



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

**PARTICIPACIÓN DEL DOMINIO S97N DE LA
PROTEÍNA DLG EN EL DESARROLLO DE LA
SINAPSIS NEUROMUSCULAR DE LARVAS
DE *Drosophila melanogaster*.**

PATROCINANTE

Dra. Daniela Seelenfreund
Depto. de Bioquímica y Biol.
Molecular
Fac. de Cs. Qcas y Farmacéuticas.
Universidad de Chile.

DIRECTOR

Dra. Jimena Sierralta
Programa de Fisiología y Biofísica
Instituto de Ciencias Biomédicas
Fac. de Medicina
Universidad de Chile

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

ROMINA BARRÍA MATURANA

**Santiago- Chile
2006**

“Y en efecto, pregunta ahora a las bestias y ellas te enseñarán;

A las aves de los cielos y ellas te lo mostrarán;

o habla a la tierra y ella te enseñará;

los peces del mar te lo declararán también

¿Qué cosas de todas estas no entiende que la mano de Jehová la hizo?

En su mano esta el alma de todo viviente,

y el hálito de todo el género humana.

Con Dios esta la sabiduría y el poder, suya es el consejo y la inteligencia.”

Job 12: 7 - 13

*Quiero dedicar este trabajo a Dios por su eterno y dulce amor,
por ser mi refugio, fortaleza y esperanza.
A mi madre y abuela por su entrega incondicional, y a mi hermano Gabriel.
También quiero agradecer la Dra. Jimena Sierralta por permitirme trabajar en su
laboratorio
y confiar en mi.
A mis amigos por estar ahí siempre y a mis compañeros del laboratorio por
su buena onda, haciendo aún más placentero intentar hacer ciencia.*

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|---------------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| INDICE GENERAL..... | iii |
| INDICE DE FIGURAS..... | v |
| INDICE DE TABLAS..... | vi |
| ABREVIATURAS..... | vii |
| RESUMEN..... | ix |
| SUMMARY..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Proteínas de andamio..... | 1 |
| 1.2. El gen <i>dlg</i> | 2 |
| 1.3. El dominio S97N de las variantes del gen <i>dlg</i> | 4 |
| 1.4. La unión neuromuscular como modelo de estudio..... | 7 |
| 1.5. Hipótesis..... | 10 |
| 1.6. Objetivo general..... | 11 |
| 1.7. Objetivos específicos..... | 11 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| 2.1.1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> | 12 |
| 2.1.2. Mantenimiento de moscas <i>Drosophila melanogaster</i> | 13 |
| 2.2 Reactivos y Soluciones..... | 14 |
| 2.3 Métodos..... | 17 |
| 3. RESULTADOS..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1. Determinación de la localización subcelular de las variantes del gen <i>dlg</i> que contienen el dominio S97N en botones sinápticos tipo I de larvas correspondientes al tercer estadio de <i>Drosophila melanogaster</i> | 24 |
| 3.2. Determinación del efecto de la inhibición de la expresión de las isoformas que contienen el dominio S97N en el desarrollo de la unión neuromuscular..... | 26 |
| 3.3. Determinación de los efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en el desarrollo de la unión neuromuscular en larvas de tercer estadio..... | 35 |
| 3.4. Determinación de la capacidad del dominio S97N de promover la multimerización y de interactuar intermolecularmente con otros dominios... | 38 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 41 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 46 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Esquema del complejo multiproteico formado por Dlg en la sinapsis neuromuscular glutamatérgica de <i>Drosophila Melanogaster</i> | 3 |
| Figura 2. Variantes originadas del locus <i>dlg</i> | 5 |
| Figura 3. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> | 8 |
| Figura 4. Pared muscular de larva de tercer estadio..... | 9 |
| Figura 5. Clasificación de botones sinápticos..... | 9 |
| Figura 6. Esquema del sistema UAS-GAL4 como herramienta para dirigir expresión de genes..... | 18 |
| Figura 7. Expresión de las variantes de Dlg con dominio S97N..... | 24 |
| Figura 8: Colocalización de Fas II y Scrib con las variantes de Dlg que contienen el dominio S97N..... | 25 |
| Figura 9. Patrón de expresión de las variantes con dominio S97N utilizando marcadores presinápticos..... | 26 |
| Figura 10. Efecto diferencial en la inmunoreactividad de anti-Dlg _{S97N} y anti-Dlg _{PDZ1-2} de RNAi específico para S97N en unión neuromuscular larval..... | 27 |
| Figura 11. Reducción de la expresión de las variantes con dominio S97N a través de RNA interferente..... | 29 |
| Figura 12. Análisis de expresión de Scrib en botones sinápticos que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N y DlgA en el músculo estriado..... | 31 |
| Figura 13. Análisis de expresión de FasII en botones sinápticos que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N y DlgA en el músculo estriado..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Análisis de expresión de Scrib y FasII en botones sinápticos que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en la membrana presináptica..... | 33 |
| Figura 15. Pérdida de expresión de variantes con dominio S97N y de DlgA | 34 |
| Figura 16. Sobreexpresión de DlgS97 y DlgA en músculo de larvas de tercer estadio..... | 35 |
| Figura 17. Inmunohistoquímica de botones sinápticos con sobreexpresión de DlgS97 y DlgA en la membrana postsináptica..... | 36 |
| Figura 18. Inmunohistoquímica de botones sinápticos con sobreexpresión de DlgS97 y DlgA en la membrana presináptica..... | 37 |
| Figura 19: Sobreexpresión de DlgS97 y DlgA..... | 37 |
| Figura 20. Determinación de la unión del dominio S97N con DlgS97..... | 39 |
| Figura 21. Inmunoprecipitación de DlgS97 en extractos de pared muscular | 40 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla 1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas en esta tesis..... | 12 |
| Tabla 2. Resumen de las cruas realizadas en esta tesis..... | 18 |
| Tabla 3. Anticuerpos utilizados para experimentos de inmunofluorescencia..... | 20 |
| Tabla 4. Anticuerpos utilizados para experimentos de Western blot..... | 22 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| APS | : Persulfato de amonio |
| cDNA | : ácido desoxirribonucleico complementario |
| DNA | : ácido desoxirribonucleico |
| DPS | : Densidad Postsináptica |
| Dlg | : Discs large |
| EGFP | : “ <u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein” (Proteína fluorescente verde mejorada) |
| FasII | : Fasciclina II, |
| GST | : Glutación S-Transferasa |
| GUK | : Guanilato quinasa |
| GUK-h | : GUK-holder |
| IHQ | : Inmunohistoquímica |
| L27 | : dominio de heterodimerización Lin-2 / Lin-7 |
| mRNA | : ácido ribonucleico mensajero |
| MAGUK | : “ <u>M</u> embrane- <u>A</u> ssociated <u>G</u> uanylate <u>K</u> inases” (Guanilato quinasa asociadas a membrana) |
| NMDA | : N-metil D- aspartato |
| nNOS | : óxido nítrico sintasa neuronal |
| pb | : pares de bases |
| PBS | : “ <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline” (Tampón fosfato salino) |
| PCR | : “ <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction” (Reacción en cadena de la polimerasa) |
| PMSF | : Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |

PDZ : PSD-95/ Dlg/ ZO-1
PSD-95 : Proteína de densidad postsináptica de 95 Kda
RNAi : ácido ribonucleico de interferencia
RSS : Retículo subsináptico
RT-PCR : transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa
SAP : “Sinapsis associated protein” (Proteína asociada a sinapsis)
SDS : dodecilsulfato de sodio
SH3 : dominio de homología src tipo 3
UAS : “upstream activation sequence” (secuencia de activación río arriba)
ZO-1 : Zónula ocludens-1

RESUMEN

La localización precisa de los componentes sinápticos durante el desarrollo requiere del ordenamiento de una red de proteínas entre las cuales participan proteínas andamio de la familia MAGUK (membrane-associated guanylate kinases). Los miembros de esta familia reclutan receptores, canales iónicos, componentes de cascadas de transducción de señales y proteínas del citoesqueleto en complejos macromoleculares a través de sus dominios de interacción proteína-proteína.

La sinapsis neuromuscular de la larva de *Drosophila melanogaster* es un excelente modelo de sinapsis centrales de mamíferos. En esta sinapsis glutamatérgica, la proteína andamio Discs large (Dlg), un miembro de la familia MAGUK, cumple un papel importante en la formación de la sinapsis y en la localización de proteínas involucradas en la transducción de señales.

Se ha demostrado que Dlg determina la localización sináptica del canal de K⁺ tipo Shaker, Fasciclina II (FasII), una molécula de adhesión celular involucrada en el crecimiento y plasticidad de la sinapsis neuromuscular y Scribble (Scrib), una proteína involucrada en el mantenimiento de la concentración de vesículas sinápticas en los sitios de liberación durante la estimulación de alta frecuencia. Dlg, además participa en otros procesos, incluyendo el mantenimiento de la polaridad apicobasal de los epitelios, el control de la proliferación y la neurogénesis embrionaria.

Todas estas funciones han sido atribuidas a una sola isoforma, DlgA. Sin embargo, en nuestro laboratorio se aislaron una serie de transcritos que corresponden a variantes de procesamiento alternativo del gen *dlg* 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 de *dlg* que contienen S97N como la proteína denominada DlgS97, sólo se expresan en sistema nervioso y músculo, a diferencia de DlgA que también se expresa en células epiteliales.

En este trabajo se estudió el papel de las variantes del gen *dlg* con dominio S97N en la estructura y formación de la sinapsis de la unión neuromuscular de la larva.

Mediante análisis de "western blot" se determinó la proteína DlgS97 de ~116 kDa y al menos una variante de DlgA de ~97 kDa. Experimentos de ganancia y pérdida de función específicas para las variantes epitelial y neuronal muestran que las variantes que contienen el dominio S97N participan en el desarrollo de la sinapsis, afectando la morfología y el número de botones sinápticos, además de la expresión de la proteína Scrib y parcialmente la localización de FasII en la sinapsis. Esto difiere de lo observado para la pérdida de función de DlgA que no parece afectar la morfología o expresión de Scrib, aunque sí afecta el número de botones y la expresión de FasII.

Mediante ensayos en matriz sólida e inmunoprecipitación se logró determinar que el dominio S97N es capaz de formar homodímeros, sin interactuar con dominios de DlgA. Estos resultados sugieren que ambas isoformas participan en la sinapsis pero con funciones diferentes, formando complejos macromoleculares de manera independiente.

SUMMARY

“Participation of S97N domain of the Dlg protein in the development of the *Drosophila melanogaster* larval neuromuscular synapse.

The precise location of the synaptic components during development requires the arrangement of a protein network which includes scaffold proteins of the MAGUK family. The members of this family of proteins recruit receptors, ionic channels, signal transduction components and proteins of the cytoskeleton to macromolecular complexes through protein-protein interaction domains.

The neuromuscular synapse of the *Drosophila melanogaster* larva has been used as a model of mammalian central synapses. In this glutamatergic synapse, the scaffold protein Discs large (Dlg), a member of the MAGUK (membrane-associated guanylate kinases) family of proteins, has an important role in the formation of the synapse and in the localization of proteins involved in signal transduction.

It has been demonstrated that Dlg determines the synaptic localization of the Shaker K⁺ channel, of Fasciclin II (FasII), an adhesion molecule involved in the growth and plasticity of the neuromuscular synapse and of Scribble (Scrib), a protein involved in the maintenance of the synaptic vesicle pool in the release sites during high frequency stimulation. Dlg also participates in other processes, including the maintenance of the epithelial apico-basal polarity, the control of proliferation and embryonic neurogenesis.

All these functions have been attributed to a single isoform, DlgA. In our laboratory, however, a number of transcripts has been isolated that represent alternatively processed products of the gene *dlg*, these present a 5' region that

encodes a segment of 65 amino acids called S97N that is absent in DlgA. The variants S97N-containing protein denominated DlgS97 are only expressed in nervous system and muscle, unlike DlgA that is also expressed in epithelial cells. In this work, the role of Dlg variants with S97N domain in the structure and development of the neuromuscular junction was studied. Western blot analysis indicates the presence of the protein DlgS97 of 116 kDa and at least one variant of DlgA of 97 kDa. Loss of function and gain of function experiments specific for the epithelial and neuronal variants show that variants containing the S97N domain participate in the development of the synapse, affecting the morphology and number of synaptic boutons, together with the expression of Scrib and the partial localization of FasII at the synapse. This is different from the DlgA loss of function where the morphology or the expression of Scrib does not change, although the number of boutons and the expression of FasII is affected. By pulldown and immunoprecipitation assays it was possible to determine that the S97N domain is able to undergo homodimerization, but does not interact with domains of DlgA. These results suggest that both isoforms participate in the synapse but with different functions, forming macromolecular complexes in an independent way.

1. INTRODUCCIÓN

La comunicación entre neuronas y entre neuronas y células musculares a través de sinapsis químicas depende, en una medida importante, de la organización espacial y de la correcta yuxtaposición que existe entre los sitios de liberación de neurotransmisores (presinápticos) y los sitios en los que se encuentran los receptores de estos (postsinápticos). En la unión sináptica, opuesta a las zonas de liberación del neurotransmisor se encuentra el aparato de recepción postsináptico, un microdominio de la membrana postsináptica denominado densidad postsináptica (DPS), especializado en la recepción del neurotransmisor y que contiene una alta densidad de receptores a neurotransmisores y canales iónicos (Garner y cols., 2000; Sheng, 2001). Asociadas a los receptores de neurotransmisores se encuentran una serie de proteínas de transducción de señales, moléculas de adhesión y del citoesqueleto que forman grandes complejos proteicos. El reclutamiento de estos complejos y su organización requiere del ordenamiento preciso de las proteínas que los componen. Las denominadas proteínas andamio contienen varios dominios de interacción proteína-proteína y son componentes centrales de los complejos en los que participa una red de proteínas en la región submembrana de la célula, tanto pre como postsináptica. Estos complejos juegan un papel esencial en la maduración y la plasticidad sináptica (Funke y cols., 2005).

1.1. Proteínas de andamio

Entre las proteínas andamio involucradas en la determinación de la estructura sináptica en la sinapsis glutamatérgica, se encuentran proteínas pertenecientes a la familia MAGUK (“membrane-associated guanylate kinases”), que poseen tres dominios PDZ, identificados a partir de la similitud de secuencia entre la proteína de densidades postsinápticas de mamíferos (PSD-95), la proteína supresora de tumores de *Drosophila*, discs-large (Dlg) y la

proteína de uniones estrechas de vertebrados (Zonula occludens) (ZO-1); un dominio de homología src tipo 3 (SH3) y un dominio homólogo a guanilato quinasa (GUK) con baja o nula actividad quinasa. A través de estos dominios de interacción proteína-proteína se reclutan los componentes sinápticos (Kuhlendahl y cols., 1998; Sheng y Sala, 2001; Sierralta y Mendoza, 2004;).

Entre los miembros de la familia MAGUKs presentes en la sinapsis glutamatérgica de mamíferos se encuentran SAP97/hDLG, PSD-95/SAP90, SAP102/NE-DLG y Chapsina 110/PSD-93. PSD-95 es la principal proteína andamio de la densidad postsináptica (DPS), reclutando receptores de glutamato de tipo NMDA, neuroliginas, la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), y otras proteínas de transducción de señales y de asociación al citoesqueleto de actina mediante sus dominios PDZ (Cho y cols., 1992; Caruana, 2002).

1.2. El gen *dlg*

En la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, existe un único homólogo de la familia de proteínas PSD95/SAP90 denominada Dlg (discs large) (Woods y Bryant, 1991; Budnik y cols, 1996). Al igual que PSD-95, los productos del gen *dlg* se expresan en las sinapsis glutamatérgicas, donde se localiza a nivel pre y postsináptico. En la membrana postsináptica, productos del gen *dlg* se encuentran asociados al retículo subsináptico (RSS), una especialización de la membrana postsináptica que rodea el terminal presináptico en la sinapsis neuromuscular de la larva homóloga a la DPS en vertebrados (Lahey y cols., 1994).

Los estudios en la unión neuromuscular de *Drosophila* demuestran que el gen *dlg* es esencial para el desarrollo de una estructura y función apropiada de la sinapsis (Bundik, 1996).

Los productos del gen *dlg* localizan y reclutan proteínas sinápticas tales como el canal de K⁺ tipo Shaker (Tejedor y cols., 1997) y Fasciclina II (FasII), una molécula de adhesión celular homóloga a N-CAM de vertebrados

involucrada en el mantenimiento y los cambios en la plasticidad sináptica neuromuscular (Schuster y cols.,1996;Thomas y cols., 1997). Otra proteína asociada al complejo multiproteico de Dlg en la sinapsis es Scribble (Scrib), que está involucrada en el mantenimiento de la concentración de vesículas sinápticas en los sitios de liberación durante la estimulación de alta frecuencia (Roche y cols., 2002) (Fig.1). Productos del gen *dlg* colocalizan e interactúan indirectamente con Scrib, a través de la proteína GUK-holder (Guk-h), y son críticos en la localización sináptica normal de esta proteína (Mathew y cols., 2002).

