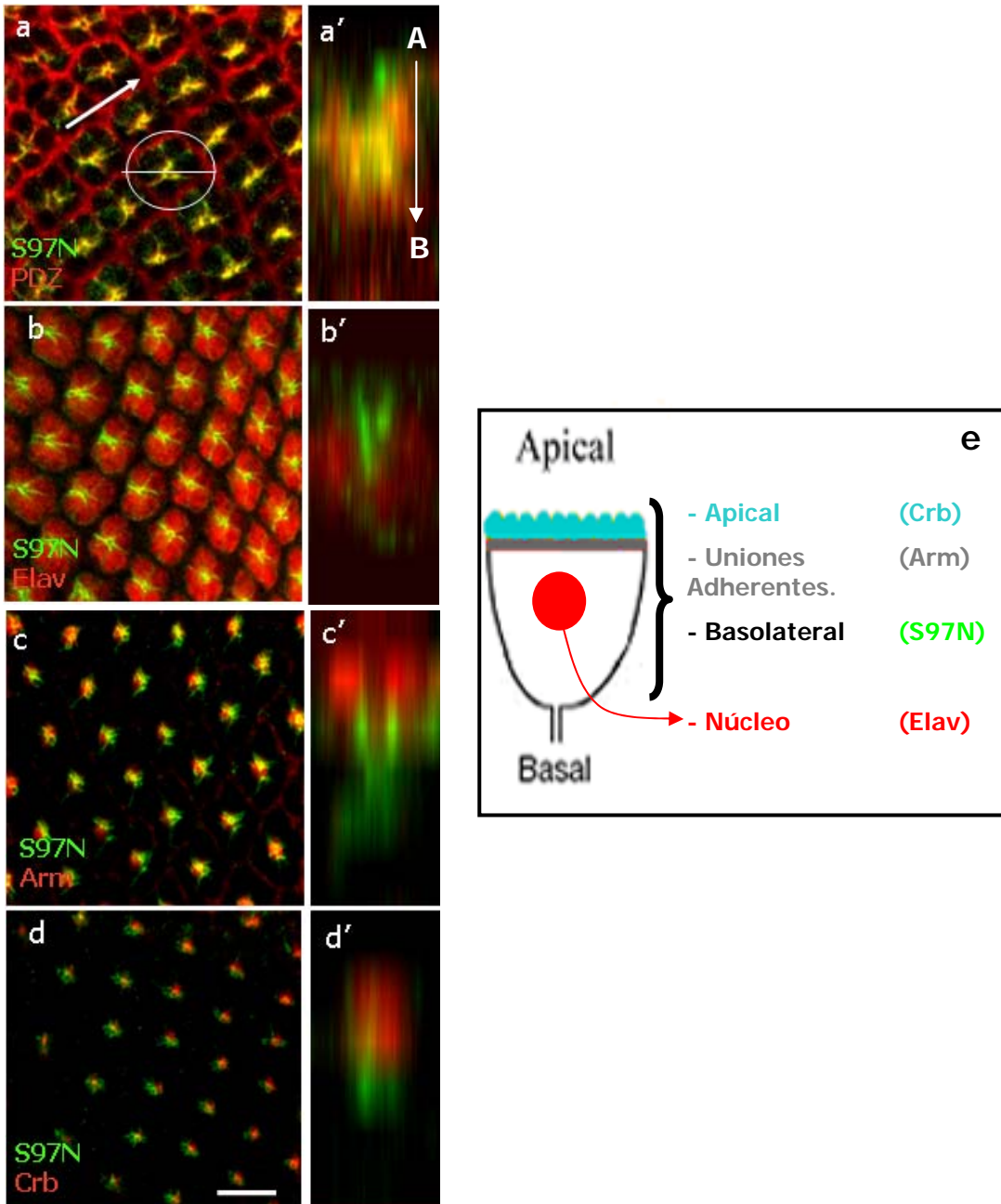


Fig. 9. Localización subcelular del dominio S97N en discos de ojo L3.

Se muestran IHQ dobles de anti-Dlg<sub>S97N</sub> con anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (a y a'), anti-Elav (b y b'), anti-Arm (c y c') y anti-Crb (d y d'). Las figuras a-d son acercamientos de secciones confocales, que se usaron para hacer cortes longitudinales (a'-d') de un cluster de fotorreceptores (círculo de la figura a), representado en el esquema de la derecha (e). Se detecta inmunoreactividad al dominio S97N en la membrana basolateral (a'-d' en verde) y colocaliza con la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> en los fotorreceptores (a') pero no en los precursores de las células intermatidiales (CPI) (a, flecha). Se localiza basal al marcador apical Crumbs (d') y al marcador de uniones adherentes Armadillo (c') hasta el nivel donde se ubican los núcleos en los fotorreceptores, los cuales fueron marcados con el anticuerpo anti-Elav (b'). A→B: eje apico-basal. Barra: 10µm.

En estadios pupales tempranos (30% dp) los fotorreceptores comienzan a girar hacia el interior de la unidad omatídica en 90 grados quedando el dominio apical hacia el centro y el basal hacia la periferia (Figura 10 f). En este estadio se observó que tanto la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> (Figura 10 a) como el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (Figura 10 b) comienzan a localizarse a lo largo del eje distal-proximal de cada unidad omatídica, donde la marca se mantiene a nivel basal (Figuras 10 e). No se detectó inmunoreactividad del dominio S97N en las células cono (CC) y las células precursoras interomatidiales (CPI), como se observó con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (Figura 10 d).