Dlg en la sinapsis neuromuscular

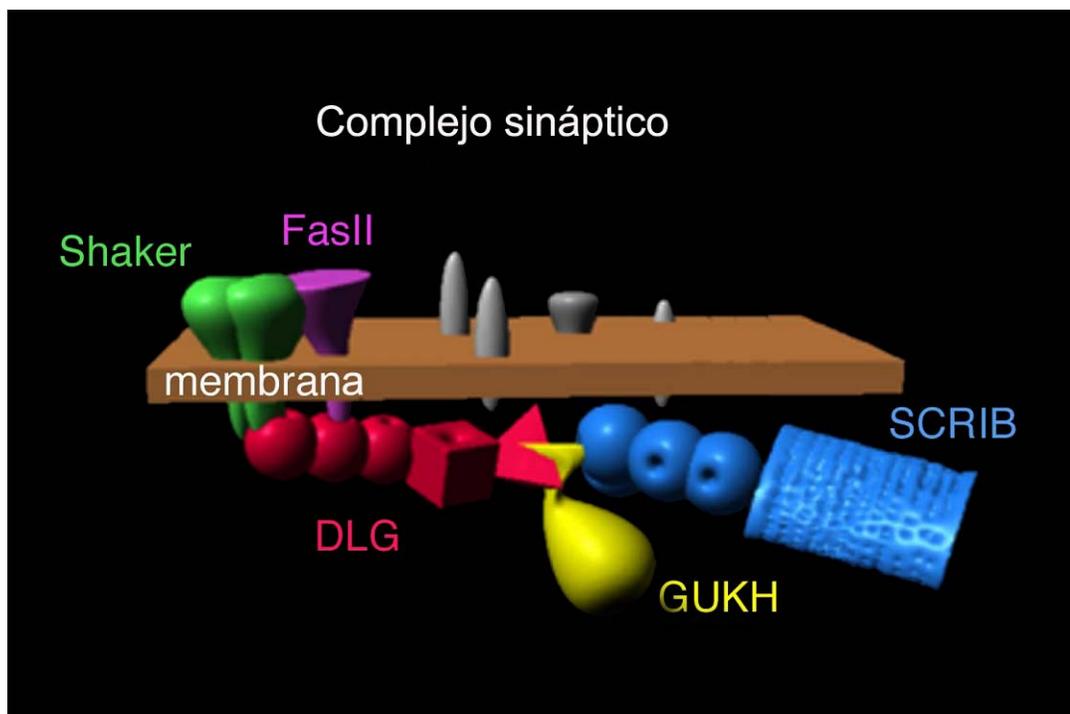


Figura 1. Esquema del complejo multiproteico formado por Dlg en la sinapsis neuromuscular glutamatérgica de *Drosophila melanogaster*.

Los dominios PDZ1-2 de Dlg interactúan con el motivo T/SXV presente en el C-terminal de Fasciclin II (FasII) y del canal de K⁺ tipo Shaker. A través del dominio GUK, Dlg se une a la proteína GUK-holder, la que a su vez interactúa con Scribble (Scrib). La localización sináptica adecuada depende de la presencia de Dlg (Mathew y cols. 2002).

Las mutantes *dlg* muestran una estructura pre y postsináptica anormal, junto con defectos fisiológicos tales como un aumento en la amplitud de las corrientes sinápticas y esto se correlaciona con la deslocalización de los canales de K⁺ tipo Shaker y con la disminución de la inmunorreactividad de FasII observada en estas mutantes (Budnik y cols, 1996).

El gen *dlg* no sólo participa a nivel sináptico, sino que tiene múltiples funciones. En epitelio juega un rol en el mantenimiento de la polaridad ápico-basal y el control de la proliferación (Woods y Bryant, 1991). Estudios previos han atribuido todas estas funciones a un único producto del locus *dlg*: Dlg-A, a pesar de que análisis de Northern y Western blot han demostrado la existencia de varios productos del gen *dlg* en larva y mosca adulta (Woods y cols, 1996).

1.3. El dominio S97N de las variantes del gen *dlg*

En nuestro laboratorio se realizaron análisis de cDNAs completos obtenidos de ESTs y de RT-PCR, mediante los cuales se aislaron una serie de transcritos que corresponden a variantes de procesamiento alternativo del gen *dlg*, y a la existencia de al menos tres inicios de transcripción alternativos (Mendoza y cols., 2003).

Un grupo de variantes presentan una región con cuatro exones en su extremo 5', ausentes en DlgA que contienen un segmento de 65 aminoácidos, homólogo al extremo amino-terminal característico de una proteína de asociación a sinapsis de rata, SAP97, denominado S97N (Wu y cols., 1998) (Fig.2).

Dentro de estas variantes se obtuvo el transcrito denominado DlgS97 de 2988 pb como producto de RT-PCR de RNA total de embriones. Este transcrito codifica para una proteína que contiene el dominio S97N seguido por los dominios PDZ1-2-3, SH3 y GUK, la proteína deducida tiene una masa molecular calculada de 104 kDa (Mendoza y cols.2003).

Cromosoma X

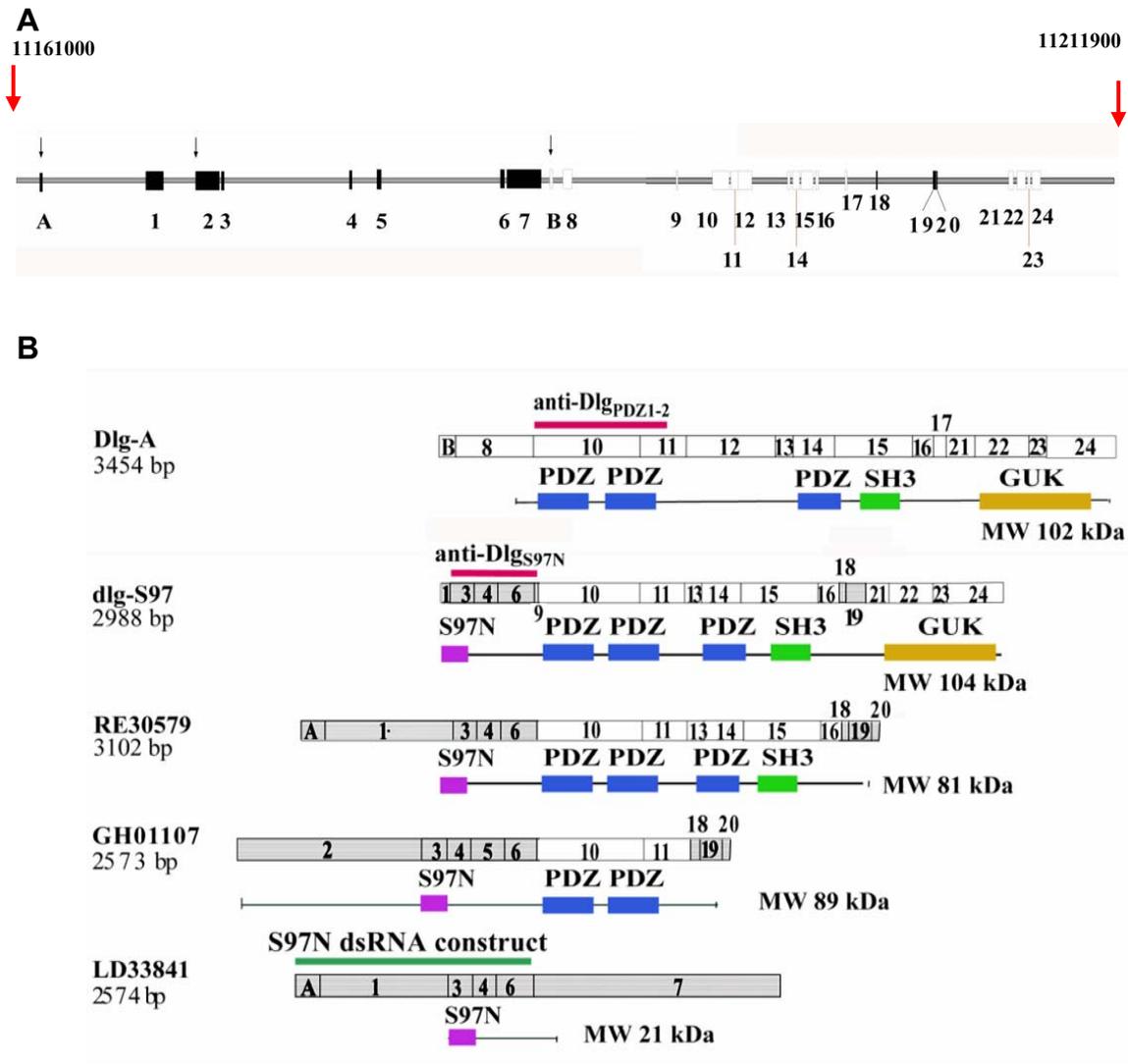


Figura 2. Variantes originadas del locus *dlg*.

A. Estructura genómica de *dlg*. Los números indican los exones traducidos. Las letras indican los exones no traducidos. Las cajas negras indican los exones ausentes en el transcrito DlgA, mientras que las blancas indican los exones presentes en DlgA. Las flechas negras verticales marcan los posibles sitios de inicio de transcripción del gen *dlg* deducidos de los 5' terminal de varios grupos de clones EST y cDNA.

B. Estructura de los transcritos deducidos de análisis de EST y RT-PCR de cDNA, 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_{PDZ1-2} (Koh y cols, 1999) y anti-Dlg_{S97N}. Debajo de cada transcrito se indica la estructura de la proteína deducida con sus dominios representados por cajas de colores. A la derecha se indica la respectiva masa molecular (MW) calculada. (Mendoza y cols. 2003).

En las mutantes *dlg* se observa la marcada disminución de la expresión de proteínas que contienen el dominio S97N, indicando que las proteínas con dominio S97N son productos del gen *dlg*. Mediante estudios de inmunocitología se determinó que los productos del gen *dlg* que contienen este dominio son predominantemente expresados en el cordón nervioso y en la unión neuromuscular, tanto en embriones como en larvas, encontrándose ausentes en tejido epitelial no neural a diferencia de DlgA que también se expresa en epitelio (Mendoza y cols 2003). Esto permite proponer que las diferentes funciones que realiza esta proteína podrían deberse a la expresión tejida específica de los diferentes productos del gen.

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, 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 (Mendoza y cols., 2003).

El dominio N-terminal de SAP97 fue identificado como una región que contiene un dominio L27 (Chetkovich, 2002), el que se caracteriza por ser un dominio de interacción para homo o heteromultimerización. Se sabe que el dominio N-terminal de la proteína SAP97 de mamíferos promueve la multimerización y controla la interacción intramolecular de dominios carboxilos de manera cis-regulatoria (Wu y cols 2000). Esto sugiere la posible multimerización de productos del gen *dlg* con dominio S97N.

De acuerdo a lo que se conocía en la literatura, el análisis de las proteínas asociadas a Dlg, Gukh y Scrib, consideró siempre a la única isoforma caracterizada, DlgA, donde se ha determinado que el dominio C-terminal de Gukh se une al dominio GUK de Dlg, así como al PDZ2 de Scrib formando un complejo sináptico multiproteico (Mathew y cols., 2002). Estudios recientes

proponen que las isoformas de Dlg neural tienen un dominio S97N que contiene una secuencia L27, entonces, las isoformas que contienen el dominio S97N podrían estar formando, al igual que en vertebrados, homo o heteromultímeros con otras MAGUKs (Bachmann y cols., 2003). Además el dominio L27 podría participar en la modulación de la unión entre su dominio GUK y su compañero de unión GUK-holder, formando un complejo entre Dlg, GUKh y Scrib en la sinapsis (Mathew y cols., 2002).

1.4. La unión neuromuscular como modelo de estudio

La unión neuromuscular de larvas de *Drosophila melanogaster* es un modelo de sinapsis glutamatérgica muy ventajoso ya que el tejido es accesible, de fácil manejo y comparte una serie de características con la sinapsis glutamatérgica de mamíferos (Budnik y Gramates 1999). Muchas de las moléculas involucradas en la transmisión sináptica son conservadas entre *Drosophila* y vertebrados y el desarrollo de la sinapsis a nivel molecular y celular es similar entre ambos (Keshishian y cols., 1996). Además *Drosophila* presenta un ciclo de vida relativamente corto que consta de cuatro fases: embrión, larva, pupa y adulto (Fig. 3).

La musculatura larval presenta simetría bilateral y está compuesta de aproximadamente 60 células multinucleadas repetidas segmentalmente. Los segmentos abdominales del A2 al A7 son equivalentes mientras que el A1 es levemente diferente (Keshishian y cols., 1996) (Fig. 4). Los músculos de la pared muscular de la larva son inervados por al menos tres clases de terminales nerviosos estructuralmente diferentes llamados botones sinápticos. Los botones sinápticos tipo I son glutamatérgicos, éstos inervan todos los músculos. Los botones tipo II contienen octopamina e inervan todos los músculos a excepción de ocho. La tercera clase de botones contienen péptidos tales como proctolina, péptido tipo insulina, o leucoquinina que inervan poblaciones discretas de fibras musculares (Budnik y cols., 1996; Budnik y

Gramates 1999; Koh y cols., 2000) (Fig. 5). En este trabajo, nos enfocaremos en los músculos 6 y 7, debido a que son inervados exclusivamente por botones tipo I específicamente el segmento abdominal número 3. Es importante recordar que Dlg se expresa en la membrana pre y postsináptica de los terminales tipo I, asociándose al RSS en la región postsináptica, el cual aparece pobremente desarrollado y muy simple en mutantes *dlg*, sugiriendo que este gen está involucrado en la regulación de la estructura y función de la sinapsis (Lahey y cols., 1994).

Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

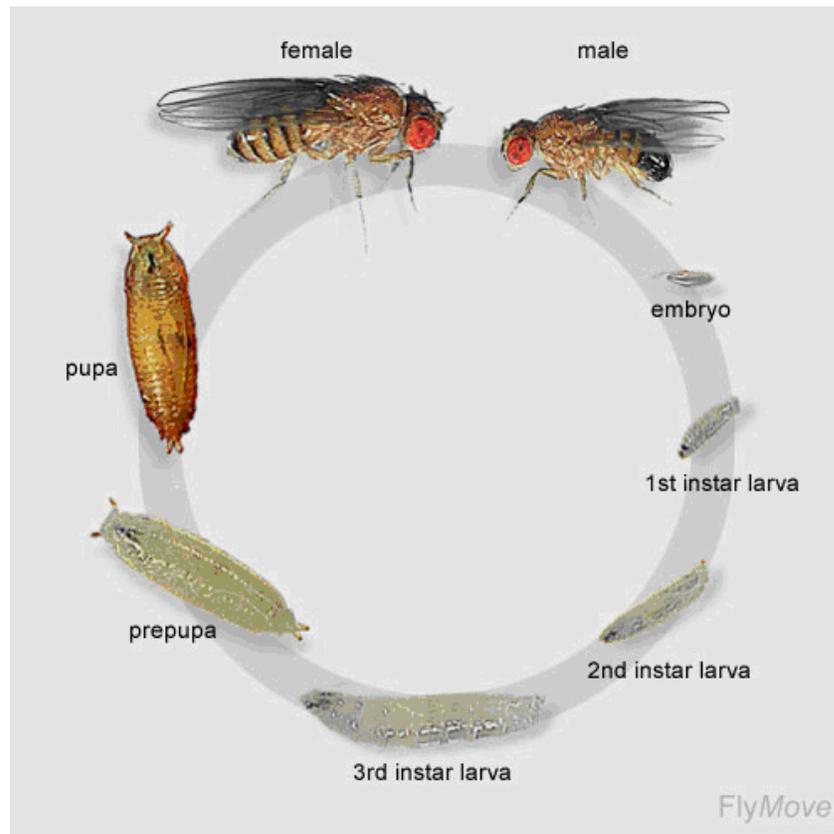


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Se señalan las etapas del desarrollo desde el embrión hasta la mosca adulta. Imagen obtenida de Flymove.

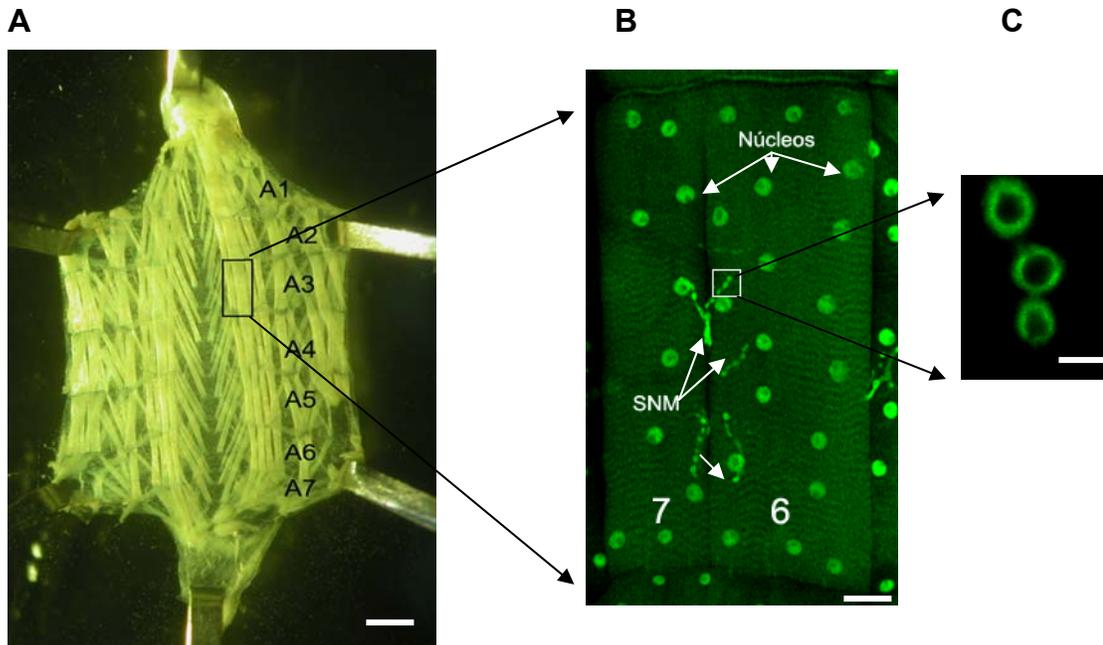


Figura 4: Pared muscular de larva de tercer estadio.