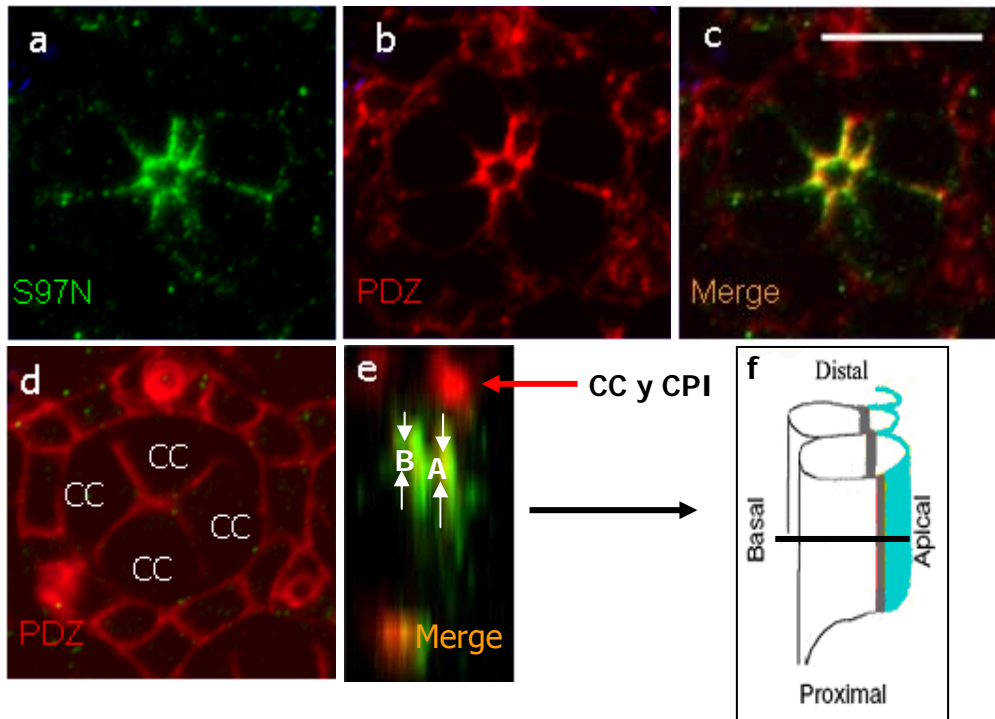


Fig. 10. Localización subcelular del dominio S97N en pupas tempranas

Se muestran IHQ dobles de anti-Dlg<sub>S97N</sub> con anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub>. Las figuras a-d muestran secciones tangenciales de confocal de sólo un cluster de fotorreceptores. La figura e representa un corte longitudinal de un cluster de fotorreceptores, desde el eje distal (D) a proximal (P) representado en el diagrama f, donde la flecha roja indica la ubicación distal de las CC y CPI (figura d). La línea negra en la figura f indica la ubicación del corte de las figuras a, b y c. La inmunoreactividad tanto a los dominios PDZ como al dominio S97N comienza a localizarse a lo largo del eje distal-proximal, colocalizando en la zona basal (c y e). No se detecta inmunoreactividad de anti-Dlg<sub>S97N</sub> en las CC y CPI, pero si del anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (d). A: apical. B: basal. Barra: 5 µm.

En estadios pupales tardíos (67% dp), el dominio apical se diferencia subdividiéndose desde apical hacia basal en el rabdómero (dominio donde ocurre la fototransducción), y tallo del rabdómero (Figura 11 f). La marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> es más definida en etapas más tardías del desarrollo y su localización se ubica en la membrana basal de las neuronas fotorreceptoras, abarcando todo el eje longitudinal que en este caso va de distal (D) a proximal (P) (Figuras 11 a', b', c' y d'). Se ubica basal al marcador de rabdómeros faloidina (Figura 11 b y b'), al marcador de uniones adherentes Armadillo (Figuras 11 c y c') y a la proteína de localización apical Crumbs (Figura 11 d y d'), la cual en este estadio se ubica en el tallo del rabdómero. A su vez la marca obtenida con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> colocalizó completamente con el anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> a lo largo del eje longitudinal (Figura 11 a'), excepto en la zona más distal del cluster donde se localizan las células intermatidiales (CI) (Figura 11 g).

Por otra parte a nivel axonal no se observó expresión del dominio S97N en larvas L3 (Figura 12 a), ya que no se detectó colocalización de la marca obtenida con el anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> con la proteína de adhesión específica de neuronas Fasciclina II que se localiza en los axones de los fotorreceptores (Figura 12 c). Sin embargo, tanto en pupas tempranas como tardías, se observó que los axones de los fotorreceptores son inmunoreactivos al anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub>, ya que colocaliza con Fasciclina II en 30% dp (Figura 12 f) y 67% dp (Figura 12 i). Las imágenes sugieren que existen poblaciones de axones marcados por los anticuerpos anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-FasII y otros por sólo uno de los dos anticuerpos.

Los resultados anteriormente mostrados indican que el dominio S97N se localiza específicamente en neuronas fotorreceptoras, donde se ubica subcelularmente basal a las uniones adherentes en todos los estadios del desarrollo y en los axones de los fotorreceptores desde el período de pupa temprana.



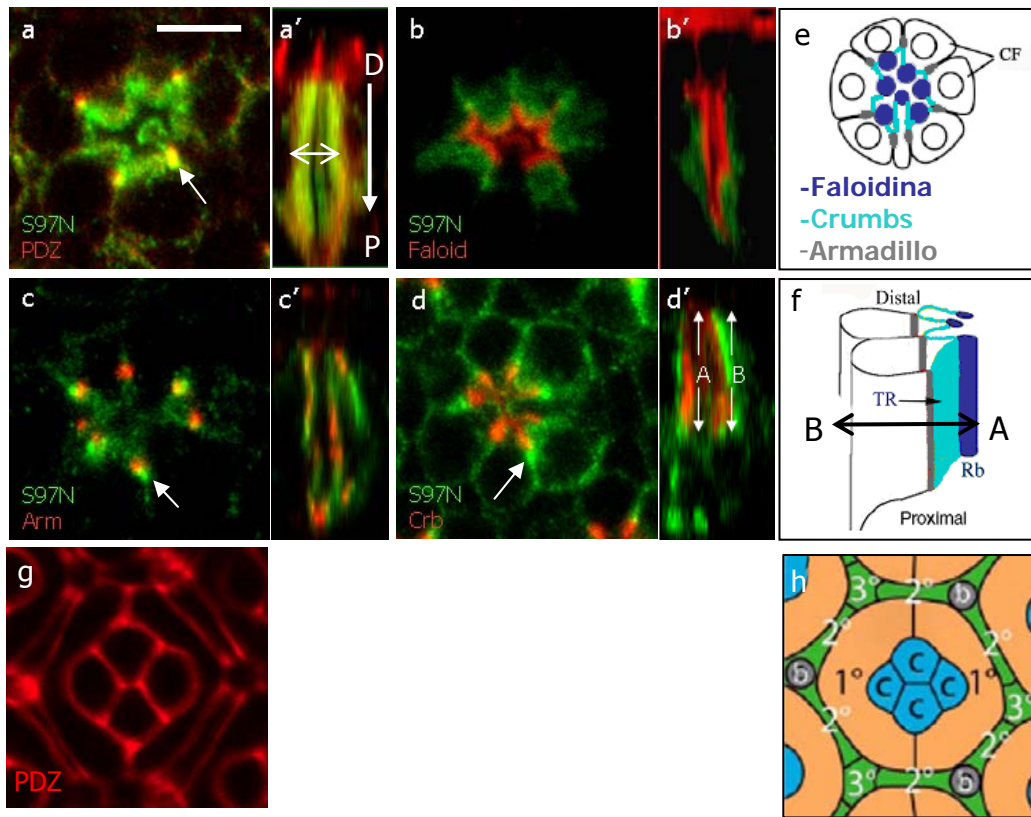


Fig. 11. Localización a nivel subcelular del dominio S97N en estadio pupal tardío.

IHQ dobles de anti-Dlg<sub>S97N</sub> con anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**a, a'**), faloidina conjugada con rodamina (**b, b'**) anti-Arm (**c, c'**), y anti-Crb (**d, d'**). Las figuras **a-d** muestran secciones tangenciales de microscopía confocal de un solo omatidio (la ubicación del corte a lo largo del eje es indicado por la doble fecha de la figura **a'** y **f**). La figura **e** representa un esquema del corte tangencial. Las figuras **a'-d'** muestran cortes longitudinales de cada omatidio en el eje distal (D)- proximal (P), representado por la figura **f**. La figura **h** representa un esquema del plano distal del omatidio donde se localizan las CI (células como (CC), células de pigmento (1°, 2° y 3°) y quetas). Se observa que la localización del dominio S97N se ubica en la membrana basolateral abarcando todo el eje longitudinal (**a'-d'**) colocalizando con PDZ en las células fotorreceptoras (**a, ver flecha y a'**), no así en las CI (**g**). Se encuentra basal al marcador de rabdómeros faloidina (**b'**), al marcador de uniones adherentes Armadillo (**c, ver flecha y c'**) y al marcador apical Crumbs (**d, ver flecha y d'**). D→P: eje distal-proximal. B: basal. A: apical. CF: células fotorreceptoras. TR: tallo del rabdómero. Rb: rabdómero. Barra: 5 µm.

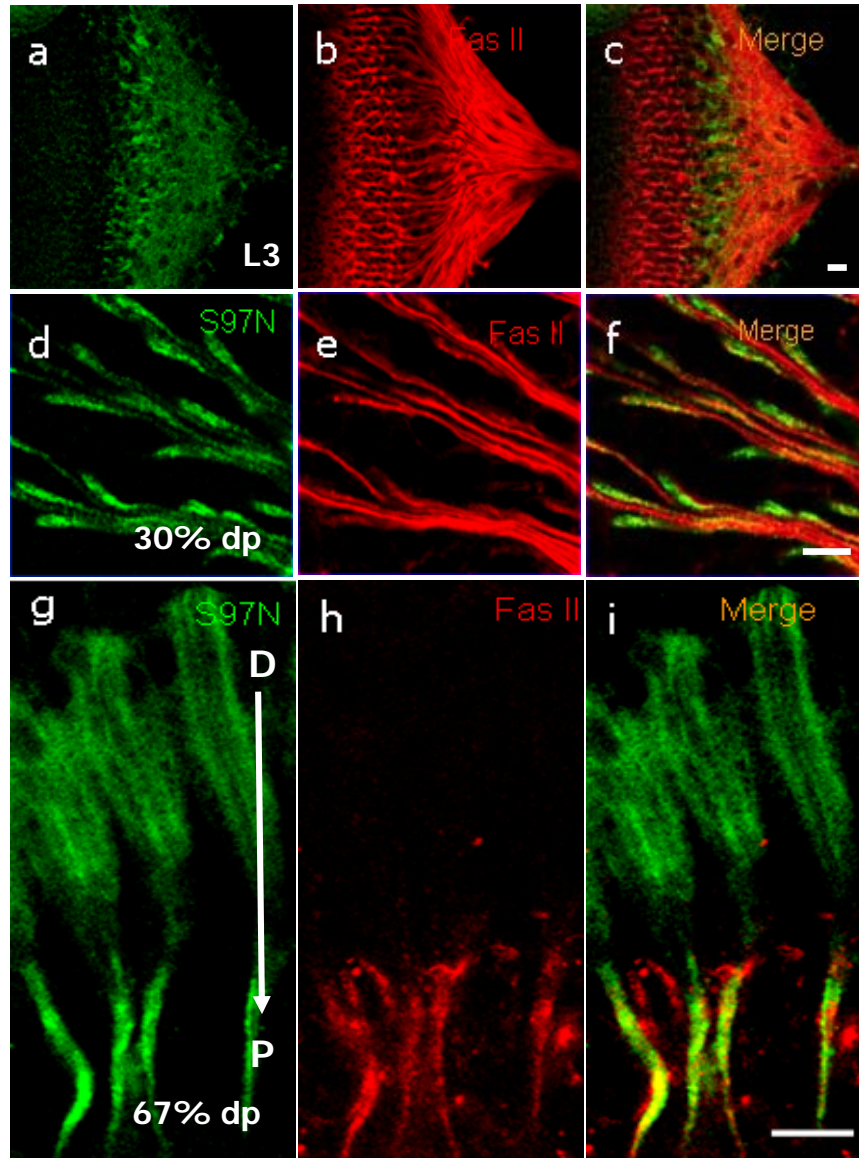


Fig. 12. Expresión axonal del dominio S97N.

IHQ dobles de anti-Dlg<sup>S97N</sup> con anti-Fas II (c, f, i). a- c. Secciones confocales del plano basal del disco imaginal de ojo L3. No se observa expresión del dominio S97N en axones de L3 (a), ya que no se detecta colocalización con el marcador axonal Fasciclina II (c). d-f. Secciones confocales de axones en el plano proximal de retinas 30% dp y g-i. Vista longitudinal de tres omatidios 67% dp en el eje distal (D)-proximal (P). Se observa expresión del dominio S97N en axones y colocaliza con el marcador axonal FasII (f, i). D→P: eje distal-proximal. Barra: 10 μm.



### **3.3. Análisis de los efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en el desarrollo del ojo de *Drosophila melanogaster*.**

Con el fin de analizar los efectos asociados a la ganancia de función de las isoformas que contienen el dominio S97N, se utilizaron líneas de moscas transgénicas que expresaron DlgS97-EGFP. Para ello se utilizó el sistema de expresión UAS-Gal4 (ver materiales y métodos) y en particular la cepa Glass multiple reporter- Gal4 (GMR-Gal4) que expresa Gal4 en el disco imaginal de ojo en células que se encuentran posterior al surco morfogénico (SM).

Para determinar los efectos de la sobreexpresión de los productos del gen *dlg* que contienen el dominio S97N se realizaron técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Con el objeto de saber si la sobreexpresión de la proteína DlgS97 provocó algún efecto en el desarrollo del ojo, se realizó la cruce GMR- Gal4 x UAS-EGFP DlgS97. Como control se utilizó la cruce GMR-GAL4 x WOR en larvas L3 y pupas 67% dp.

Mediante inmunofluorescencia de discos imaginales L3 se observó una aumentada inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub>, posterior al SM, localizándose en zonas donde normalmente no se encuentra (expresión ectópica de la proteína), como en las CPI (Figura 13 d) y en los axones de los fotorreceptores (Figura 13 g). Lo mismo se observó con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (Figura 13 e y h).