A: Preparación de pared muscular de larva de tercer estadio fijada con solución de Bouin. A1-A7 indican los segmentos abdominales 1-7. El recuadro negro indica los músculos 6 y 7 del segmento A3. Barra=200 μm . **B:** Músculos 6 y 7 de una larva que expresa GFP en núcleos y en la sinapsis neuromuscular (SNM). El recuadro blanco indica un grupo de botones sinápticos. Barra: 50 μm . **C:** Grupo de botones sinápticos marcados con GFP del músculo 6, segmento A3. Barra: 5 μm .

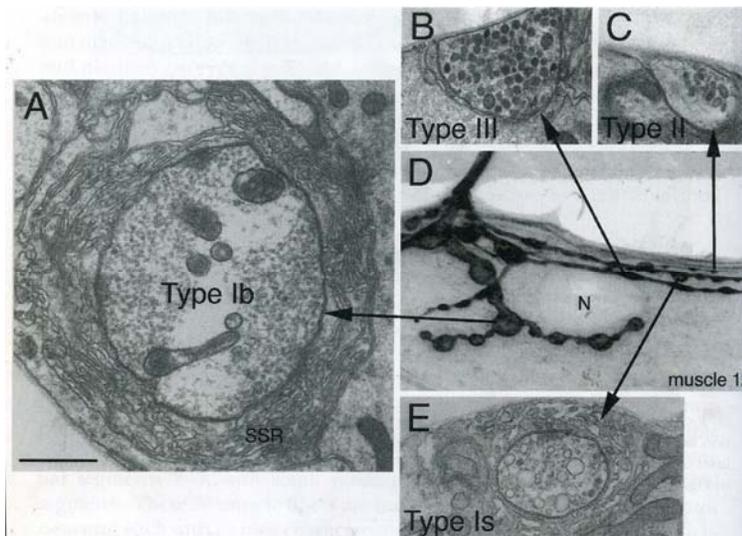


Figura 5: Clasificación de botones sinápticos.

A-E: Botones sinápticos observados mediante microscopía electrónica. **A:** Botones tipo Ib rodeados por el retículo subsináptico (SSR). **B:** Botones tipo II. **C:** Botones tipo III. **D:** Área correspondiente a un de ramificación de botones del músculo 12, N (núcleo). **E:** Botones tipo Is. Barra: 0.9 μm en A-C y E. 10 μm en D (Budnik y Gramates, 1999).

Los antecedentes presentados, sumados a la información disponible en la literatura respecto a la participación de productos de *dlg* en el mantenimiento de la estructura de la sinapsis neuromuscular en *Drosophila*, permiten postular que las variantes de *dlg* que contienen el dominio S97N participan en el desarrollo de la unión neuromuscular. Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la manipulación de la expresión de las variantes que contienen el dominio S97N y determinar si estas variantes son capaces de multimerizar y de interactuar con otros dominios. Estos estudios nos permitirán postular un papel de este dominio en la estructura y función de la sinapsis neuromuscular.

1.5. HIPÓTESIS

Sobre la base de los antecedentes presentados se propone la siguiente hipótesis:

“Las isoformas de *dlg* que contienen el dominio S97N son necesarias para el desarrollo normal de la sinapsis neuromuscular en larvas de *Drosophila melanogaster*”.

1.6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel que juegan los productos de *dlg* que contienen el dominio S97N en el desarrollo, plasticidad y función de la sinapsis neuromuscular de larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

1.7. Objetivos específicos

1. Determinar la localización subcelular precisa de las variantes del gen *dlg* que contienen el dominio S97N en botones sinápticos tipo I de larvas correspondientes al tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar el efecto de la inhibición de la expresión de las variantes del gen *dlg* que contienen el dominio S97N en el desarrollo de la unión neuromuscular en tercer estadio larval de *Drosophila melanogaster*.
3. Determinar los efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 y DlgA en el desarrollo de la unión neuromuscular en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.
4. Determinar si el dominio S97N tiene la capacidad de promover la formación de multímeros e interacciones (proteína-proteína) intermoleculares con otros dominios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

2.1.1 Cepas de *Drosophila melanogaster*:

Se utilizaron las siguientes cepas de moscas de la especie *Drosophila melanogaster* pseudo nativas y cepas transgénicas

Tabla 1. Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en esta tesis.

| Cepa | Característica | Origen |
|---|-------------------------------------|--|
| W1118 | Seudo nativa | Gentilmente donada por Dr. P.Labarca, CEC, Valdivia, Chile. |
| UAS-S97N-RNAi ⁵² | Expresión de RNAi-S97N | Gentilmente donada por Dr. U., Thomas. Federal Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania. |
| UAS-EGFP-DlgA | Expresión de DlgA | Gentilmente donada por Dr. U., Thomas. Federal Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania. |
| UAS-EGFP-DlgS97 ⁶³ | Expresión de DlgS97 | Gentilmente donada por Dr. U., Thomas. Federal Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania. |
| Gal 4-C57,UAS-EGFP-DlgS97 ⁶³ | Sobreexpresión de DlgS97 en músculo | Gentilmente donada por Dr. U., Thomas. Federal Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania. |
| Gal4-C57 | Expresión UAS en músculo | Gentilmente donada por Dra V., Budnik. U. of Massachussets Medical School, Worcester, M.A., EE.UU. |
| Gal4-C380 | Expresión UAS en motoneuronas | Gentilmente donada por Dra V, Budnik. U. of Massachussets Medical School, Worcester, M.A., EE.UU. |
| <i>dlg</i> ^{ex51-1} /Basc | Mutante nula de DlgA | Gentilmente donada por Dra V, Budnik. U. of Massachussets Medical School, Worcester, M.A., EE.UU. |
| <i>dlg</i> ^{XI-2} /Basc | Mutante hipomorfa de DlgS97 y DlgA | Gentilmente donada por Dr. U., Thomas. Federal Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania. |

- Cepas pseudo-nativas: Como cepa tipo silvestre, se utilizó la cepa pseudo-nativa W1118 que contiene una mutación en el gen *white*. Esta mutación tiene como consecuencia la pérdida total de pigmentación en los ojos de las adultas diferenciándolas de las cepas naturales que tienen los ojos color rojo.

- Cepas transgénicas: Se utilizó el sistema de expresión UAS-Gal4 para producir la sobreexpresión de la variante DlgS97 y dirigir la expresión de RNA de interferencia de las variantes con S97N. Las cepas transgénicas Gal4 utilizadas fueron Gal4-C57 con expresión específica de UAS en músculo y Gal4-C380 con expresión específica de UAS en motoneuronas (Budnik y cols., 1996). Las cepas UAS utilizadas fueron UAS S97N-RNAi⁵², UAS EGFP-DlgS97⁶³ y UAS EGFP DlgA (Bachmann y cols., 2004)

- Cepas mutantes: Como alelos mutantes de *dlg* se utilizó *dlg*^{XI-2}/Basc, mutante hipomorfa que presenta una deleción en el dominio GUK (Woods y cols 1996) y *dlg*^{ex51-1}/Basc, mutante nula que presenta una deleción en el inicio de transcripción de DlgA (Thomas 2004; resultados no publicados).

2.1.2 Mantención de moscas *Drosophila melanogaster*: Las moscas pseudo nativas y transgénicas se mantuvieron en botellas y tubos de crecimiento que contenían medio de cultivo estándar (levadura, glucosa, harina, agar, ácido propiónico, agua). Las cepas stock se mantuvieron en tubos a 18°C agregando alrededor de 30 moscas por tubo. Los experimentos se realizaron en botellas y tubos. En las botellas se crecieron alrededor de 50 moscas y se mantuvieron a 25°C. Se mantuvieron 10 moscas (tres machos y 7 hembras) por tubo a 25°C durante dos días y posteriormente se traspasó sólo la progenie a 29°C con el fin de utilizar las larvas de tercer estadio. La mantención de las moscas se realizó en incubadores programados a las temperaturas antes mencionadas (Ingeniería de climas para procesos, España).

2.2 Reactivos y Soluciones

Reactivos

Anticuerpos primarios:

- Anti-DIg_{S97N}, anticuerpo policlonal generado en nuestro laboratorio contra el producto de la secuencia de 410 pb desde el ATG del clon EST LP07807 (Mendoza y cols., 2003).
- Anti- DIg_{PDZ1-2}(4F3), anti- Fasciclina II (ID4), anti- Futsch (22C10), anti-Tubulina (12G10), anticuerpo monoclonal (Hibridoma Bank, Iowa, EE.UU.).
- Anti-Nc82, anticuerpo policlonal de ratón gentilmente proporcionado por el Dr. Francisco Tejedor, U. Miguel Hernández, Alicante, España.
- Anti-Scribble, anticuerpo policlonal de rata, gentilmente proporcionado por la Dra. Vivian Budnik, U. de Massachussets Medical School, Worcester, M.A., EE.UU.
- Anti-HRP, conjugado a Cy5 (Jackson InmunoResearch Labs, West Grove, Pensilvania, EE.UU.)

Anticuerpos secundarios:

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

Preparación de extractos de tejidos

- Medio de disección: NaCl 128 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 4 mM, HEPES 5 mM, sacarosa 35,5 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2.
- Medio de homogeneización (amortiguador 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, inhibidores de proteasas (leupeptina 5 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml). (AppliChem, Darmstadt, Alemania).
- Inhibidores de proteasas. (leupeptina, aprotinina, pepstatina). (AppliChem, Darmstadt, Alemania).
- Amortiguador de carga de muestras proteicas: Tris HCl 50 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%.
- Cámaras de disección magnéticas para larvas
- Pinzas N° 5 Detmoxel no magnéticas
- Tijeras quirúrgicas
- Homogeneizadores de vidrio (Kontes Glass Company, Vineland, New Jersey, EE.UU.).

Inmunohistoquímica

- Solución fijadora de Bouin no alcohólica: 25 mL de formalina 37,7%, 5 mL ácido acético glacial y 75 mL de ácido pícrico saturada.
- Formaldehído al 4% (Merck, Darmstadt, Alemania).
- BSA (suero bovino fetal) (GIBCO BRL, California, EE.UU.).
- Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- PT: PBS, Tritón X-100 0,1 %
- PBT: PBS, Tritón X-100 0,1 %, BSA 1 %
- PBTG: PBS, Tritón X-100 0,1 %, BSA 0,1 %, suero de ternera 5% (GIBCO BRL, California, EE.UU)
- Glicerol 80% (Winkler, Santiago, Chile).
- Medio de montaje para fluorescencia Vecta Shield (Vector Lab. Burlingame, California, EE.UU).

Western blot

- Marcador de peso molecular de proteínas preteñido, rango amplio 6-175 kDa (BioRad, Hercules, California, EE.UU.)
- Acrilamida (Winkler, Santiago, Chile)
- Bis-acrilamida (Winkler, Santiago, Chile)
- TEMED (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.)
- APS (Persulfato de amonio) (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.)
- Amortiguador de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%
- Amortiguador de transferencia: Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037%, metanol 20%.
- Metanol técnico (TCL, Santiago, Chile).
- Membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, California, EE.UU.)
- PBS (Phosphate Buffer Saline): Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 200 mM, pH 7,4.
- PBStw (Tween 20 0,05 % (v/v) en PBS 1X).
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- Solución de bloqueo: leche descremada en polvo 5%, Tween-20 0,05% en PBS
- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Illinois, EE.UU.).
- Placas fotográficas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra).
- Líquido revelador y líquido fijador (Kodak, Brasil).

Ensayos en matriz Sólida (Pull Down)

- Amortiguador de “pull down”: Tris HCl 20 mM pH 7,5, β-mercaptoetanol 1 mM, EDTA 3 mM, NaCl 150 mM, NP 40 1 %, PMSF 0,5 mM, inhibidores de proteasas (leupeptina 5 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml).
- Glutación conjugado a esferas de agarosa (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- Proteína de fusión GST-S97N (generada en el laboratorio)

- Soporte de inmunoafinidad activado (éster activado de agarosa) Affi-gel 10 Gel (BioRad, Hercules, California, EE.UU.).

Inmunoprecipitación

- Proteína A sefarosa recombinante, Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, EE.UU).
- TBST10x: NaCl 1,5 M, Tris HCl 1M pH7,5, Tween 20 0,2 %.
- IgG de ratón y de conejo (2 µg /µl) (Chemicon international, 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 de la variante DlgS97 y dirigir la expresión de RNA de interferencia de las variantes con 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 cepa que “responde”, en la que el gen de interés se clona bajo el control de 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. La expresión sólo se producirá en los tejidos y en el momento del desarrollo que el promotor fusionado a Gal4 esté activo. La eficacia de este sistema es dependiente de temperatura, siendo baja a 18° C, intermedia a 25° C y máxima a 29° C. (Fig. 6).

Mantenimiento de las cepas: Las moscas seudo nativas y transgénicas se mantuvieron en tubos de crecimiento que contenían medio de cultivo estándar (levadura, glucosa, harina, agar, ácido propiónico, agua). Los experimentos que requerían el sistema UAS-Gal4 se realizaron en tubos. Se crecieron 10 moscas por tubo, 3 machos (UAS) y 7 hembras (Gal4)(Tabla 2) y se mantuvieron a 25°C y posteriormente al llegar al primer estadio de larva se pasaron a 29°C. Para

estos experimentos se utilizaron incubadores programados a dichas temperaturas (Ingeniería de climas para procesos, España).

Tabla 2: Resumen de las cruzas realizadas en esta tesis

| Macho | Hembra | Características |
|-------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| W1118 | Gal4-C57 | Control de expresión postsináptica |
| W1118 | Gal4-C380 | Control de expresión presináptica |
| UAS-S97N-RNAi ⁵² | Gal4-C57 | Expresión postsináptica de RNAi-S97N |
| UAS-S97N-RNAi ⁵² | Gal4-C380 | Expresión presináptica de RNAi-S97N |
| UAS-EGFP-DlgA | Gal4-C57 | Expresión postsináptica de DlgA |
| UAS-EGFP-DlgA | Gal4-C380 | Expresión presináptica de DlgA |
| UAS-EGFP-DlgS97 ⁶³ | Gal4-C380 | Expresión presináptica de DlgA-S97 |
| UAS-EGFP-Tau | Gal4-C57 | Expresión postsináptica de Tau |

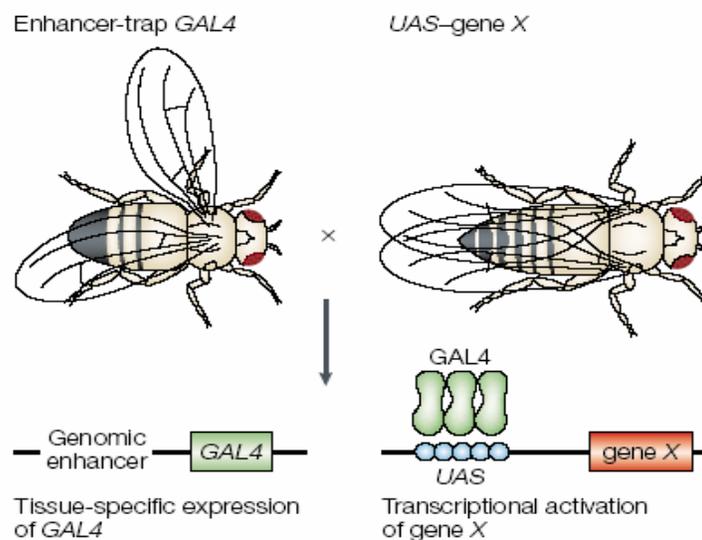


Figura 6: Esquema del sistema UAS-GAL4 como herramienta para dirigir expresión de genes.

El activador transcripcional de levadura Gal4 se une a la secuencia de activación río arriba (UAS) la cual está unida al gen de interés (gen X). El gen Gal4 se inserta al azar en el genoma de *Drosophila* generándose líneas (enhancer trap) que tendrán un patrón de expresión específico. Por lo tanto la expresión del gen X será dirigida por alguno de estos patrones de expresión gracias al cruce apropiado entre la línea enhancer trap Gal4 y el transgen X unido a UAS.