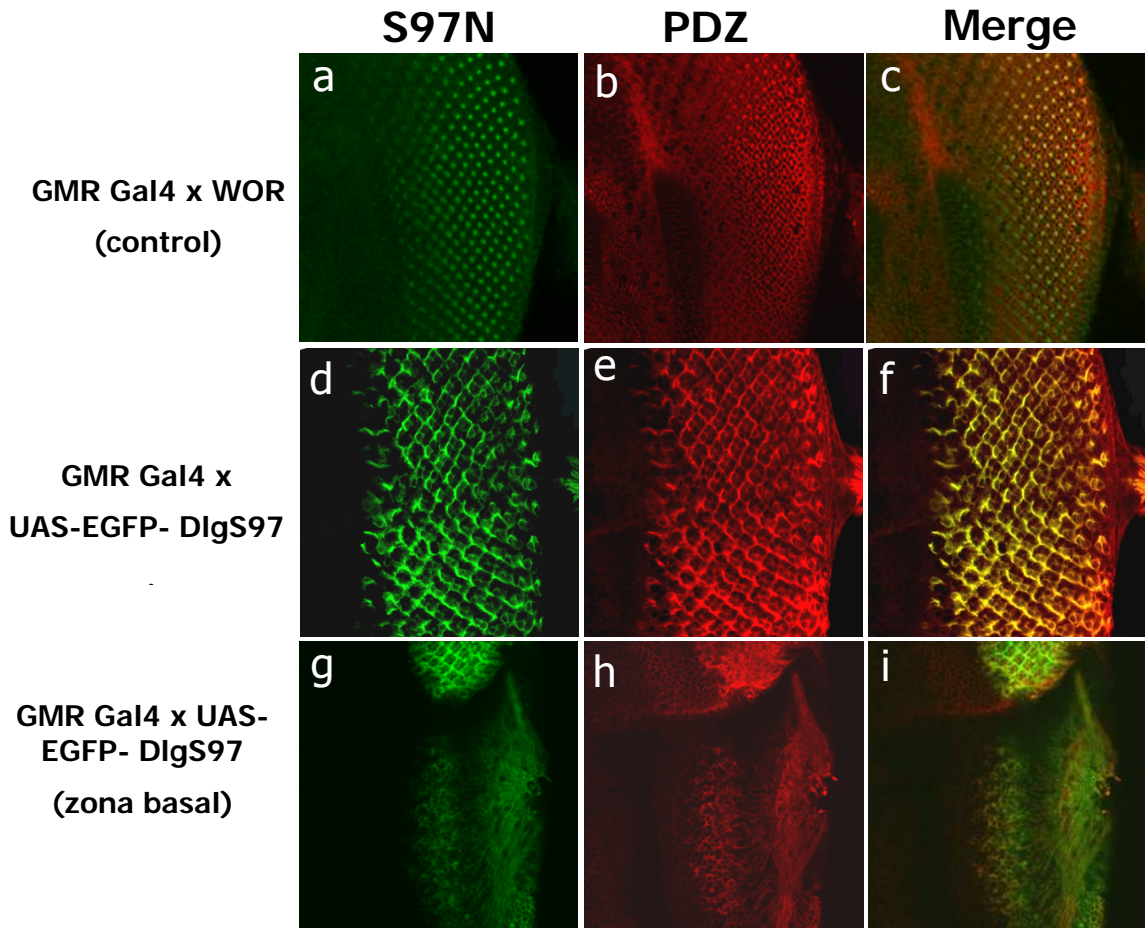


Fig. 13. Efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en discos imaginales de ojo L3.

IHQ de discos imaginales de ojo de larva L3 inmunomarcados con anti-Dlg<sub>S97N</sub> (**a**, **d**, **g**), anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**b**, **e**, **h**) y la superposición de las imágenes (**c**, **f**, **i**). **a-c**: Discos control. **d-i**: Discos que sobreexpresan DlgS97 posterior al SM. Se observa una aumentada inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub>, en toda la zona posterior al SM (**d**) y en los axones (**g**), lo mismo para anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**e**, **h**). Barra: 10  $\mu$ m.

En el caso de las retinas correspondientes a pupas 67% dp, se observó igual que en L3 que la inmunoreactividad de los anticuerpos anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> se encontró aumentada (Figuras 14 d y e, respectivamente). La marca se localizó en toda la membrana de los fotorreceptores y en las CI que se encuentran en la parte distal del omatidio (Figura 14 f').

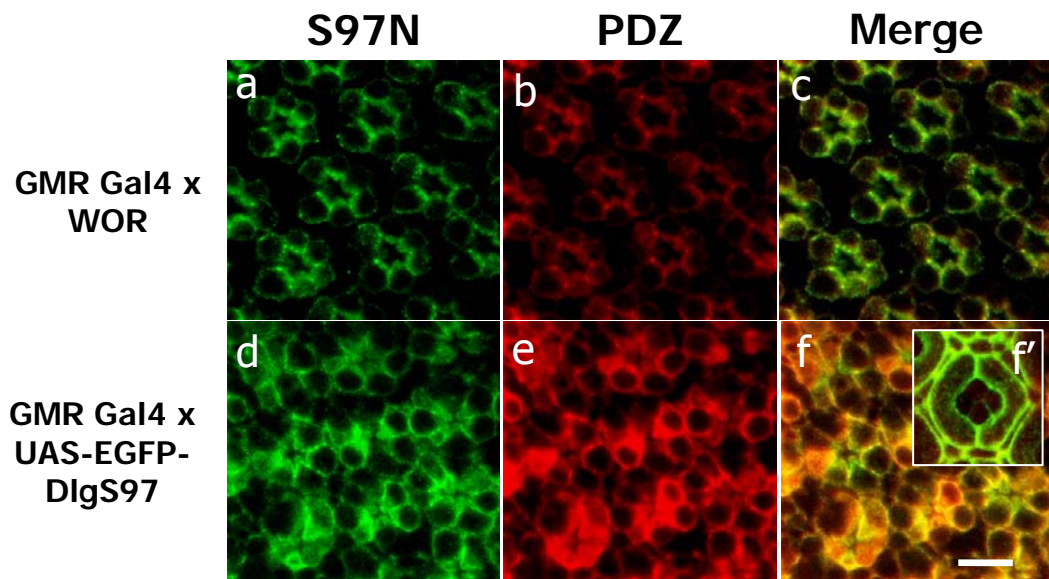


Fig. 14. Efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub>.