Inmunohistoquímica:

Para realizar los experimentos de inmunohistoquímica en larva de tercer estadio se colectaron larvas que ascienden por las paredes del vial sin espiráculos visibles. Las larvas se colocaron en medio de disección frío y se inmovilizaron fijando sus extremos anterior y posterior con alfileres entomológicos con la región dorsal hacia arriba. Una vez inmovilizadas se disectaron realizando un corte longitudinal desde el extremo posterior al anterior llegando hasta la mandíbula. Una vez abiertas se descartaron las vísceras, los discos imaginales y el cerebro, dejando solamente la pared muscular, la que es abierta completamente con otros alfileres, dejando los músculos expuestos y estirados. El material así dispuesto se fijó con solución de Bouin no alcohólica durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las larvas que expresan GFP fueron fijadas en formaldehído al 4% por 30 minutos. Posteriormente se lavaron 4 veces durante 15 minutos con PT (PBS, Tritón X-100 0,1 %) y luego se bloquearon durante 30 minutos con PBTG (PBS, Tritón X-100 0,1 %, BSA 0,1 % y suero de ternera 5%) para posteriormente incubar con el anticuerpo primario a 4°C toda la noche. Después de lavar nuevamente 4 veces durante 15 minutos con PT las paredes musculares se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 4 veces durante 15 minutos con PT, se equilibraron con glicerol 80% durante una hora y finalmente se montaron en “vecta shield” sobre un portaobjetos. Las inmunohistoquímicas triples se realizaron en el siguiente orden: las paredes musculares fijadas se incubaron primero con el anticuerpo anti-Dlg_{S97N} junto con anti-Dlg_{PDZ1-2}, anti-FasII, anti-Scrib, NC82 o anti-Futsch (22C10) y se lavaron con PT. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-HRP conjugado con un fluoróforo y los anticuerpos secundarios anti- conejo y anti-ratón conjugados con rodamina o fluoresceína (Tabla 3).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para experimentos de inmunofluorescencia.

| Anticuerpo Primario | Dilución | Anticuerpo Secundario Fluorescente | Dilución |
|----------------------------|----------|---------------------------------------|----------|
| Anti-Dlg _{S97N} * | 1/2000 | Alexa Fluor 488/ Cy3 | 1/500 |
| Anti-22C10** | 1/200 | Alexa Fluor 546 | 1/500 |
| Anti-Dlg _{PDZ} ** | 1/500 | Alexa Fluor 546 | 1/500 |
| Anti- FasII** | 1/5 | Alexa Fluor 546 | 1/500 |
| Anti-Nc82* | 1/50 | Alexa Fluor 488 | 1/500 |
| Anti-Scribble** | 1/1000 | Alexa Fluor Cy3 | 1/500 |
| Anti-HRP* | 1/200 | Cy5 | ----- |

Anticuerpos primarios utilizados en la Inmunohistoquímica con sus correspondientes anticuerpos secundarios. *Anticuerpo policlonal. **Anticuerpo monoclonal.

Microscopía confocal de fluorescencia: La microscopía confocal de fluorescencia se realizó con un microscopio Zeiss LSM Meta 510. Las imágenes se procesaron a una resolución de 72 pixeles, se grabaron en formato tiff y se reguló el brillo y contraste en el programa Photoshop cs versión 8.0.1.

Western Blot

Preparación de extractos de pared muscular de larva de tercer estadio: Las larvas de tercer estadio se colectaron de las botellas de crianza y se colocaron sobre una cámara magnética, luego de agregar el amortiguador salino de disección frío (NaCl 128 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 4 mM, HEPES 5 mM, sacarosa 35,5 mM y EGTA 1 mM, pH 7,2). Se dejó sólo la pared muscular inmovilizada sobre la cámara de disección. Una vez que se disecaron 10 larvas, éstas fueron homogeneizadas manualmente sobre hielo en un homogeneizador de vidrio que contenía 100 µl de amortiguador RIPA para 10 larvas. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos recolectando el sobrenadante. Se separó 2 µl de cada extracto para determinar su concentración de proteínas. El resto del homogeneizado fue mezclado con amortiguador de carga y almacenado 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 seroalbúmina de bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración.

Electroforesis en condiciones desnaturalantes: Los distintos extractos fueron separados por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida. Se cargó una cantidad equivalente de microgramos de proteínas totales fue cargada en cada carril correspondiente a una larva por carril y se resolvieron en un gel de acrilamida al 8%. Cada gel se sometió a un voltaje constante de 110 volts hasta la caída del frente de corrida.

Inmunomarcación en membranas de nitrocelulosa: Las proteínas separadas electroforéticamente en condiciones desnaturalantes fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a 110 volts. Una vez terminado este proceso se bloqueó la nitrocelulosa, con el fin de bloquear los sitios sin proteínas, usando leche descremada al 5 % en PBS tween 0,5 % y agitación constante a T° ambiente durante 1 hora. Una vez transcurrido este periodo la nitrocelulosa se incubó con el primer anticuerpo disuelto en PBS tween 0,5 % durante toda la noche con agitación a 4°C. Los anticuerpos usados fueron un anticuerpo policlonal purificado anti-Dlg_{S97N} (1:300) generados en conejo, un anticuerpo monoclonal anti-Fasciclina II (1:3000) y un anticuerpo monoclonal anti- Dlg_{PDZ1-2}, ambos anti-ratón (1:3000). Como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-tubulina (1:500), generado en ratón (Tabla 4). Luego de incubar con el anticuerpo primario se lavó 4 veces con agitación durante 5 minutos con PBS Tween 0,5% a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:10.000) o anti-ratón (1:3000) acoplado a peroxidasa de rábano disuelto en PBS Tween 0,5%- leche descremada 5 % durante 1 hora agitando a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS- Tween 0,5%. La presencia de la marca fue detectada por quimioluminiscencia, exponiendo la película fotográfica en oscuridad. La placa se reveló en forma manual

sumergiéndola durante 3 minutos en una solución reveladora, lavada y posteriormente 5 minutos en una solución fijadora.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para experimentos de Western blot.

| Anticuerpo primario | Dilución | Anticuerpo Secundario | Dilución |
|---------------------------------------|----------|-----------------------|----------|
| Anti-Dlg _{S97N} (purificado) | 1:200 | Anti-IgG de conejo | 1:10000 |
| Anti-Dlg _{PDZ} | 1:3000 | Anti-IgG de ratón | 1:3000 |
| Anti- FasII | 1:3000 | Anti-IgG de ratón | 1:3000 |
| Anti- Tubulina | 1:200 | Anti-IgG de conejo | 1:10000 |

Anticuerpos primarios utilizados en western blot con sus correspondientes anticuerpos secundarios.

Ensayo de asociación en matriz sólida (Pull down):

Para realizar los extractos de pared muscular, se disecaron larvas de tercer estadio como se describió anteriormente. Luego se homogeneizó 20 larvas en 200 μ l de amortiguador de homogeneización para “pull down” (PD) manteniendo la preparación siempre en hielo para evitar la degradación de proteínas debido a la acción de proteasas propias de la larva. Posteriormente se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, se separaron 10 μ l para el control de carga y el extracto restante se dividió, tomándose una alícuota de 90 μ l a la que se agregó 50 μ l de GST conjugado con esferas de agarosa como control y otra alícuota de 90 μ l del extracto a la que se agregó 50 μ l de proteína de fusión GST-S97N unida a esferas de agarosa. Ambas se llevaron a un volumen final de 600 μ l con amortiguador PD. Luego de incubar toda la noche con agitación a 4°C se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se sometió a una serie de lavados de 15 minutos, 1 vez con amortiguador PD, 4 veces con amortiguador PD 0,1% NP40 y 1 vez con amortiguador PD sin detergente. Se eliminó el sobrenadante agregando a las bolitas 30 μ l de

amortiguador de carga 3X. El mismo procedimiento se realizó en paralelo con las columnas de afinidad Affi-gel-10, analizando las muestras por western blot.

Inmunoprecipitación:

Se homogeneizó 40 paredes musculares de larva de tercer estadio en 300 µl de amortiguador RIPA. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos rescatando el sobrenadante, al cual se agregaron 100 µl de proteína A (lavada en TBST) y 300 µl de TBST y se incubó durante 4 horas a 4°C en agitación, con el fin de eliminar la unión inespecífica (preabsorción). Nuevamente se rescató el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas totales. Posteriormente se incubó 1000 µg de proteínas totales con 50 µl de proteína A y 5 µg de IgG inespecífica como control negativo. En paralelo se incubó 1000 µg de proteínas totales con 50 µl de proteína A adicionando el anticuerpo específico dirigido contra la proteína de estudio, 5 µg para anticuerpos purificados y 2 µl para sueros, se llevó a un volumen final de 700 µl y enseguida se incubó toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Beckman GS-15R, rotor F2402H a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces durante 15 minutos a 4°C con TBST en agitación. Después de cada lavado se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 rpm para decantar las esferas de agarosa y no arrastrarlas al eliminar el sobrenadante. Finalmente se resuspendieron las esferas en 40 µl de amortiguador de carga 3X, analizando las muestras mediante western blot.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico no paramétrico se realizó mediante el uso del software Microsoft Office Excel 2003 utilizando la prueba T de student. Para esto se trabajó con la media de datos independientes determinando, la desviación estándar y el error estándar medio (SEM).

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de la localización subcelular de las variantes del gen *dlg* que contienen el dominio S97N en botones sinápticos tipo I de larvas correspondientes al tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.

Con el fin de determinar el patrón de expresión de las variantes con dominio S97N se realizaron experimentos de inmunohistoquímica en larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*, analizando los botones tipo I localizados en un sector del tercer segmento abdominal de los músculos 6 y 7 de la larva. Tanto el anticuerpo anti-Dlg_{PDZ1-2} como el anticuerpo anti-Dlg_{S97N} marcan exclusivamente los botones tipo I, colocalizando completamente. Esto confirma que los principales productos proteicos con dominio S97N también contienen dominios PDZ. (Fig. 7).

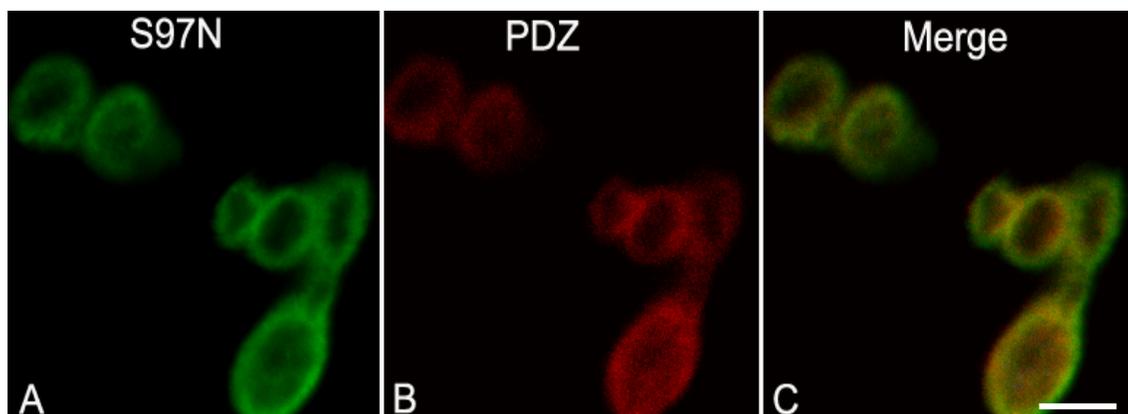


Figura 7: Expresión de las variantes de Dlg con dominio S97N.

Imágenes de microscopía confocal de tejidos de larvas de tercer estadio de cepa silvestre. **A:** anti-Dlg_{S97N} revelado con anticuerpo anti-conejo conjugado con alexa 488 (verde) y **B:** anti-Dlg_{PDZ1-2}, revelado con anticuerpo anti-ratón conjugado con alexa 546 (rojo). **C:** corresponde a la imagen compuesta. Anti-Dlg_{S97N} y anti-Dlg_{PDZ1-2} colocalizan completamente. Los experimentos se realizaron en triplicado y se observaron sólo los botones del segmento A3 de la larva. Barra: 5 µm.

Para determinar la localización subcelular más precisa de las isoformas con dominio S97N se utilizaron marcadores sinápticos de localización conocida como FasII que se encuentra presente en la membrana pre y postsináptica y Scrib que se encuentra en la membrana postsináptica, las cuales además son conocidas por interactuar con Dlg y por esto se determinó además su

colocalización con anti-Dlg_{S97N}. El anticuerpo anti-HRP fue utilizado como marcador neuronal para determinar la estructura presináptica (Fig.8). Para analizar la expresión a nivel presináptico se utilizaron además de HRP los anticuerpos anti-Futsch (22C10) como un marcador presináptico y Nc82 como marcador de zonas activas, que corresponden a los lugares de liberación de los neurotransmisores. Todos estos marcadores indicaron que estos productos del gen *dlg* se expresan en la membrana presináptica y de manera más abundante en la zona postsináptica excluidos de las zonas activas (Fig.9).

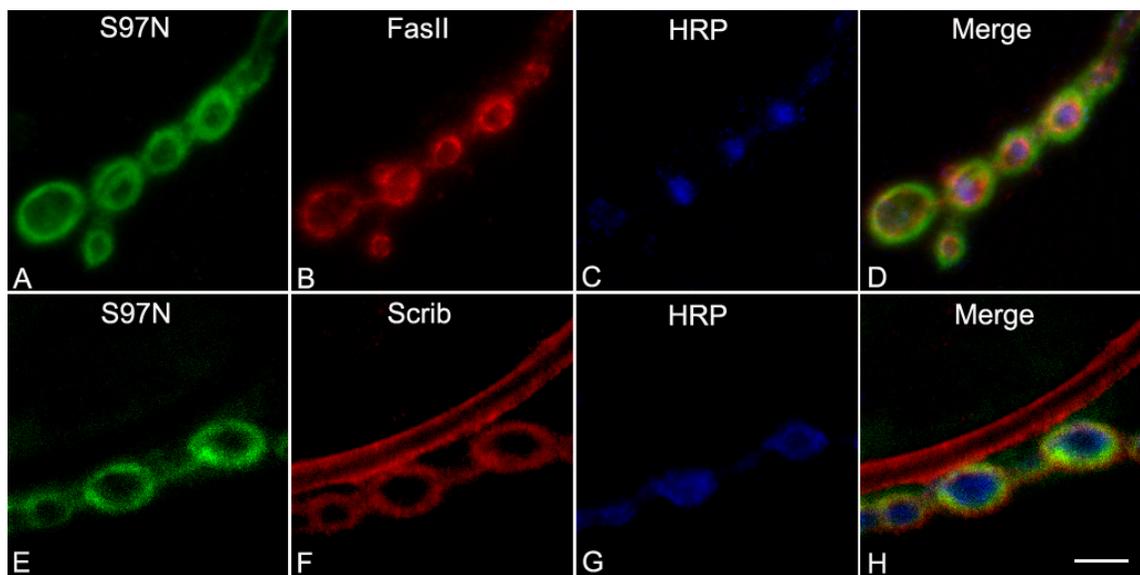


Figura 8: Colocalización de Fas II y Scrib con las variantes de Dlg que contienen el dominio S97N.

Patrón de expresión de las isoformas que contienen el dominio S97N en botones sinápticos tipo I del segmento A3. Se muestran inmunohistoquímicas triples Anti-Dlg_{S97N} (**A y E**) revelado con anticuerpo anti-conejo conjugado con alexa 488 (verde), FasII (**B**), Scribble (**F**) revelados con anticuerpo anti-rata conjugado con alexa 546 (rojo), HRP(**C y G**) acoplado al fluoróforo 633 (azul) (**D y H**): Imágenes compuestas. Las variantes que contienen el dominio S97N se localizan tanto a nivel pre como postsináptico, con mayor presencia a nivel postsináptico, y colocalizan además con FasII y Scrib. Los experimentos se realizaron en triplicado y se observaron sólo los botones del segmento A3 de la larva. Barra: 5µm.

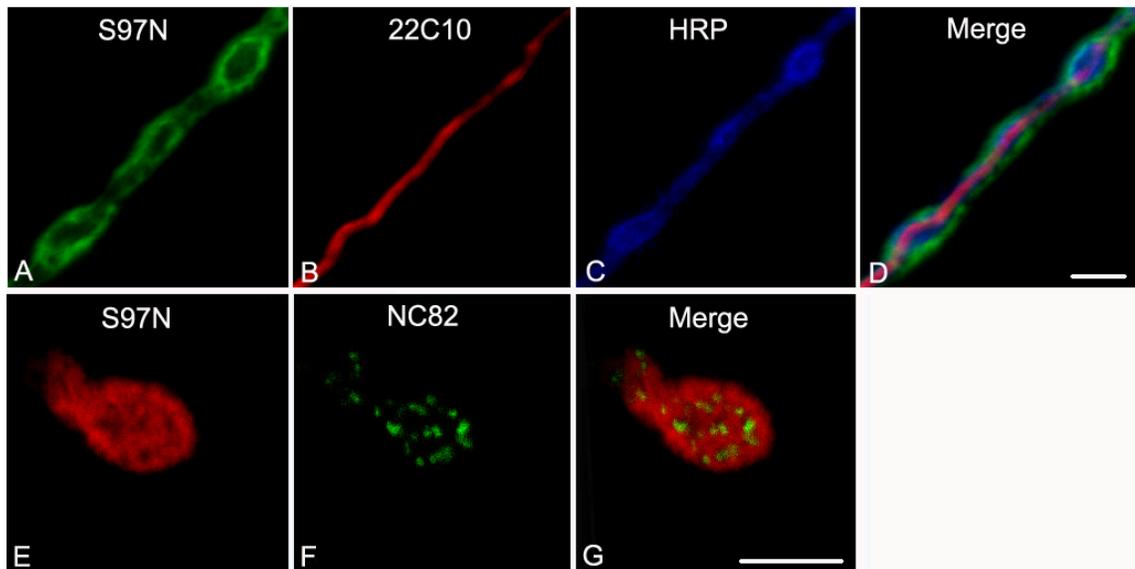


Figura 9. Patrón de expresión de las variantes con dominio S97N utilizando marcadores presinápticos A-D: Se muestran inmunohistoquímicas triples Anti-Dlg_{S97N} revelado con anticuerpo anti-conejo conjugado con alexa 488 (verde) (A) y alexa 546 (rojo) (E), anti futsch (22C10) revelado con anticuerpo anti-ratón conjugado con alexa 546 (rojo) (B), HRP acoplado al fluoróforo 633 (azul) (C). E-G: Se muestran inmunohistoquímicas dobles. Anti-Dlg_{S97N} revelado con anticuerpo anti-conejo conjugado con alexa 546 (E), NC82 revelado con anticuerpo anti-ratón conjugado con alexa 488 (F), (D y G): Imágenes compuestas. Las variantes que contienen el dominio S97N se localizan a nivel presináptico sin embargo no se observan en los axones ni en las zonas activas. Los experimentos se realizaron en triplicado y se observaron sólo los botones del segmento A3 de la larva. Barra: 5 μ m.