IHQ de pupas 67% dp inmunomarcadas con anti-Dlg<sub>S97N</sub> (**a**, **d**), anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**b**, **e**) y la superposición de las imágenes (**c**, **f**, **f'**). **a-c**: Retinas control. **d- f'**: Retinas que sobreexpresan DlgS97. Se observa un aumento en la inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> en retinas que sobreexpresan DlgS97, localizándose en toda la estructura del omatidio (**d**) y en las células de cono (**f'**). También se observa esta marca con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**e**). Barra: 5  $\mu$ m.

La sobreexpresión de la proteína DlgS97 se reflejó en la morfología de los omatidios, los cuales presentaron alteraciones en la membrana apical, como se observó con el marcador apical Crumbs, donde se visualizó una marca irregular de Crumbs en los cluster de los fotorreceptores (Figura 15 e). También se encontró en el caso particular de un omatidio, desorganización omatidial (Figura 15 d, indicado con la flecha), en donde se observó ausencia del marcador apical Crumbs (Figura 15 e, indicado con la flecha). Como consecuencia de la expresión ectópica de la proteína DlgS97 se observó colocalización del dominio S97N con Crumbs en la zona apical (Figura 15 f, indicado con flecha).

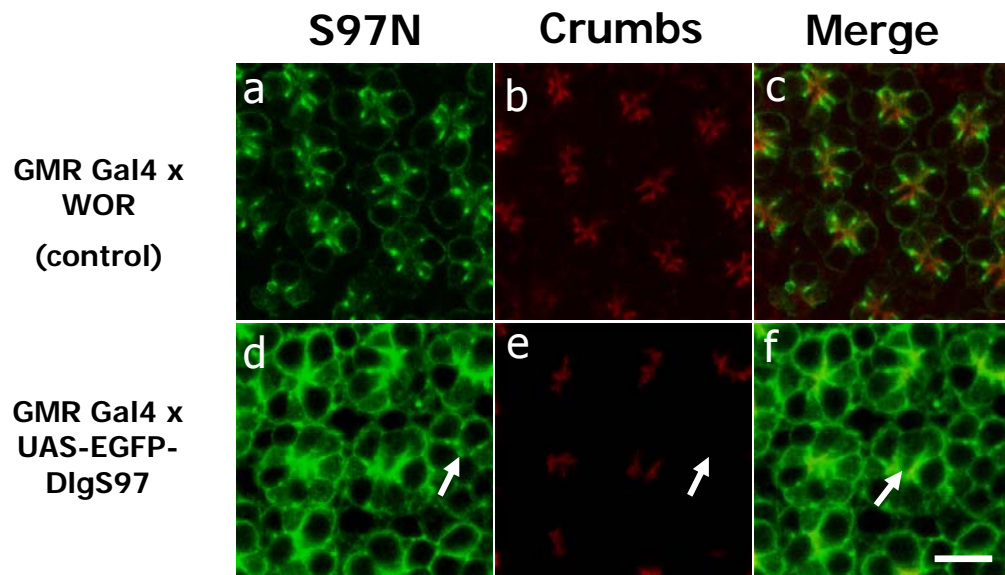


Fig. 15. Efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-Crb.

IHQ de pupas 67% dp inmunomarcadas con anti-Dlg<sub>S97N</sub> (a, d), anti-Crb (b, e) y la superposición de las imágenes (c, f). a-c: Retinas control. d-f: Retinas que sobreexpresan DlgS97. Al sobreexpresar la proteína DlgS97 se observa una marca muy abundante del dominio S97N en toda la membrana del omatidio (d) y una desorganización a nivel de la membrana apical, ya que al marcar con el anticuerpo anti-Crb se observa una marca irregular en los omatidios (e). Asimismo se observó la ausencia del marcador Crumbs en un omatidio que presenta desorganización del cluster de fotorreceptores (d y e, ver flechas). Se detecta a su vez colocalización de Crumbs con DlgS97 en la zona apical del omatidio (f, ver flecha). Barra: 5µm.

### **3.4. Análisis de los efectos asociados a la inhibición de la expresión de las variantes del gen *dlg* que contienen el dominio S97N en el desarrollo del ojo de *Drosophila melanogaster*.**

Con el fin de analizar los efectos asociados a la pérdida de las isoformas que contienen el dominio S97N, se utilizaron líneas de moscas transgénicas que expresaron un RNA interferente dirigido contra el dominio S97N posterior al SM. Para ello se utilizó al igual que en los experimentos de sobreexpresión, el sistema de expresión UAS-Gal4.

Para determinar los efectos de la inhibición de los productos del gen *dlg* que contienen el dominio S97N se realizaron técnicas de inmunofluorescencia y microscopia confocal.

Para dirigir la expresión del dsRNA contra el dominio S97N se realizó la siguiente cruce de cepas transgénicas: GMR-GAL4 x UAS-S97N-RNAi. Como control positivo se utilizó la cruce GMR-GAL4 x WOR (*white Oregon*), en larvas L3 y pupas 67% dp.

El análisis en los discos imaginales de ojo L3 de la progenie F1 mostró una disminución de la inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> (Figura 16 d) comparado con el control (Figura 16 a). Sin embargo no se visualizó un fenotipo alterado en la organización omatidial. Tampoco se observó una disminución de la inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (Figura 16 e).

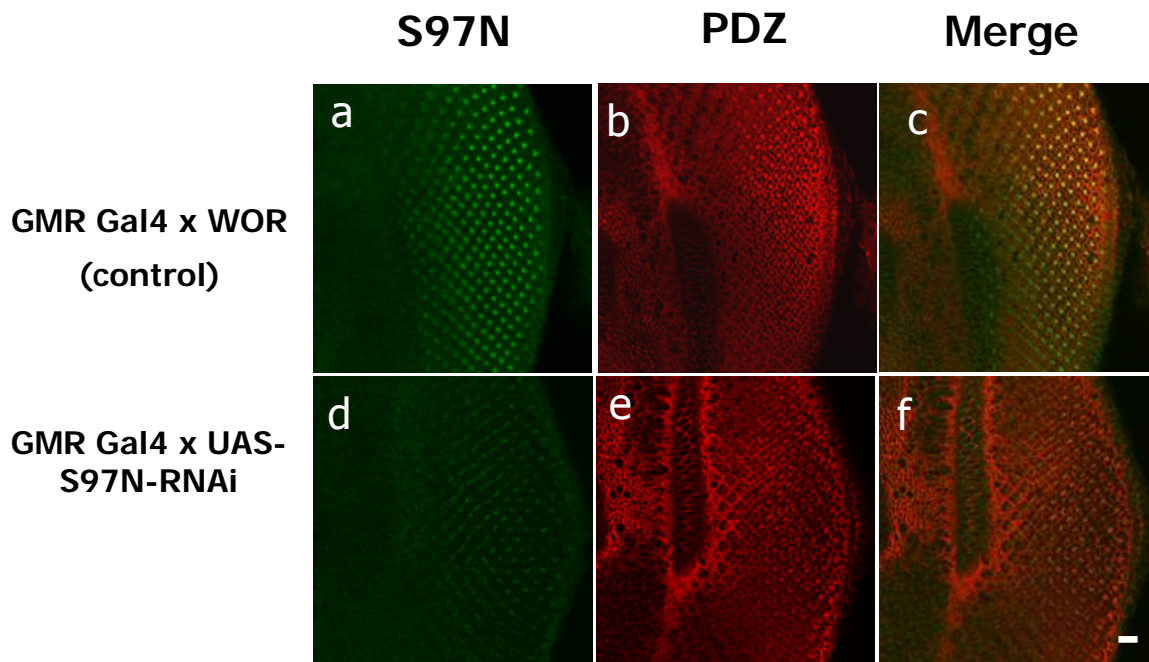


Fig. 16. Efectos asociados a la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en discos de ojo L3.