3.2. Determinación del efecto de la inhibición de la expresión de las isoformas que contienen el dominio S97N en el desarrollo de la unión neuromuscular.

Con el objetivo de inhibir la expresión de las isoformas que contienen el dominio S97N se utilizó la técnica de RNA de interferencia, mediante la expresión selectiva de construcciones de dsRNAi, usando el sistema UAS-Gal4. Se utilizaron las cepas Gal4-C57 y Gal4-C380 que son de expresión larval y específica de músculo estriado y motoneuronas, respectivamente. La expresión larval en estas cepas elimina la función de las variantes con dominio S97N, sin interferir en la función de Dlg en el desarrollo temprano del sistema nervioso. Para determinar los efectos de la inhibición de los productos del gen *dlg* que contienen el dominio S97N se estudió la morfología y número de botones sinápticos, así como la localización subcelular de aquellas proteínas cuya

localización depende de Dlg en larvas en que se ha inhibido la expresión de los productos del gen *dlg*.

La efectividad de las construcciones de RNAi para eliminar las variantes específicas se determinó mediante inmunofluorescencia y análisis de Western blot. A través de inmunohistoquímica se observó un efecto diferencial en la inmunorreactividad de anti-Dlg_{S97N} y anti-Dlg_{PDZ1-2} de los botones sinápticos de larvas que expresan RNAi específico para S97N bajo el control de Gal4-C57 (expresión muscular). Éstas presentan una drástica reducción de la inmunorreactividad del anticuerpo anti-Dlg_{S97N} y causa una moderada reducción del total de Dlg revelado mediante inmunofluorescencia con anti-Dlg_{PDZ1-2}, a diferencia de la cepa control donde ambos anticuerpos presentan una inmunorreactividad fuerte y similar entre ellos. Esto indica la presencia de otra proteína con dominios PDZ y carente del dominio S97N (Fig.10).

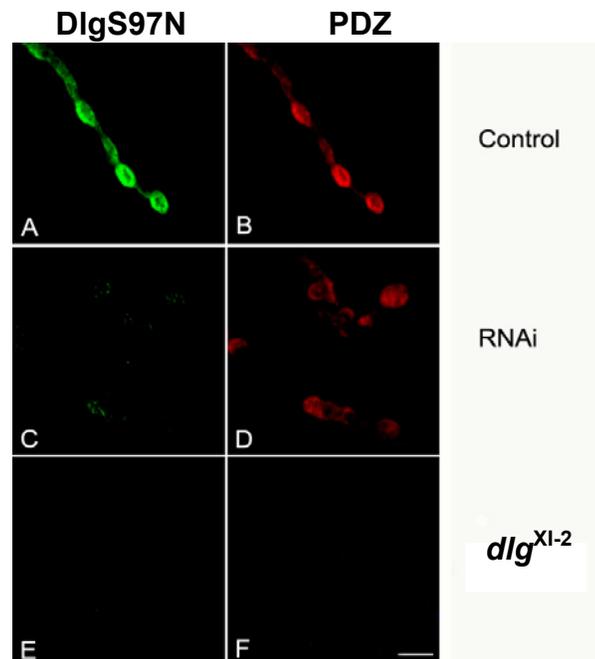


Figura 10: Efecto diferencial en la inmunorreactividad de anti-Dlg_{S97N} y anti-Dlg_{PDZ1-2} de RNAi específico para S97N en unión neuromuscular larval.

A-B: Botones tipo I de larvas control presentan una fuerte inmunorreactividad para ambos anticuerpos, anti-Dlg_{S97N}(**A**) y anti-Dlg_{PDZ1-2}(**B**). **C-D:** Expresión del transgen RNAi específico para S97N en músculos. Presenta una dramática reducción de las variantes con dominio S97N (**C**) y causa una moderada reducción del total de Dlg revelado en inmunofluorescencia por anti-Dlg_{PDZ1-2}(**D**). **E-F:** Botones tipo I de larvas mutantes *dlg*^{XI-2}, las cuales presentan una pérdida de expresión de DlgS97 y DlgA, observándose una drástica disminución de la inmunorreactividad a anti-Dlg_{S97N} (**E**) y anti-Dlg_{PDZ1-2} (**F**). Barra: 5 µm

En el análisis de Western blot se utilizó como control positivo la cepa pseudo nativa W1118. Para dirigir la expresión de RNA de interferencia de las variantes con S97N se realizaron las siguientes cruzas de cepas transgénicas: UAS-S97N-RNAi x GAL4-C380 que corresponde a la expresión en motoneuronas del RNAi específico para S97N y UAS-S97N-RNAi x GAL4-C57 que se expresa en músculo. Como control de la pérdida de DlgA se utilizó la mutante *dlg*^{ex51-1} la cual presenta una deleción en el inicio de la transcripción de DlgA inhibiendo su expresión y como control de la pérdida del gen *dlg* se utilizó la mutante *dlg*^{XI-2}, mutante que presenta una deleción en el dominio GUK y que afecta la expresión de todos los productos del gen (Mendoza y cols., 2003). Se utilizaron larvas de tercer estadio nacidas de las distintas cepas y los homogeneizados de la pared muscular de estas cepas se analizaron mediante la técnica de western blot con los anticuerpos primarios anti-Dlg_{S97N}, anti-Dlg_{PDZ1-2}, anti-FasII y anti-Tubulina (Fig.11). Es importante recordar que el anticuerpo anti-Dlg_{PDZ1-2} reconoce dominios PDZ, y en consecuencia reconoce tanto a DlgA, como a variantes con dominio S97N, tales como DlgS97.

En los extractos de pared muscular de la cepa silvestre se detectaron dos bandas inmunorreactivas a anti-Dlg_{PDZ1-2} de ~116 kDa y ~97 kDa, y sólo una banda inmunorreactiva a anti-Dlg_{S97N} de ~116 kDa. Esta banda revelada por ambos anticuerpos correspondería a DlgS97, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que DlgA (102 kDa calculados) y DlgS97 (104 kDa calculados) estén ambas presentes en la banda de ~116 kDa. La banda de ~97 kDa revelada sólo con anti-Dlg_{PDZ1-2} correspondería a una variante de procesamiento de DlgA de menor peso molecular (87,2 kDa calculado). En los extractos de pared muscular revelados con anti-Dlg_{S97N} y anti-Dlg_{PDZ1-2} no se observó la presencia de otras variantes con menor peso molecular.

En los extractos de la crusa UAS-S97N-RNAi x Gal4-C57 sólo se observó una disminución en la intensidad de la banda inmunorreactiva a anti-Dlg_{PDZ1-2} de ~116 kDa, mientras que la banda de ~97 kDa permaneció similar al control; sin embargo, la banda de ~116 kDa no desapareció completamente,

sugiriendo que la variante DlgA estaría presente en esa banda o que la inhibición de la expresión no fue completa. Utilizando el anticuerpo anti-Dlg_{S97N} se observó una drástica disminución de la banda de ~116 kDa correspondiente a DlgS97.

En los extractos de la crucea UAS-S97N-RNAi x Gal4-C380 el nivel de expresión de las isoformas es muy similar al control y no se observa una disminución significativa. La mutante *dlg*^{XI-2} no presentó banda inmunorreactiva para anti-Dlg_{S97N} ni para anti-Dlg_{PDZ1-2}, lo que da cuenta de que esta cepa carece de la expresión de ambas isoformas, mientras que la mutante *dlg*^{ex51-1} presenta una banda reactiva muy intensa a anti-Dlg_{S97N} y anti-Dlg_{PDZ1-2} de ~116 kDa correspondiente a la isoforma DlgS97.

Al incubar la membrana nitrocelulosa con anti-FasII se observó una banda con intensidad similar en cada uno de los extractos con un peso correspondiente a ~100 kDa, presentando una leve disminución en las mutantes *dlg*^{XI-2} y *dlg*^{ex51-1}.

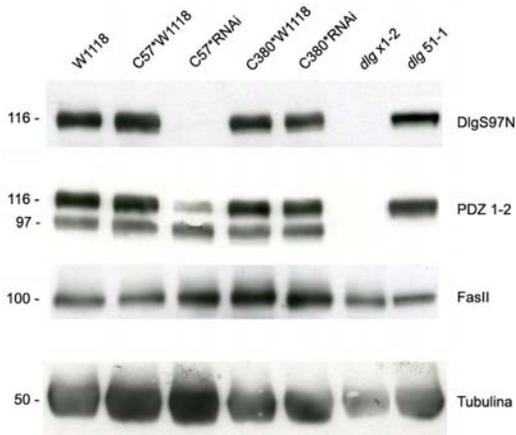


Figura 11. Reducción de la expresión de las variantes con dominio S97N a través de RNA interferente.

Análisis de Western Blot de extractos de pared muscular de larvas control (W1118, W1118xC57 y W1118xC380), larvas que expresan un UAS-S97N-RNAi bajo el control de Gal4-C57 (músculo) o Gal4-C380 (motoneuronas) y larvas mutantes *dlg*^{ex51-1} y *dlg*^{XI-2}. Se cargaron 30 µg. de extracto de pared muscular en cada carril. Los extractos fueron resueltos por electroforesis en condiciones denaturantes, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos anti Dlg_{S97N} (1:300), anti-FasII (1:3000), anti- Dlg_{PDZ1-2}(1:3000) y anti-tubulina (1:500) como control de carga. La banda de ~116 kDa detectada por anti-Dlg_{S97N} es fuertemente reducida por la expresión de UAS-S97N-RNAi bajo el control del promotor muscular, en cambio bajo el control neuronal la reducción es muy débil. Usando el anticuerpo anti-Dlg_{S97N} se observa una menor reducción de la banda de ~116 kDa en comparación con la reducción detectada con anti-Dlg_{PDZ1-2}. Las bandas inmunorreactivas a anti-FasII disminuyen levemente en las mutantes *dlg*^{ex51-1} y *dlg*^{XI-2}.

Con el objetivo de analizar el efecto de la disminución de la expresión de variantes específicas en la morfología de los botones sinápticos y su efecto sobre proteínas relacionadas con Dlg se observaron los terminales nerviosos de los músculos 6 y 7 del segmento A3 en larvas que expresan RNAi a nivel pre o postsináptico y se estudió la localización de proteínas sinápticas conocidas que requieren de Dlg para una localización sináptica normal como FasII y Scrib. Para esto se utilizaron anticuerpos contra dichas proteínas y se comparó con la unión neuromuscular de cepas de tipo silvestre. En la sinapsis neuromuscular de larvas que expresan RNAi en la membrana postsináptica se observó una drástica disminución de la expresión de la inmunorreactividad de anti DlgS97N y de Scrib (Fig.12). La inmunofluorescencia de FasII no disminuye significativamente, pero sí se pierde su localización específica (Fig. 13). En la mutante *dlg*^{XI-2} ocurre algo muy similar a lo que sucede con la expresión de RNAi a nivel postsináptico con una localización difusa de FasII y una drástica disminución de la inmunorreactividad de anti-Dlg_{S97N} y anti- Scrib. Sin embargo, en la mutante *dlg*^{ex51-1} que no expresa DlgA fue posible observar que FasII no pierde su localización específica, pero sí disminuye su inmunorreactividad. En cambio las proteínas Dlg y Scrib aumentan drásticamente su expresión, como se observa por el incremento de la unión de los anticuerpos anti-Dlg_{S97N} y anti- Scrib. (Fig. 12). Las larvas que expresan RNAi en motoneuronas no presentan una disminución notoria de la expresión de las variantes con dominio S97N, ni de las proteínas asociadas a Dlg, Scrib (Fig. 14.I) y FasII (14.II)

Para determinar el efecto asociado a la pérdida de expresión de las variantes con S97N en el número los botones sinápticos éstos fueron analizados mediante la técnica de inmunofluorescencia y se observaron con un microscopio de epifluorescencia. Se cuantificó el número de botones sinápticos sólo en los músculos 6 y 7 en el segmento A3 de las larvas de tercer estadio. Las larvas que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N a nivel postsináptico presentan un aumento estadísticamente significativo en el número de botones sinápticos con respecto a la cepa silvestre, lo que se correlaciona con las mutantes *dlg*^{XI-2} y *dlg*^{ex 51-1}, dado que en ellas también es

posible observar el mismo fenómeno. Las larvas que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N a nivel presináptico no presentan un cambio significativo en el número de botones en comparación con el control (Fig.15).

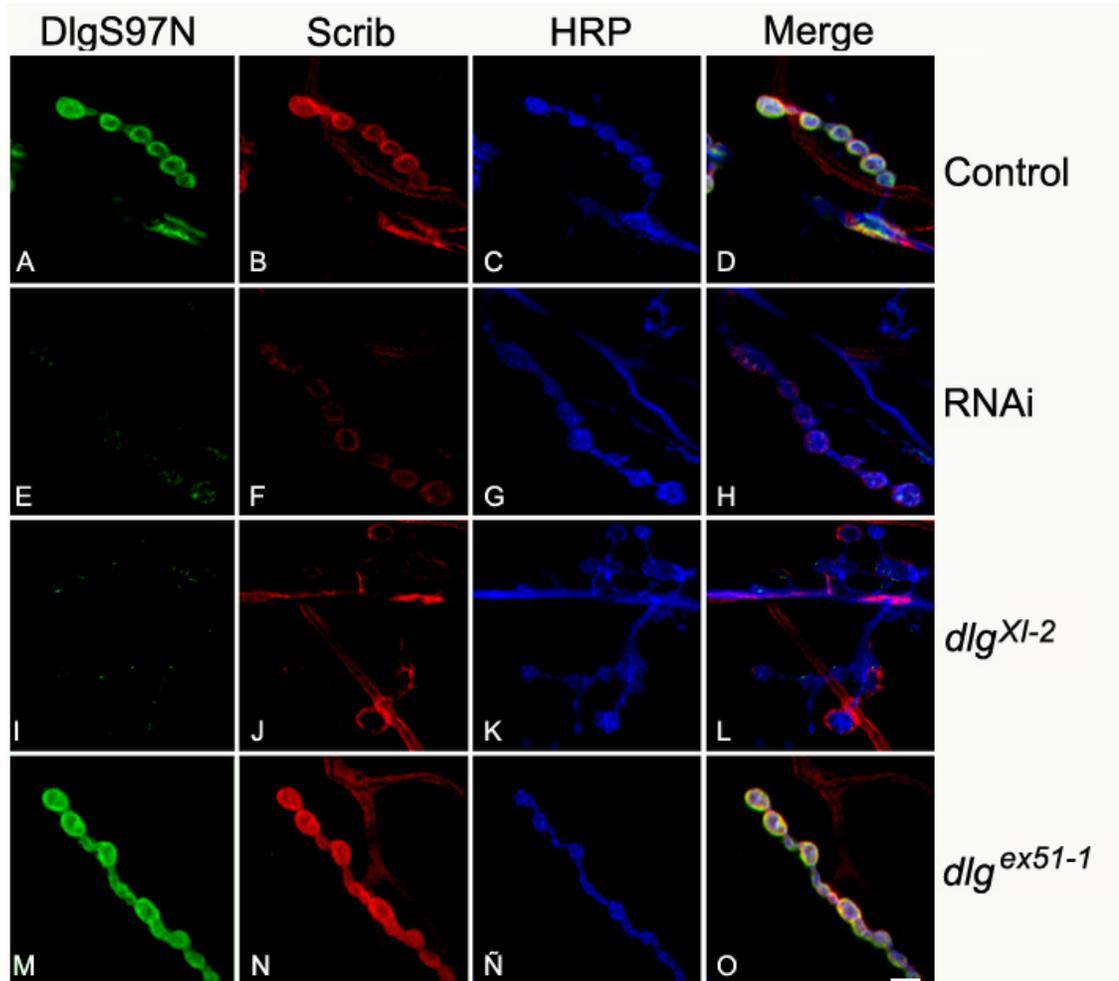


Figura 12. Análisis de expresión de Scrib en botones sinápticos que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N y DlgA en el músculo estriado. Pared muscular de larvas inmunomarcadas con anti-Dlg_{S97N} (A,E,I,M) y anti-Scrib (B, F, J, N), anti-HRP (C, G, K, Ñ) y la superposición de las imágenes (D, H, L, O). A-D: Larvas control. E-H: Larvas que expresan el RNAi-S97N en músculo. I-L: mutantes *dlg^{XI-2}*. M-O: mutantes *dlg^{ex51-1}*. Las larvas fueron disecadas y fijadas inmediatamente. Posteriormente se depositaron en el mismo pocillo una larva por cada cepa estudiada y se incubaron en la misma solución de anticuerpos primarios y posteriormente de anticuerpos secundarios. Las imágenes que se obtuvieron mediante microscopía confocal presentan los mismos parámetros en cada una de las preparaciones. El experimento se repitió tres veces y se escogieron siempre los botones correspondientes al segmento A3 de los músculos 6 y 7. Barra: 5 μ m.

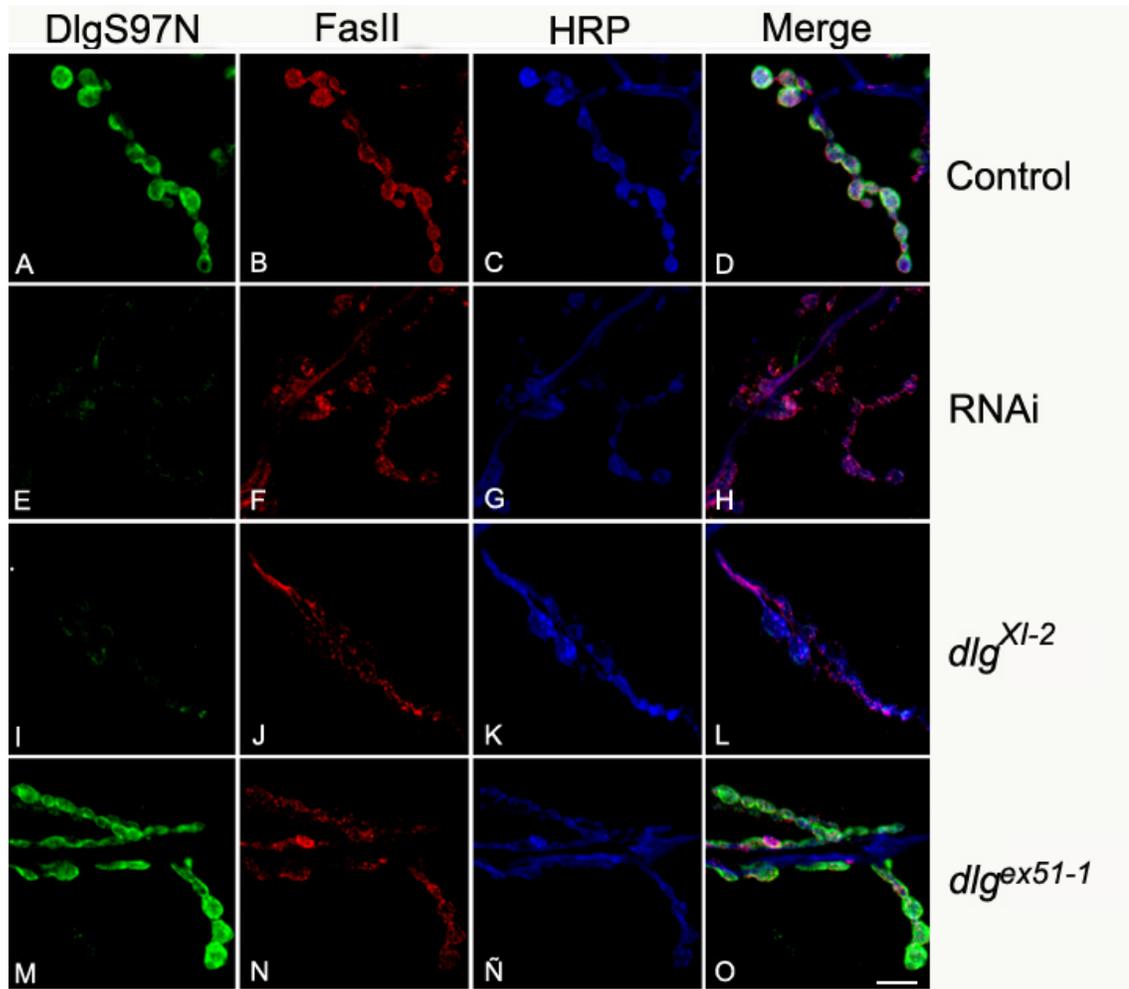
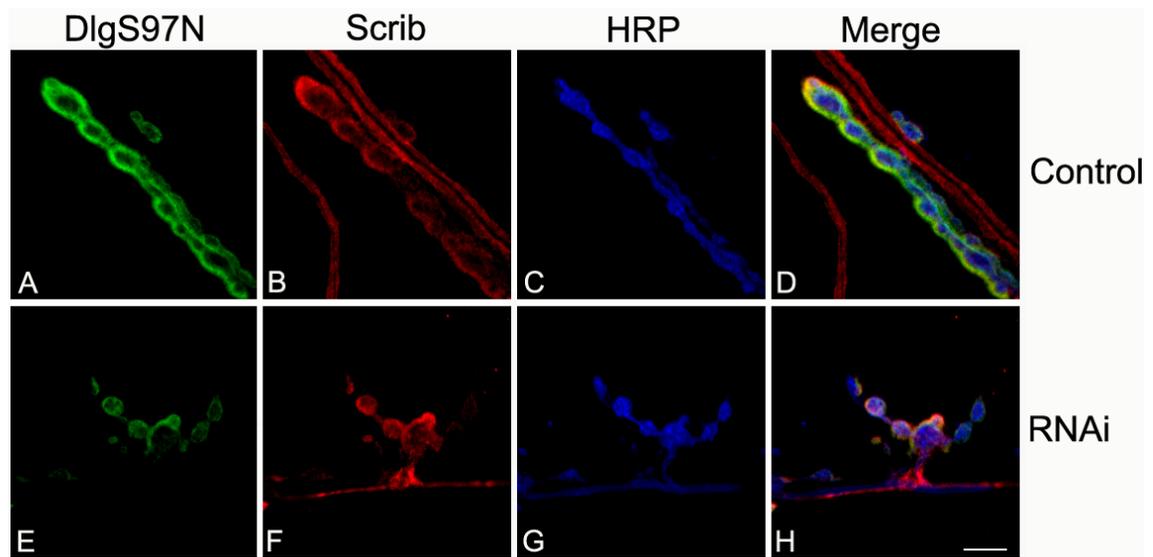


Figura 13. Análisis de expresión de FasII en botones sinápticos que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N y DlgA en el músculo estriado. Pared muscular de larvas inmunomarcadas con anti-Dlg_{S97N} (A,E,I,M) y anti-FasII (B, F, J, N), anti-HRP (C, G, K, Ñ) y la superposición de las imágenes (D, H, L, O). A-D: Larvas control. E-H: Larvas que expresan el RNAi-S97N en músculo. I-L: mutantes *dlg^{XI-2}*. M-O: mutantes *dlg^{ex51-1}*. Las larvas fueron disectadas y fijadas inmediatamente. Posteriormente se colocaron en el mismo pocillo una larva por cada cepa estudiada y fueron incubadas en la misma solución de anticuerpos primarios y posteriormente incubadas con la misma solución de anticuerpos secundarios. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal presentan los mismos parámetros en cada una de las preparaciones. El experimento se repitió tres veces y se escogieron siempre los botones correspondientes al segmento A3 de los músculos 6 y 7. Barra: 5 μ m.

I



II

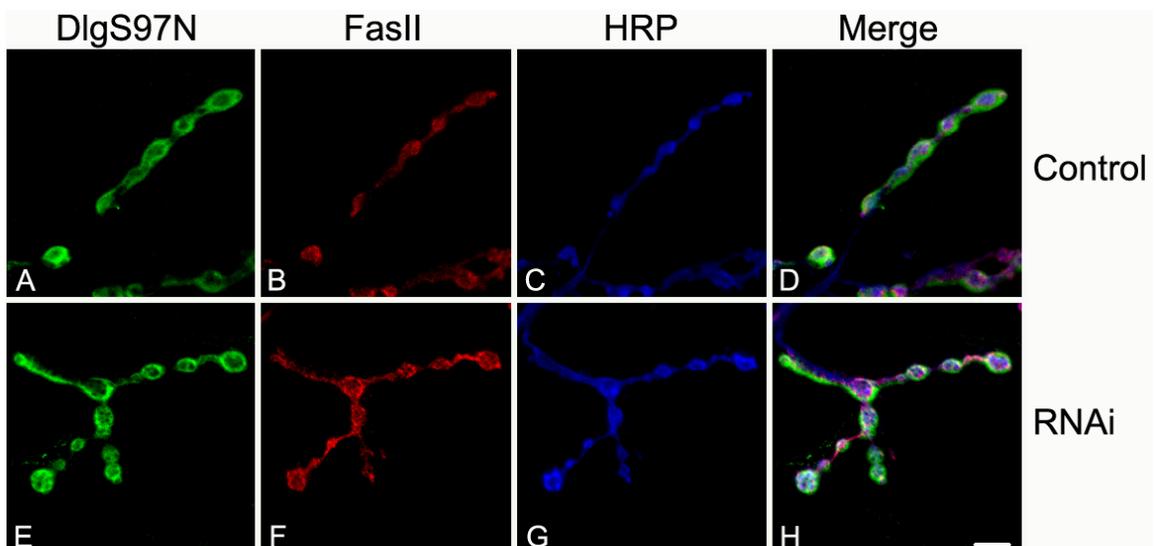


Figura 14. Análisis de expresión de Scrib y FasII en botones sinápticos que presentan la pérdida de expresión de las variantes con dominio S97N en la membrana presináptica. Pared muscular de larvas inmunomarcadas con anti-Dlg_{S97N} (A,E), anti-Scrib (I) o FasII (II) (B, F), anti-HRP (C, G) y la superposición de las tres imágenes (D, H). A-D: Larvas control (W1118 * Gal 4-C380). E-H: Larvas que expresan el transgen RNAi bajo el control del promotor neuronal Gal4-C380. No se observan defectos morfológicos o deslocalización de FasII o Scrib, ni una disminución significativa de DlgS97 por la expresión del transgen en motoneuronas. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal presentan los mismos parámetros en cada una de las preparaciones. El experimento se repitió tres veces y se escogieron siempre los botones correspondientes al segmento A3 de los músculos 6 y 7. Barra: 5 μ m.

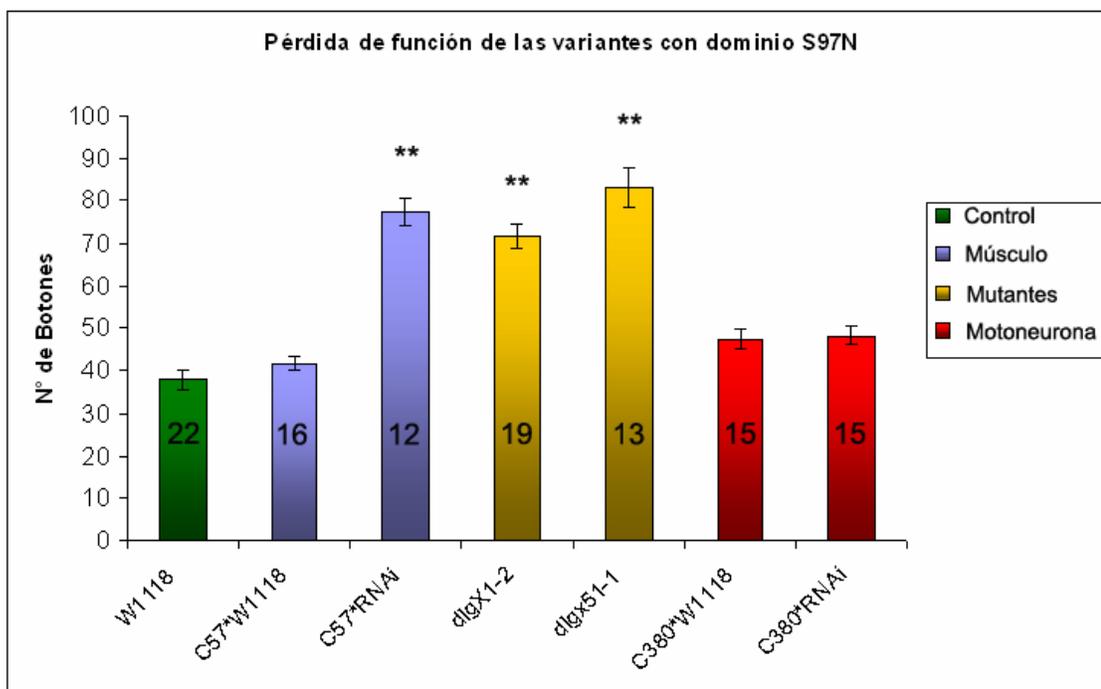


Figura 15: Pérdida de expresión de variantes con dominio S97N y de DlgA.

Cuantificación de botones sinápticos de los músculos 6 y 7 del segmento abdominal A3 de larvas de tercer estadio. En la ordenada se indica el número de botones, la abscisa corresponde a las cepas analizadas. Cepas control (W1118, C57*W1118 y C380*W1118), cepa con expresión de RNAi en membrana postsináptica (C57*RNAi), mutantes (*dlg*^{X1-2} y *dlg*^{ex51-1}) y cepa con expresión de RNAi en membrana presináptica (C380*RNAi). Los números dentro de las barras indican el número de segmentos A3 de los músculos 6 y 7 cuantificados, en larvas de tercer estadio. La barra verde representa el control, las barras azules corresponden a las larvas con promotor postsináptico, las barras amarillas corresponden a las mutantes y las barras rojas a las larvas con promotor presináptico. Notar que las larvas con pérdida de expresión de DlgS97 y DlgA a nivel postsináptico presentan un aumento estadísticamente significativo en el número de terminales nerviosos con respecto al control. Las líneas verticales sobre cada barra corresponden al error estándar medio (SEM), los asteriscos (**) corresponden a $p < 0,0001$.

3.3. Determinación de los efectos asociados a la ganancia de función de la proteína DlgS97 en el desarrollo de la unión neuromuscular en larvas de tercer estadio.

Con el fin de saber si la ganancia de función de DlgS97 provoca algún efecto en la morfología de la unión neuromuscular se realizó la sobreexpresión de DlgS97 mediante la cruce de UAS-EGFPDlgS97 y Gal4-C57 (sobreexpresión de DlgS97 en músculo) y UAS-EGFPDlgS97 y Gal4-C380 (sobreexpresión de DlgS97 en motoneurona). Para comparar si existían diferencias entre la isoforma DlgS97 y la isoforma DlgA se utilizó además la cepa UAS-EGFPDlgA con la cual se sobreexpresó DlgA en músculo y motoneurona. Al sobreexpresar a nivel postsináptico las proteínas DlgS97 o DlgA se observó mediante IHQ que los botones sinápticos son morfológicamente similares a la cepa silvestre. Sin embargo, DlgA se localiza en los núcleos y en los botones, lo que no sucede con DlgS97, que se localiza solamente en los botones sinápticos (Fig.16 y 17).

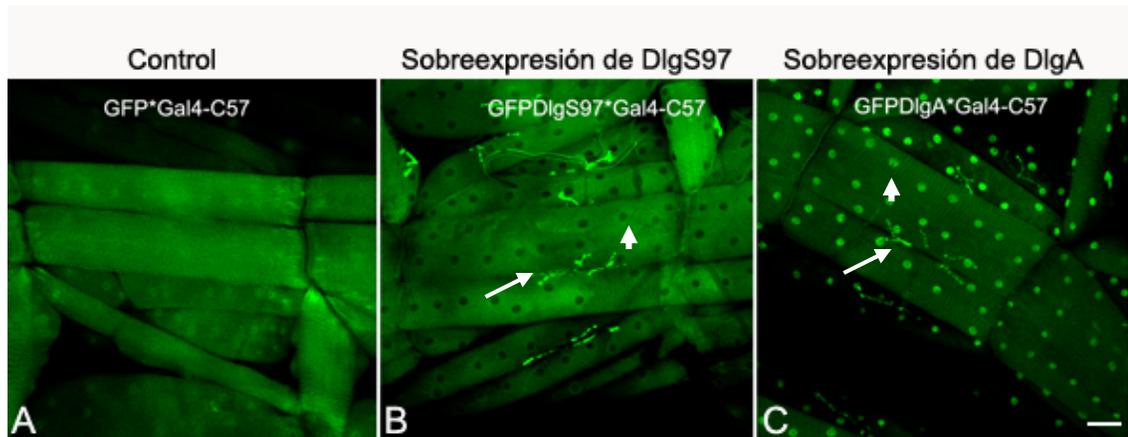


Figura 16: Sobreexpresión de DlgS97 y DlgA en músculo de larvas de tercer estadio. Imágenes de microscopía confocal de los músculos 6 y 7 de larvas que expresan GFP. **A.** Control (GFP*Gal 4-C57). **B.** Sobreexpresión de DlgS97 (GFPDlgS97*Gal4-C57). **C.** Sobreexpresión de DlgA (GFPDlgA*Gal4-C57). Las flechas indican los botones sinápticos. Las cabezas de flechas indican los núcleos. Las larvas son disecadas e inmediatamente fijadas, luego son montadas directamente sobre un portaobjetos. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal utilizando los mismos parámetros para cada muestra y se realizaron en duplicado. Al sobreexpresar DlgS97 se observa que DlgS97 se encuentra sólo en los botones sinápticos. Sin embargo DlgA se localiza tanto en los núcleos como en los botones. Barra: 50 μ m.

Al sobreexpresar DlgS97 o DlgA en motoneuronas no se observan cambios significativos, tanto a nivel morfológico como en el número de terminales sinápticos. Las proteínas involucradas en el complejo, FasII y Scrib, tampoco presentan alteraciones en su localización o inmunoreactividad (Fig.18). Al cuantificar el número de botones se observa una disminución en el número de botones sinápticos con respecto al control (Fig.19).