IHQ de discos imaginales de ojo de larva L3 inmunomarcados con anti-Dlg<sub>S97N</sub> (**a**, **d**), anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (**b**, **e**) y la superposición de las imágenes (**c**, **f**). **a-c**: Discos control. **d-f**: Discos que expresan el RNAi-S97N posterior al SM. Se observa una clara disminución de la inmunoreactividad de anti-Dlg<sub>S97N</sub> (**d**). La inmunoreactividad a PDZ no disminuye (**e**). No se visualizan defectos morfológicos con la expresión del RNAi-S97N en los cluster de los fotorreceptores. Barra: 10  $\mu$ m.



Los resultados en pupas 67% dp mostraron al igual que en L3, una disminución de la inmunoreactividad del anticuerpo anti-DlgS97N (Figura 17 y 18 d), pero se encontraron diferencias con respecto a los dominios PDZs. Se observó que al inhibir el dominio S97N, la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> se deslocalizó en comparación a la marca observada con el control (Figura 17 e y b).

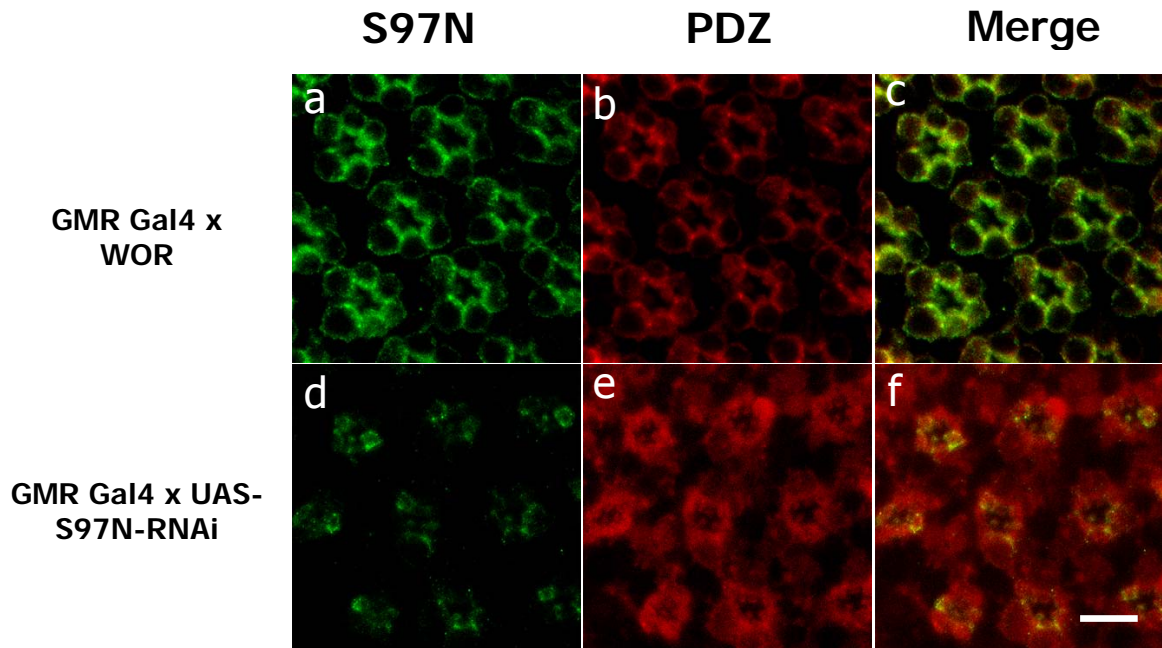


Fig. 17. Efectos asociados a la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-Dlg<sub>PDZ12</sub>. IHQ de pupas 67% dp inmunomarcadas con anti-Dlg<sub>S97N</sub> (a, d), anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> (b, e) y la superposición de las imágenes (c, f). a-c: Retinas control. d-f: Retinas que expresan el RNAi-S97N. En retinas con pérdida de variantes que contienen el dominio S97N, se detecta disminución de la inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub> (d). Observándose que la marca del anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> se encuentra deslocalizada comparada con el control (e, b). Barra: 5  $\mu$ m.

Al observar el efecto de la pérdida de función del dominio S97N, utilizando el anticuerpo anti-Crb, no se detectaron alteraciones en la expresión y localización de la proteína Crumbs en la membrana apical de los fotorreceptores (Figura 18 e).