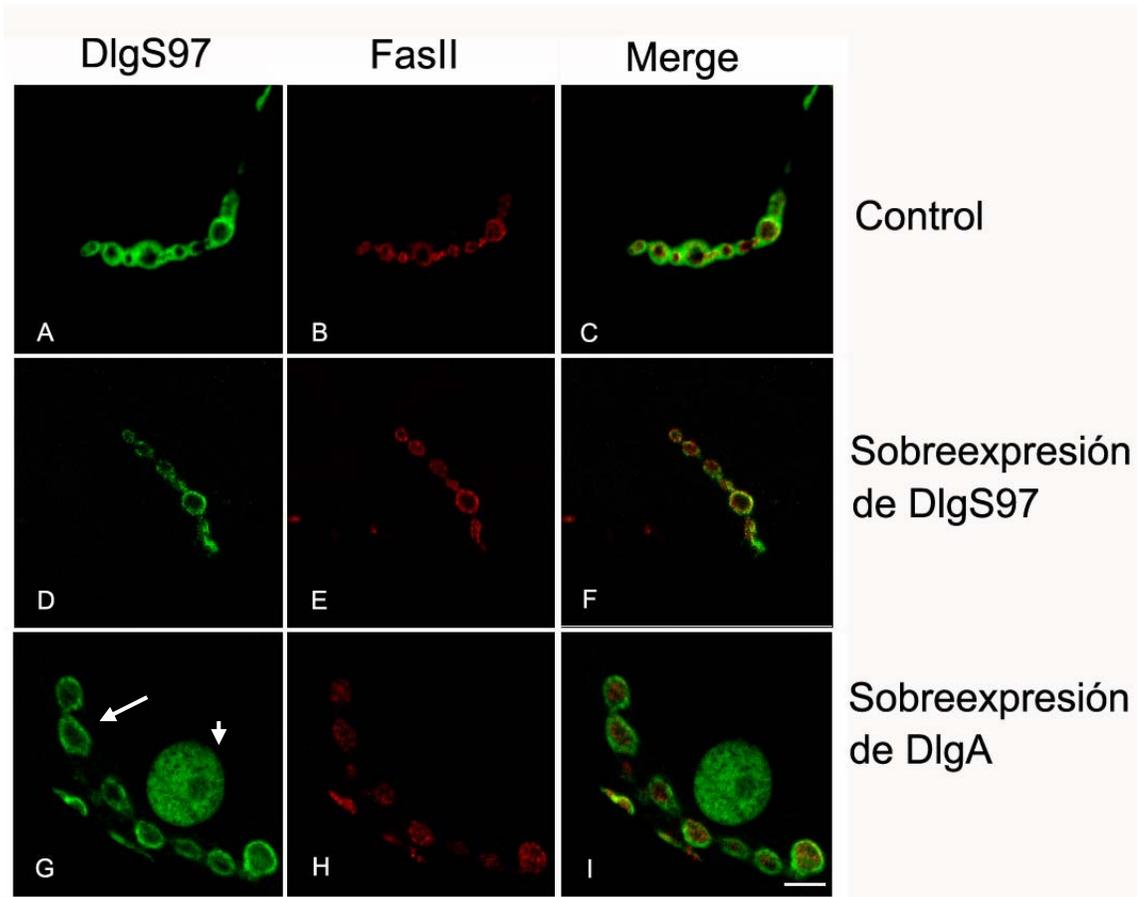


Figura 17: Inmunohistoquímica de botones sinápticos con sobreexpresión de DlgS97 y DlgA en la membrana postsináptica. Pared muscular de larvas inmunomarcadas con anti-Dlg_{S97N} (A,D,G), FasII (B,E,H) y la superposición de las dos imágenes (C,F,I). **A-C:** Larvas control (W1118 * Gal 4-C57). **D-F:** Larvas que sobreexpresan DlgS97 en músculo (DlgS97*Gal4-C57). **G-I:** Larvas que sobreexpresan DlgA en músculo (DlgA*Gal4-C57). Las flechas indican los botones sinápticos. Las cabezas de flechas indican los núcleos. Barra: 5 µm.

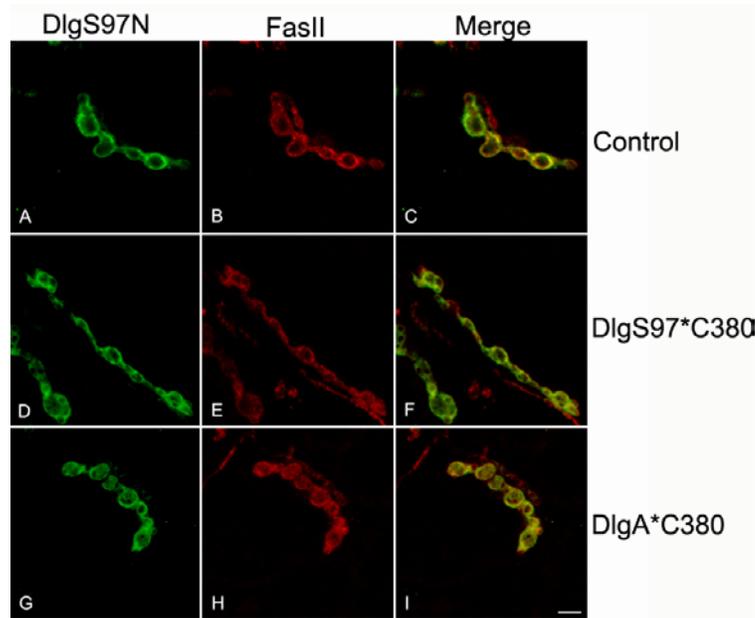


Figura 18. Inmunohistoquímica de botones sinápticos con sobreexpresión de DlgS97 y DlgA en la membrana presináptica. Pared muscular de larvas inmunomarcadas con anti-DlgS97N (A,D,G), FasII (B,E,H) y la superposición de las dos imágenes (C,F,I). **A-C:** Larvas control (W1118 * Gal 4-C380). **D-F:** Larvas que sobreexpresan DlgS97 en motoneurona (DlgS97*Gal4-C380). **G-I:** Larvas que sobreexpresan DlgA en músculo (DlgA*Gal4-C380). No se aprecian diferencias con respecto a la cepa silvestre Barra: 5 μ m.

Ganancia de función de DlgS97 y DlgA

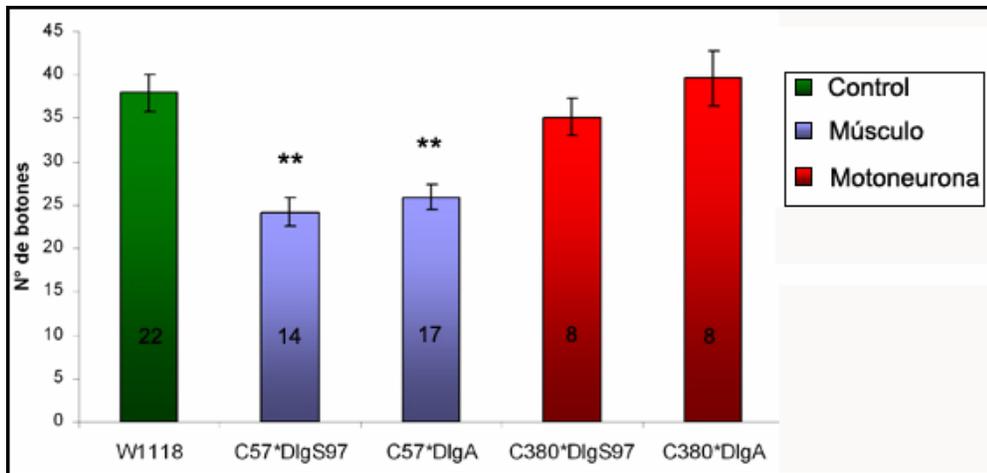


Figura 19: Sobreexpresión de DlgS97 y DlgA. Cuantificación de botones sinápticos de los músculos 6 y 7 del segmento abdominal A3 de larvas de tercer estadio. La barra verde corresponde a la cepa control (W1118). Las barras azules corresponden a las cepas con sobreexpresión en la region postsináptica de DlgS97 (C57*DlgS97) y DlgA (C57*DlgA) Las barras rojas corresponden a las cepas con sobreexpresión en la region presináptica de DlgS97 (C380*DlgS97) y DlgA (C380*DlgA) Los números dentro de las barras indican el número de muestras cuantificadas. Notar que las larvas con sobreexpresión de DlgS97 y DlgA a nivel postsináptico presentan una disminución en el número de terminales nerviosos con respecto al control. Las líneas verticales sobre cada barra corresponden al error estándar medio (SEM), los asteriscos (**) corresponden a $p < 0,0001$.

3.4. Determinación de la capacidad del dominio S97N de promover la multimerización y de interactuar intermolecularmente con otros dominios.

Las isoformas que contienen el dominio S97N podrían estar involucradas, al igual que en vertebrados, en la formación de homo o heteromultímeros con otras MAGUKs. Con el objetivo de probar la capacidad de interactuar del dominio S97N con otros dominios, se realizaron ensayos de asociación en matriz sólida *in vitro* ("Pull down"). Para esto se utilizaron columnas ya sea de affigel o agarosa glutatión a las que se asoció una proteína de fusión GST-S97N, la que se incubó con extractos de pared muscular de larvas de tipo silvestre y transgénicas que expresan GFP-DlgS97 en músculo. Luego del análisis electroforético y la posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa, ésta fue incubada con el anticuerpo anti-DLG_{PDZ1-2}. Los extractos provenientes de animales transgénicos que contenían DlgS97 sobreexpresada presentan una banda inmunorradioactiva de ~175 kDa correspondiente a DlgS97 unida a GFP (Fig.20A), demostrando la capacidad del dominio S97N de asociarse con DlgS97. El experimento con moscas silvestres se realizó con el fin de descartar que la unión se debiese a GFP. Se observó una banda inmunoreactiva a anti-Dlg_{PDZ1-2} de ~116 kDa correspondiente a la proteína DlgS97 endógena (Fig. 20B). No se observó la banda correspondiente a DlgA en estos experimentos.

Con el objetivo de analizar las posibles interacciones de tipo proteicas del dominio S97N *in vivo* se realizaron inmunoprecipitaciones de extractos de pared muscular. Las moscas que se utilizaron fueron las pseudos nativas W1118. Para inmunoprecipitar se utilizó el suero y el anticuerpo purificado anti-Dlg_{S97N} (Fig.21A). Con el fin de determinar la presencia de DlgS97 y DlgA en el precipitado se inmunoprecipitó con anti-Dlg_{S97N}. Como fuente de tejido, se utilizaron moscas con pérdida de expresión de DlgS97 (C57*RNAi), sobreexpresión de DlgA (C57*DlgA), sobreexpresión de DlgS97 (C57*DlgS97) y pérdida de expresión de DlgA (*dlg*^{ex51-1}). Se realizó el análisis de western blot y se incubó con anti-Dlg_{PDZ1-2}. En las moscas silvestres fue posible observar la presencia de una sola banda de ~116 kDa y al inhibir la expresión de DlgS97 se

observó la pérdida de esta banda de ~116 kDa (Fig.21 A y B). Estos experimentos en conjunto son compatibles con un modelo en que el dominio S97N es capaz de formar homodímeros, generando complejos consigo mismo excluyendo de estos a DlgA que carece de dominio S97N.

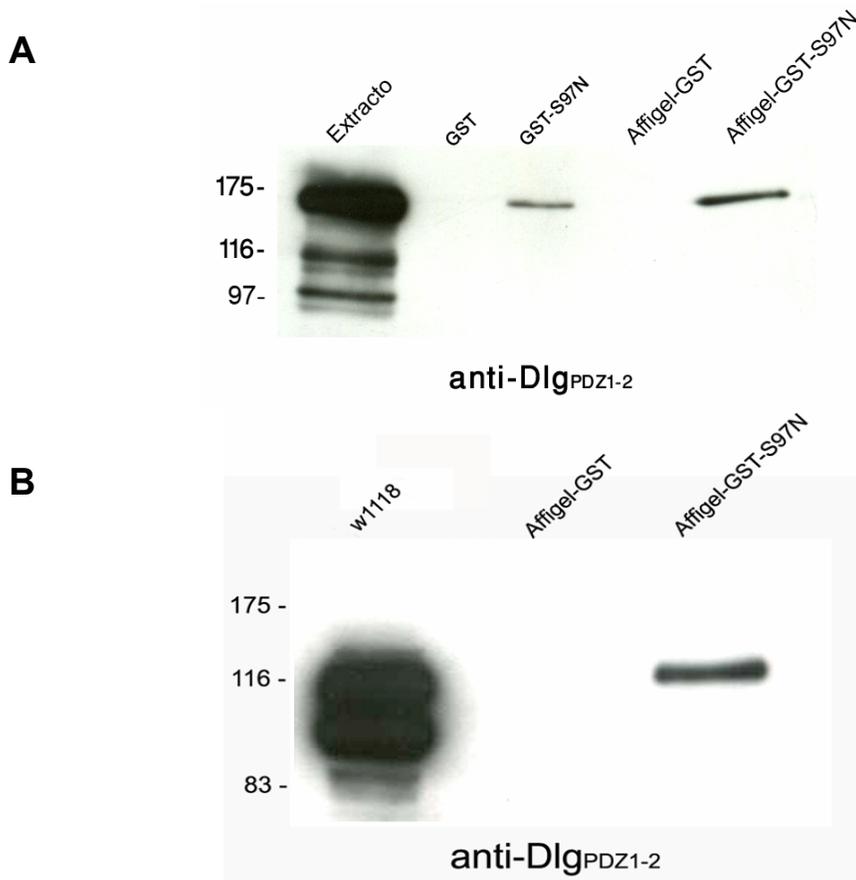


Figura 20. Determinación de la unión del dominio S97N con DlgS97.

A: Experimento de ensayo de matriz sólida (“Pull down”). En el primer carril, correspondiente al extracto proteico se cargó el 10% del extracto usado para el experimento. El extracto de pared muscular se realizó con larvas que sobreexpresan DlgS97. Como control negativo parte del extracto fue incubado con esferas de agarosa glutatión unidas a GST (2° carril) y Affi-gel-GST (4° carril). El tercer carril muestra la unión de S97N a GST-S97N y el 5° carril muestra la unión a affi-gel-GST-S97N.

B: Experimento de unión a matriz sólida utilizando extracto de larvas tipo silvestre. El primer carril corresponde al control positivo, que equivale al 10 % del extracto. El 2° carril indica el control negativo (Affi-gel-GST) y el 3° carril indica la unión de S97N a la proteína DlgS97. Las proteínas unidas a la matiz sólida fueron analizadas por electroforesis en condiciones denaturantes, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y reveladas con anti-Dlg_{PDZ1-2}. En A es posible observar la presencia de una banda de ~175 kDa que se une a S97N y corresponde a DlgS97-EGFP y en B la banda es de ~116 kda correspondiente a la proteína DlgS97endógena.

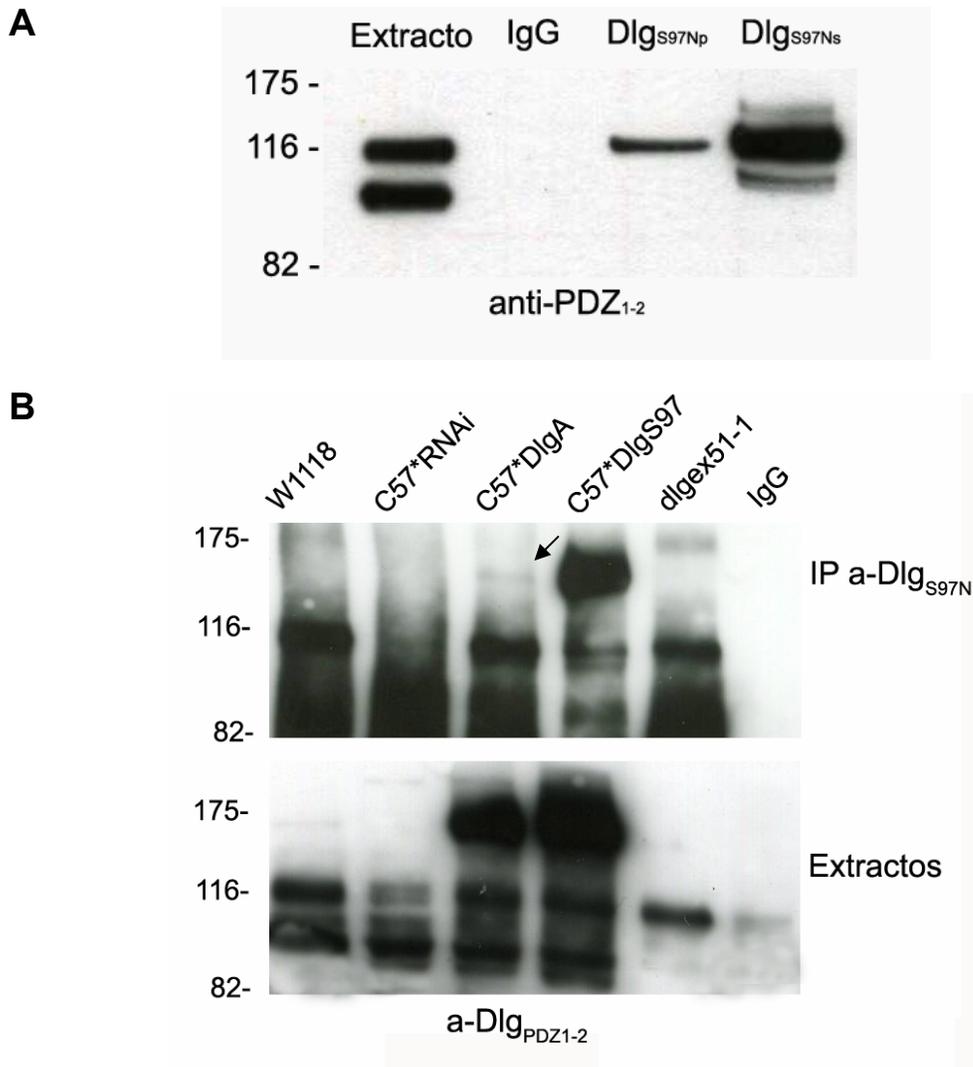


Figura 21. Inmunoprecipitación de DlgS97 en extractos de pared muscular.