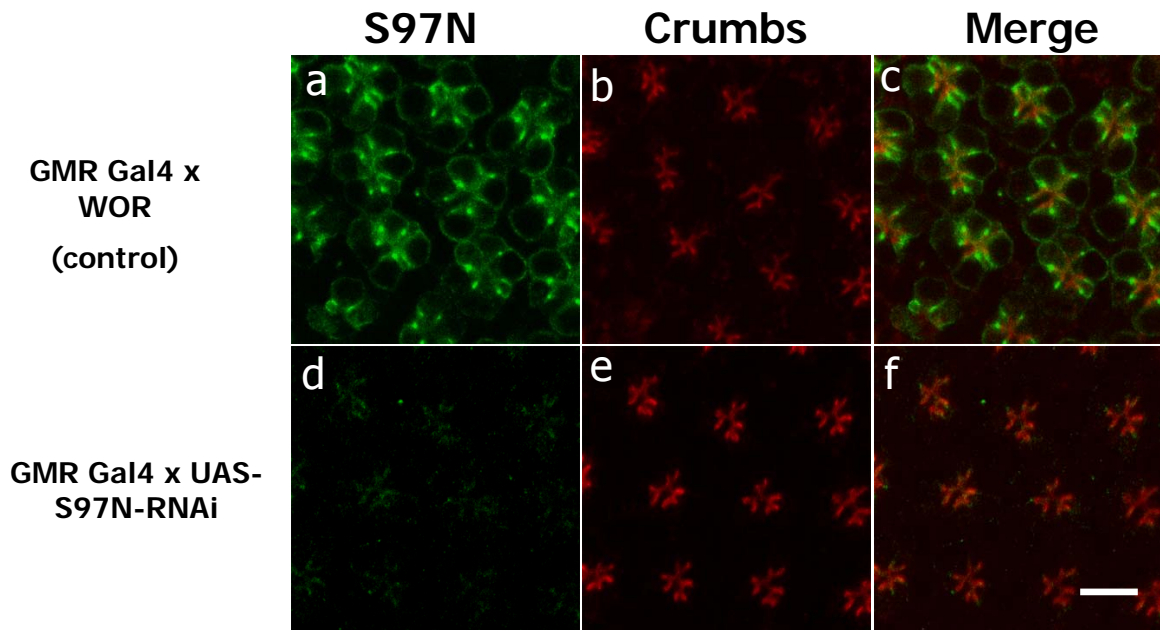


Fig. 18. Efectos asociados a la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en retinas tardías (67% dp), utilizando anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-Crb.

IHQ de pupas 67% dp inmunomarcadas con anti-Dlg<sub>S97N</sub> (a, d), anti-Crb (b, e) y la superposición de las imágenes (c, f). a-c: Retinas control. d-f: Retinas que expresan el RNAi-S97N. Se observa una disminución en la inmunoreactividad del anti-Dlg<sub>S97N</sub> (d). Para la proteína Crumbs, no se observaron alteraciones en su expresión y localización al realizar la pérdida de función del dominio S97N (e). Barra: 5  $\mu$ m.



## 4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó el patrón de expresión de los productos del gen *dlg* con dominio S97N en el ojo compuesto de *Drosophila* y los efectos de la pérdida y ganancia de función de este dominio.

La parte más interesante de la región comprendida por el dominio S97N es el dominio más amino terminal, descrito recientemente como un dominio L27. Estos dominios son pequeños (60-70 aminoácidos) y median la interacción entre dominios L27 de otra molécula idéntica (homodimerización) u otros dominio L27 presentes en otras proteínas (heterodimerización).

Se encontró, por ejemplo que en células epiteliales de vertebrados, el dominio L27 dirige la asociación de SAP97 a la membrana lateral (Wu y cols., 1998). Se denominó dominio L27 debido a su presencia en las proteínas con dominios PDZ, Lin-2 y Lin-7 (Doerks y cols., 2000). Lin 2 y Lin-7 junto con Lin-10 forman un complejo trimérico requerido para la localización polarizada de proteínas en células epiteliales (Kaech y cols., 1998; Rongo y cols., 1998). Los ortólogos en mamífero de Lin-2 y Lin-7, las proteínas andamio CASK y VELI también presentan el dominio L27. CASK contiene dos dominios L27 y Veli uno. El primer dominio interactúa con el dominio L27 de SAP97, interacción esencial para la localización de SAP97 a la membrana lateral, mientras que el segundo dominio media la heterodimerización entre CASK y VELI (Lee y cols., 2002).

Los experimentos de inmunofluorescencia, así como el análisis western blot y RT-PCR presentados en este trabajo indican que las variantes con dominio S97N se expresan específicamente en los fotorreceptores del ojo compuesto de *D. melanogaster*.

El análisis mediante western blot permitió detectar la presencia de proteínas que contienen el dominio S97N en discos imaginales de ojo de tercer estadio larval. Los resultados sugieren la existencia de sólo una variante con dominio S97N, la cual corresponde a una banda de 116 kDa, comparable a la

banda encontrada en pared muscular. No se encontraron bandas adicionales al revelar con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub>. Dado que sabemos de la existencia de proteínas con dominios PDZs y sin dominios S97N por los experimentos de inmunofluorescencia, se sugiere que la banda de 116 KDa encontrada con el anticuerpo anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> podría contener variantes con y sin dominio S97N. Esto es compatible con la presencia de la variante DlgA (PM calculado 102 KDa) y la variante DlgS97 (PM calculado 104 KDa). La diferencia entre la masa molecular calculada de DlgS97 que corresponde a 104 kDa y la de la variante de discos imaginales de ojo que es 116 kDa, podría deberse probablemente a modificaciones post transcripcionales, como la fosforilación por CamKII descrita para Dlg en la sinapsis (Koh y cols., 1999).

Para confirmar la existencia de los transcritos DlgS97 y DlgA se realizaron experimentos de RT-PCR en discos imaginales de ojo tercer estadio larval. Como se puede apreciar por medio de los experimentos aquí presentados, se obtuvieron productos que presentaron un tamaño esperado de 2850 pb y 2880 pb, de tamaño idéntico al de los controles usados que corresponden a los cDNA de DlgS97 y DlgA, respectivamente.

Una vez que se estableció la presencia de la variante DlgS97, se continuó con experimentos que permitiesen determinar el patrón de expresión de la proteína en el ojo. Los experimentos de inmunofluorescencia en distintos estadios del desarrollo del ojo de *Drosophila* permitieron determinar claramente que la variante con dominio S97N se encuentra presente en las neuronas fotorreceptoras desde estadios tempranos del desarrollo del ojo. Las reconstrucciones ópticas en el eje longitudinal de omatidios en desarrollo, permitieron determinar la localización subcelular de la variante DlgS97 en las células fotorreceptoras, encontrándose en la membrana basolateral donde colocaliza con PDZ. Se detecta a nivel axonal sólo en estadios pupales, sugiriendo que existen poblaciones de axones diversos, coexistiendo axones que

presentan expresión de DlgS97 o de Fas II y poblaciones con expresión de ambas proteínas.

Los experimentos de pérdida de función del dominio S97N realizados previamente en el laboratorio indican que este dominio participa en la neurogénesis, ya que al inhibir su expresión a través de la inyección de dsRNA contra el dominio S97N, se observan defectos graves en el desarrollo del SNC de embriones, el cual presenta un fenotipo letal (Mendoza y cols., 2003).

En esta tesis se analizó la pérdida de función en las neuronas fotorreceptoras de las cepas transgénicas que expresan el RNAi bajo el control de GMR-Gal4. Estos experimentos mostraron que la variante que contiene el dominio S97N disminuye su expresión, pero no se aprecia un fenotipo alterado en discos de ojo de larva de tercer estadio. Sugiriendo que tal vez la disminución de la expresión por medio del sistema UAS-GAL4 no fue suficiente como para provocar una pérdida completa del transcrito. Otra posibilidad es que al inhibir la expresión del dominio S97N, otras variantes de *dlg*, como por ejemplo la isoforma DlgA podría suplir el rol de polaridad que pudiera estar cumpliendo en las neuronas fotorreceptoras, ya que esta posee los mismos dominios que DlgS97, exceptuando el dominio S97N.