A: Los extractos de cepa tipo silvestre (W1118) fueron inmunoprecipitados con anti-Dlg_{S97N} y revelados con anti-Dlg_{PDZ1-2}. En el carril 1 se cargó el 10% del extracto usado para la inmunoprecipitación. El segundo carril corresponde a la IgG utilizada como control negativo. El tercer y cuarto carril corresponde a la inmunoprecipitación con el anticuerpo purificado y el suero anti-Dlg_{S97N} respectivamente, sólo se advierte la presencia de una banda de ~116 kDa. El estándar de peso molecular está indicado en kDa. a la izquierda del inmunoblot.

B: Inmunoprecipitación de las cepas: tipo silvestre (W1118), con pérdida de expresión de DlgS97 (C57*RNAi), sobreexpresión de DlgA (C57*DlgA), sobreexpresión de DlgS97 (C57*DlgS97) y pérdida de expresión de DlgA (*dlg^{ex51-1}*). Como control negativo se incubó con IgG. Cada una de las inmunoprecipitaciones se cargó en paralelo con sus respectivos extractos. Todos los extractos fueron resueltos por electroforesis en condiciones desnaturalantes, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos anti Dlg_{PDZ} (1:3000). Notar que no se observa la presencia de DlgA en el inmunoprecipitado con la sobreexpresión de DlgA (flecha). El estándar de peso molecular está indicado en kDa. a la izquierda del inmunoblot.

4. DISCUSIÓN

Importancia fisiológica de los distintos transcritos del gen *dlg*

En este trabajo se estudió la participación del dominio S97N y de una de las variantes del gen *dlg* que contiene este dominio, DlgS97, en la sinapsis neuromuscular de *Drosophila*.

Aunque muchos análisis previos de Northern blot y Western blot indicaron la existencia de varios productos del gen *dlg* (Woods y Bryant, 1991; Woods y cols., 1996), todas las funciones de este gen han sido atribuidas al único transcrito caracterizado: DlgA. En nuestro laboratorio se amplificó por RT-PCR el transcrito DlgS97 (Mendoza y cols., 2003). La proteína deducida presenta en su extremo 5' una región que contiene un segmento de 65 aminoácidos, homólogo al N-terminal característico de la proteína sináptica de vertebrados SAP97, denominado S97N (Wu y cols., 1998), seguido por los dominios de DlgA, PDZ1-2-3, SH3 y GUK.

Las variantes de *dlg* que contienen el dominio S97N se expresan en sistema nervioso y músculo, encontrándose ausentes en epitelio, a diferencia de DlgA que se encuentra presente tanto en tejido epitelial como nervioso.

Los estudios en la unión neuromuscular larval de *Drosophila* indican que Dlg se expresa a nivel pre y postsináptico (Lahey y cols., 1994) y que es requerida en el reclutamiento sináptico de canales tipo Shaker (Tejedor y cols., 1997) y de la molécula de adhesión celular FasII (Thomas y cols., 1997) así como para la correcta localización sináptica de otra proteína que contiene dominios PDZ, denominada Scribble (Mathew y cols., 2002). Sin embargo, todas estas funciones fueron atribuidas a DlgA. En base a estos antecedentes, se estudió la presencia de las variantes con dominio S97N en la unión neuromuscular y su papel en el desarrollo de la sinápsis.

Los experimentos de inmunofluorescencia presentados en este trabajo indican que las variantes con dominio S97N se expresan a nivel pre y postsináptico, de manera más abundante en músculo, donde presenta una colocalización con las proteínas FasII y Scrib, sin encontrarse presente en las

zonas activas de la sinapsis. Esto está descrito para DlgA, donde se ha observado sin embargo que las mutantes de *dlg* presentan un incremento de zonas activas (Koh y cols., 1999, Budnik y cols., 1996).

Inhibición de la expresión de DlgS97 y DlgA mediante RNAi y mutantes

La pérdida de función analizada por western blot e inmunofluorescencia indicó que la variante que contiene el dominio S97N, disminuye drásticamente su expresión en la unión neuromuscular en las cepas transgénicas que expresan el RNAi bajo el control de Gal 4-C57 (expresión muscular). Sin embargo es posible notar que la expresión de UAS-S97N-RNAi en músculo causa una reducción moderada de la expresión de Dlg en la unión neuromuscular larval detectada con el anticuerpo anti-Dlg_{PDZ1-2} (Dlg total). Esto sugiere que tanto DlgA como DlgS97 se encuentran en la unión neuromuscular, donde alguna o todas las funciones atribuidas a DlgA podrían corresponder en realidad a DlgS97. En esta tesis no se cuantificó el parámetro de inmunoreactividad en las larvas que presentan pérdida de función de DlgS97, pero sería muy interesante hacerlo.

Los análisis de western blot de extractos de larvas control y larvas que expresan S97N-RNAi bajo el control de Gal4-C57 (músculo) o Gal4-C380 (motoneurona) (Budnik y cols., 1996), revelados con anti-Dlg_{PDZ1-2} dan cuenta de dos bandas: una del mismo peso molecular de DlgS97 (116 kDa) que correspondería a la isoforma larga de DlgA, cuya expresión es mucho menor que la banda de 97 kDa que correspondería a una variante de DlgA que carece del exón 12 (Mendoza y cols., 2003). Sin embargo, la banda de 116 kDa correspondiente a DlgS97 es mucho más débil al expresar UAS-S97N-RNAi en músculo y disminuye muy levemente cuando se expresa UAS-S97N-RNAi en motoneuronas.

Al disminuir la expresión de las variantes con dominio S97N mediante RNA de interferencia a nivel postsináptico se observó la deslocalización de FasII en los botones sinápticos mediante inmunofluorescencia. Por otra parte Scrib no se deslocaliza, sin embargo disminuye notoriamente su

inmunorreactividad. En la mutante *dlg*^{XI-2} ocurre un fenómeno muy similar, donde FasII se deslocaliza completamente y Scrib disminuye su expresión.

Por otro lado, al analizar la mutante nula de DlgA, *dlg*^{ex51-1} es posible notar que la morfología de los botones sinápticos es similar a la morfología de la cepa tipo silvestre donde DlgS97, FasII y Scrib no se deslocalizan, sin embargo FasII disminuye su expresión mientras que DlgS97 y Scrib aumentan su expresión. Es importante notar que Scrib podría estar relacionada con DlgS97 ya que al aumentar o disminuir la expresión de DlgS97, Scrib sufre el mismo efecto.

Al cuantificar los botones sinápticos fue posible observar un drástico aumento significativo en el número de botones en las larvas que tienen una disminución de la expresión de DlgS97 a nivel postsináptico. El mismo fenómeno ocurre con la mutante nula de DlgA, *dlg*^{ex51-1}, y la mutante que pierde la expresión de ambas isoformas, *dlg*^{XI-2}, donde los botones sinápticos aumentan significativamente en número. Al cuantificar el número de botones frente a una inhibición de DlgS97 o DlgA a nivel presináptico no se observaron diferencias significativas con respecto a las larvas tipo silvestre.

Sobreexpresión de DlgS97 y DlgA

Los experimentos de sobreexpresión a nivel pre o postsináptico no presentaron cambios notorios a nivel de morfología de los terminales nerviosos, ni una desorganización de las proteínas estudiadas como FasII y Scrib. No obstante, al cuantificar el número de botones sinápticos fue posible observar una diferencia en el número de terminales nerviosos, apreciándose una disminución en el número de botones sinápticos en larvas que sobreexpresan tanto DlgS97 como DlgA. Al cuantificar el número de botones frente a una sobreexpresión de DlgS97 o DlgA a nivel presináptico no se observaron diferencias significativas con respecto a las larvas tipo silvestre.

Se ha demostrado que FasII es capaz de permitir o restringir el crecimiento sináptico dependiendo del balance de los niveles de FasII entre las células pre y postsinápticas (Packard y cols., 2003, Ashley y cols., 2005). Si

DlgA y/o DlgS97 no se encuentran presentes en la unión neuromuscular se afecta la localización apropiada de FasII, provocando un proceso de proliferación, que probablemente es compensatorio para mantener la estructura sináptica.

Estos resultados indican que ambas isoformas, DlgA y DlgS97, no sólo coexisten en la unión neuromuscular larval de *Drosophila*, sino que además juegan papeles diferentes, donde FasII requiere principalmente a DlgA para su localización sináptica y Scrib depende de DlgS97.

Por lo tanto, DlgA y DlgS97 podrían ejercer funciones diferentes debido a la organización particular de cada una de estas proteínas, formando complejos independientes. El dominio S97N podría ejercer un papel importante en las interacciones específicas con otras proteínas. El dominio N-terminal de SAP 97 en vertebrados ha sido identificado como un dominio L27 y está involucrado en la formación de multímeros de otras MAGUK (Karnak y cols., 2002). El dominio S97N de *Drosophila* es homólogo al extremo N-terminal de SAP97 de vertebrados (Wu y cols., 1998), y se ha reportado recientemente que S97N tiene una secuencia L27, por lo tanto este dominio podría ser capaz de formar homo o heteromultímeros.

Interacciones del dominio S97N

Utilizando el dominio S97N unido a una matriz sólida se demostró que S97N se une a DlgS97, sin unirse a la isoforma de DlgA de 97 kDa ya que la única banda inmunorreactiva a anti-Dlg_{PDZ1-2} corresponde a la de 116 kDa. Sin embargo, con este experimento no es posible descartar la presencia de una posible variante de DlgA de 116kDa y tampoco es posible descartar que DlgA se una a otro dominio de DlgS97. Es por ésto mediante un análisis “*in vivo*” a través de inmunoprecipitaciones se utilizaron larvas tipo silvestre, larvas con pérdida de expresión de variantes con dominio S97N, y con ganancia de función tanto de DlgA como de DlgS97 y fue posible observar que DlgS97 sólo interactúa consigo misma y se descarta que interactúe con DlgA, dado que al inmunoprecipitar con anti-Dlg_{S97N} en extractos de larvas que pierden la

expresión de DlgS97 y en las con sobreexpresión de DlgA no se la presencia de alguna banda inmunorreactiva a anti-Dlg_{PDZ1-2} correspondiente a la bandas de DlgA que si aparecen en los extractos control.

DlgA y DlgS97 estarían interactuando con distintas proteínas, formando complejos diferentes en la unión neuromuscular y actuando de manera independiente. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que pueda depender indirectamente una de la otra.

Sólo cabe sugerir frente a los antecedentes presentados en este trabajo que la isoforma que contiene el dominio S97N, DlgS97, puede formar homomultímeros y estaría formando un complejo con Scrib, que participa en la localización apropiada de Scrib y FasII y que no interactúa con DlgA. Esta última proteína interactuaría preferencialmente con FasII.

Mediante el uso de anticuerpos adecuados se podría determinar las interacciones específicas entre los dominios de estas proteínas.

Los experimentos de rescate de función de DlgA o DlgS97 en mutantes *dlg*^{XI-2} o *dlg*^{ex51-1} podrían constituir una buena herramienta para determinar la participación específica de estas isoformas, determinando si DlgS97 o DlgA son capaces por sí solas de rescatar el fenotipo silvestre y si el rescate requiere la expresión de las proteínas a nivel pre o postsináptico o si necesariamente requiere la expresión en la membrana pre y postsináptica.

Los registros electrofisiológicos constituyen otra excelente herramienta que permitiría dilucidar el papel de estas isoformas en la sinapsis desde un punto de vista funcional.

Las estrategias experimentales enunciadas permitirían responder muchas de las interrogantes frente al papel que juegan éstas y otras proteínas en la plasticidad sináptica y el desarrollo de la sinapsis neuromuscular.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Las variantes de Dlg que contienen el dominio S97N se expresan principalmente en la membrana postsináptica y presentan una colocalización con los dominios PDZ y las proteínas FasII y Scrib.
- 2.- La inhibición de la expresión de DlgS97 en el músculo permitió comprobar la coexistencia de DlgA y DlgS97 en la unión neuromuscular, observándose una deslocalización de FasII, una disminución de la expresión de Scrib y un aumento en el número de botones sinápticos. Sin embargo en la célula presináptica no se observan diferencias con respecto a la cepa silvestre en cuanto a la morfología y número de botones sinápticos.
- 3.- La sobreexpresión tanto de DlgS97 como de DlgA a nivel pre o postsináptico es similar a la cepa de tipo silvestre en cuanto a la morfología y localización subcelular de FasII y Scrib, sin embargo el número de botones sinápticos disminuye en las larvas con sobreexpresión de DlgA o DlgS97 en músculo.
- 4.- El dominio S97N es capaz de unirse a DlgS97, de modo que DlgS97 interactúa consigo misma, formando homodímeros, sin unirse a DlgA.
- 5.- Las proteínas DlgS97 y DlgA se encuentran ambas en la unión neuromuscular larval de *Drosophila*, y cumplen funciones fisiológicas diferentes, pero forman complejos distintos e independientes.

6. REFERENCIAS

1. **Ashley, J., Packard, M, Ataman, B., y Bundik, V.** (2005) Fasciclin II Signals New Synapse Formation through Amyloid Precursor Protein and the Scaffolding Protein dX11/Mint *J. Neurosci.*, **25**, 5943-5955.
2. **Bachmann, A., Timmer, M., Sierralta, J., Pietrini, G., Gundelfinder, E. D., Knust, E. y Thomas, U.** (2003). Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg- S97. *J. Cell Sci.*, **117**, 1899-1909.
3. **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
4. **Brand y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
5. **Budnik, V., Zhong, Y., y Wu, C.** (1990). Morphological plasticity of axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J. Neurosci.*, **10**, 3754-3768.
6. **Budnik, V.** (1996). Synapse maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 858-867.
7. **Budnik, V., Koh, Y-H., Guan B., Haugh, C., Woods, D., Gorczyca y M.** (1996). Regulation of synapse structure and function by *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron*, **17**, 627-640.
8. **Budnik, V. y Gramates, L. S.** (1999). Neuromuscular Junctions in *Drosophila* (San Diego, Academic Press).
9. **Caruana G.** (2002). Genetic studies define MAGUK proteins as regulators of epithelial cell polarity. *Int. J. Dev. Biol.*, **46**, 511-518.
10. **Chetkovich, D. M.** (2002). Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanism. *J. Neurosci.*, **22**, 6415-6425.
11. **Cho, K. O., Hunt, C. A. y Kennedy, M. B.** (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, **9**, 929-942.

12. **Funke, L., Dakoji, S. y Brecht, D.** (2005). Membrane-Associated Guanylate Kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Neurosci.*, **74**, 219-245.
13. **Garner, C.C., Nash, J. y Hagan, R. L.** (2000). PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biol.*, **10**, 274-280.
14. **Karnak, D. Lee, S. y Margolis, B.** Identification of multiple binding partners for the amino-terminal domain of synapse-associated protein 97(2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 46730-46735.
15. **Keshishian, H., Broadie, K., Chiba, A. y Bate, M.** (1996). The *Drosophila* neuromuscular junction: A model system for studying synaptic development and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 545-575.
16. **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.
17. **Koh, Y.H., Gramates, L.S. y Budnik, V.** (2000). *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microsc. Res. Tech.*, **49**, 14-25.
18. **Kuhlendahl S., Spangenberg O., Honrad, M., Kim, E. y Garner, C. C.** (1998). Functional analysis of the guanylate kinase-like domain in the synapse-associated protein SAP97. *Eur J Biochem*, **252**, 305-313.
19. **Lahey, T., Gorczyca, 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.
20. **Mathew, D., Gramates, L. S., Packard, M., Thomas, U., Bilder, D., Perrimon, N., Gorczyca, M., y Budnik, V.** (2002). Recruitment of Scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein, *Curr. Biol.*, **12**, 531-539.
21. **Mendoza, C., Olguin, P., Lafferte, G., Thomas, U., Ebisch, S., Gundelfinder, E., Kukuljan, M., y Sierralta, J.** (2003). Novel isoforms of *Dlg* are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, **23**, 2093-2101.
22. **Packard, M., Mathew, D. y Budnik, V.** (2003) FASt remodeling of synapses in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 527-534.

- 23. Roche, J. P., Packard, M. C., Moeckel-Cole, S., y Budnik, V.** (2002). Regulation of synaptic plasticity and synaptic vesicle dynamics by the PDZ protein Scribble, *J. Neurosci*, **22**, 6471-6479.
- 24. Sheng, M.** (2001). Molecular organization of the postsynaptic specialization, *PNAS*, **98**, 7058-7061.
- 25. Sheng, M. y Sala C.** (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 1-29
- 26. Sierralta J. y Mendoza C.** (2004). PDZ-Containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity. *Brain Research Rev.***47**, 105-115.
- 27. Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D., y C. S. Goodman.** (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II control synaptic stabilization and growth, *Neuron*, **17**, 641-654.
- 28. Tejedor, F. J., Bokhari, A., Rogero, O., Gorczyca, M., Zhang, J., Kim, E., Shen, M. y Budnik, V.** (1997). Essential role for dlg in synaptic clustering of Shaker K⁺ channels *in vivo*, *J. Neurosci.*, **17**, 152-159.
- 29. 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 the presynaptic structure. *Neuron*, **19**, 787-799.
- 30. 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**, 451-464.
- 31. Woods D. F., Hough, C, Peel D., Callaini G. Bryant P.** (1996). Dig protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.*, **134**, 1469-1482.
- 32. Wu H., Reuver, S.M., Kuhlendahl S., Chung, W. J. y Garner, C.** (1998). Subcellular targeting and cytoskeletal attachment of SAP97 to the epithelial lateral membrane. *J. Cell Sci.*, **111**, 2365-2376.
- 33. Wu H., Reissner C., Kuhlendahl S., Coblentz B., Reuver S., Kindler S., Gundelfinger E. y Garner C.** (2000). Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *EMBO J*, **19**, 5740-5751.