Sin embargo, en pupas más tardías (67% dp) se aprecia una deslocalización de la marca de los dominios PDZs al inhibir el dominio S97N en conjunto con la disminución en la inmunoreactividad del anticuerpo anti-Dlg<sub>S97N</sub>. Estos resultados sugieren que la pérdida de proteínas que contienen el dominio S97N podrían ser importantes para mediar la localización de otras proteínas que contienen PDZs, como DlgA a sus sitios de anclaje a la membrana, pudiendo de esta manera estar formando un complejo de proteínas en la membrana basolateral. Los experimentos de western blot y RT-PCR identificaron sólo la variante DlgA, además de DlgS97.

Por otro lado al usar el marcador Crumbs, que marca el tallo del rabadómero, no se observa una deslocalización o disminución de la proteína Crumbs, sugiriendo con esto que el dominio S97N no estaría formando parte del complejo apical Crb.

En los experimentos de sobreexpresión de la proteína DlgS97 se detecta un esperado aumento en la inmunoreactividad de los anticuerpos anti-Dlg<sub>S97N</sub> y anti-Dlg<sub>PDZ1-2</sub> en discos de ojo L3 y pupas 67% dp, donde se localiza en toda la membrana de los fotorreceptores, así como en las CPI como en las CI, respectivamente. No se visualizaron, sin embargo cambios notorios a nivel de morfología en L3, sólo se observa la localización de la proteína DlgS97 en los axones de los fotorreceptores.

A nivel de pupas tardías se detectaron defectos en la membrana apical de los omatidios, puesto que la marca de la proteína Crumbs se presenta irregular y en un caso particular no se observa. Esto probablemente se deba a que la sobreexpresión de la proteína DlgS97 podría estar provocando algún cambio en la polaridad neuronal al reclutar proteínas a dominios que no corresponde o interferir de una u otra forma con el ensamblaje del complejo apical Crumbs.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se detectó una variante de *dlg* que contiene el dominio S97N en los discos imaginales de ojo de tercer estadio larval, la cual posee una masa molecular de ~ 116 kDa, mediante análisis de western blot.
2. Se determinó la presencia de los mRNAs codificantes para el transcrito DlgS97 en discos imaginales de ojo de tercer estadio larval por medio de experimentos de RT-PCR.
3. La variante de *dlg* que contiene el dominio S97N se expresa específicamente en neuronas fotorreceptoras durante el desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila*.
4. A nivel subcelular la variante que contiene el dominio S97N se localiza basal a las uniones adherentes en larva tercer estadio, retinas tempranas y tardías y a nivel axonal en estadios pupales.
5. La sobreexpresión de la proteína DlgS97N resulta en la localización ectópica de la proteína en discos de ojo L3 y pupas posterior al SM. Se detecta expresión en los axones de L3, y no se observaron cambios notorios en su morfología. En pupas se detectaron defectos en la membrana apical de los omatidios.

6. La expresión de un RNAi contra el dominio S97N resulta en la disminución de la expresión de la variante que contiene el dominio S97N en discos de ojo L3 y pupas tardías. No se observaron alteraciones aparentes en el tercer estadio larval, sin embargo en pupas 67% dp la disminución de los niveles de DlgS97 conduce a la deslocalización de los dominios PDZs.

## 6. REFERENCIAS

1. **Bate, M. y Martínez Arias, A.** (1993). The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulos 18, 19 y 20.
2. **Bilder, D** (2001). Cell polarity: Squaring the circle. *Curr. Biol.* 11: 132–135.
3. **Bilder, D., Li, M. y Perrimon, N.** (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289: 113-116.
4. **Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C. y Knust, E.** (2001) Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene *discs large*. *Dev Biol* 230: 29-42.
5. **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
6. **Brand y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
7. **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.
8. **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.
9. **Firestein, BL. y Rongo, C.** (2001) DLG-1 Is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Mol Biol Cell* 12: 3465–3475.
10. **Garner, CC., Nash, J. y Haganir, RL.** (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* 10: 274-280.
11. **Hough, CD., Woods, DF., Park, S. y Bryant, PJ.** (1997). Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs-large. *Genes Dev.* 11: 3242-53.

12. **Kaech, SM., Whitfield, CW. y Kim, SK.** (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(6):761-71.
13. **Kim, SK.** (1995). Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 772-778.
14. **Koh, YH., Popova, E., Thomas, U., Griffith, LC. y Budnik, V.** (1999). Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* 98: 353–363.
15. **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.
16. **Marfatia, SM., Byron, O., Campbell, G., Liu, SC. y Chishti, AH.** (2000). Human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein forms an oligomer in solution. Identification of the self-association site. *J. Biol Chem* 275: 13759-13770.
17. **Mendoza, C., Olguín, P., Lafferte, G., Thomas, G., Ebitsch, S., Gundelfinger, ED., Kukuljan, M. y Sierralta, J.** (2003). Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 23, 2093-2101.
18. **Pawson, T. y Scott, JD.** (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080.
19. **Peng, C., Manning, L., Albertson, R. y Doe, CQ.** (2000) The tumour suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 408: 596-600.
20. **Perrimon, N.** (1988). The maternal effect of *lethal(1)discs-large-1*: a recessive oncogen of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 127: 392-407.
21. **Rongo, C., Whitfield, CW., Rodal, A., Kim, SK. y Kaplan, JM.** (1998). LIN-10 is a shared component of the polarized protein localization pathways in neurons and epithelia. *Cell*. 94(6):751-9.
22. **Sheng, M. y Sala, C.** (2001). PDZ Domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1–29.



23. Sullivan, M., Ashburner, R. y Hawley, S. (2000). *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulos 10-11.
24. Tejedor, FJ., 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<sup>+</sup> channels *in vivo*. *J. Neurosci.* 17: 152-159.
25. Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. y Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 35:747-784.
26. Woods, DF. y Bryant, PJ. (1989). Molecular cloning of the lethal (1) Discs large-1 oncogene of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 134: 222-235.
27. Woods, DF. y Bryant, PJ. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homologue localized at septate junctions. *Cell* 66: 451-64.
28. Woods, DF., Hough, C., Peel, D., Callaini, G. y Bryant, P. (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.*, 134, 1469-1482.
29. Wu, H., Reissner, C., Kuhlendahl, S., Coblenz, B., Reuver, S., Kindler, S., Gundelfinger, E. y Garner, C. (2000). Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *EMBO J*, 19, 5740-5751.
30. Wu, H., Reuver, S., Kuhlendahl, S., Cheng, WJ. y Garner, C. (1998). Subcellular targeting and cytoskeletal attachment of SAP97 to the epithelial lateral membrane. *J. Cell Science* 111: 2365-237.