



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DEFECTOS DEPENDIENTES DE TEMPERATURA EN MUTANTES DE *Drosophila melanogaster* PARA LA PROTEÍNA SINÁPTICA DISC-LARGE

Gabriela Alejandra Inzunza Melo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JIMENA SIERRALTA JARA
PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA
PROFESOR CONSEJERO: SERGIO BUCAREY VIVANCO

SANTIAGO, CHILE
2010

Dedicatoria

A mis Padres por su amor y paciencia sin medida.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Jimena Sierralta, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y esta valiosa experiencia de vida, al personal de laboratorio Angélica Figueroa y en especial a Rebeca Baeza por su invaluable ayuda y amistad, a mis compañeros de laboratorio Francisco Urra, Ximena Martínez y Carlos Oliva, por su buena onda y apoyo que hicieron más fácil mi integración al trabajo de laboratorio. Finalmente a mi familia y a César, por estar ahí siempre y a todos aquellos que directa o indirectamente estuvieron conmigo e hicieron que este trabajo fuese posible.

Índice General

DEFECTOS DEPENDIENTES DE TEMPERATURA EN MUTANTES DE <i>Drosophila melanogaster</i> PARA LA PROTEÍNA SINÁPTICA DISC-LARGE.....	0
<i>Dedicatoria</i>	1
<i>Agradecimientos</i>	2
<i>Índice General</i>	3
<i>Índice de Figuras</i>	4
<i>Índice de Tablas</i>	4
<i>Índice de Gráficos</i>	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. Revisión Bibliográfica	9
1.1 Generalidades sobre la sinapsis	9
1.2 Proteínas Andamio	10
1.3 El gen <i>dlg</i>	10
Dominios Proteicos de <i>Dlg</i>	12
1.4 La unión neuromuscular en <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	12
Ciclo de Vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.5 Efectos de la temperatura en el ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.6 HIPÓTESIS	16
1.7 OBJETIVO GENERAL	16
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1 Material Biológico	17
2.1.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> :	17
2.1.2 Ensayos de sobrevivencia y locomoción	18
2.1.3 Reactivos y Soluciones	19
Reactivos	19
Anticuerpos primarios:	19
Anticuerpos secundarios:.....	19
Preparación de extractos de tejidos.....	19
Inmunohistoquímica	20
Western blot.....	20
2.2. Métodos	21
2.2.1 Ensayo para obtener curvas de sobrevida.....	21
2.2.2 Ensayo curvas de Fertilidad	21
2.2.3 Ensayo Locomoción y capacidad olfatoria en Adultos.	21
2.2.4 Ensayo de Locomoción, Plasticidad y Fototáctismo en larvas de segundo estadio tardío de <i>D. melanogaster</i>	22
2.2.5 Inmunohistoquímica de Botones Sinápticos:	22
2.2.6 Rescate del gen <i>Dlg</i> , a fin de recuperar la correcta función sináptica	23
Construcción del sistema de regulación de la expresión de <i>Dlg</i> mediante el sistema UAS-Gal4. ...	23
Western Blot	24
Construcción del sistema de rescate de la expresión de <i>Dlg</i> mediante el sistema UAS-Gal4.	25

2.2.7 Análisis estadístico	26
3. Resultados.....	27
3.1 Determinación de curvas de sobrevivencia (longevidad).....	27
3.2 Determinación de Curvas de fertilidad.....	29
3.2.1 Curvas de Ovoposición, según T° en cepas control y mutantes dlgs97.....	29
3.2.2 Curvas de pupación según T° para cepas control y mutantes dlgs97.....	32
3.2.3 Curvas de eclosión según T° para cepas control y mutantes dlgs97.....	34
3.3 Determinación de patrón de locomoción en adultos a 23° y 29°C	36
3.3.1 Determinación de capacidad locomotora en cepas controles transgénicas con pérdida de expresión de la proteína sináptica Dlg S97.	38
3.3.2 Determinación de rescate de la capacidad locomotora en adultos de cepas transgénicas por recuperación de la expresión de Dlg S97, mediante cruces selectivas con el conductor neuronal elav, y el conductor muscular C57.	39
3.4 Determinación de Capacidad Olfatoria en Adultos.....	40
3.4.1 Determinación de capacidad olfatoria en cepas cantones y mutantes dlgs97 a 23°C y 29°C.....	40
3.4.2 Determinación de capacidad olfativa en cepas controles transgénicas con pérdida de expresión de la proteína sináptica Dlg S97.....	40
3.4.3 Determinación de rescate de la capacidad olfatoria en cepas transgénicas por recuperación de la expresión de Dlg S97.....	41
3.5 Determinación de índice locomotor y capacidad olfatoria en larvas de segundo estadio de Drosophila melanogaster, cepas cantones, y mutantes dlgs, utilizadas como controles, a 23°C y 29°C y rescate de la capacidad locomotora en cepas transgénicas con sobreexpresión de la proteína sináptica Dlg S97.	42
3.6 Determinación de índice de fotofobia en larvas de segundo estadio de Drosophila melanogaster.	43
3.7 Conteo de botones Sinápticos mediante IHQ.....	44
3.8. Determinación de la pérdida de expresión de diversas isoformas de la proteína sináptica Disc-large, en cepas recombinadas, mediante 8 cruces consecutivas con mutantes nulas para DlgS97	44
4. Discusión	1
5. Conclusiones	50
6. Referencias Bibliograficas.....	51

Índice de Figuras

<i>Figura 1: Esquema del ciclo de vida de Drosophila melanogaster.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2: Pared muscular de larva de tercer estadio.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3: Clasificación de botones sinápticos.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4: Esquema del sistema UAS-GAL4 como herramienta para dirigir expresión de genes.....</i>	<i>26</i>

Índice de Tablas

<i>Tabla 1: Cepas de Drosophila melanogaster utilizadas en esta tesis.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 2: esquema de cruces de cepas transgénicas UAS-Gal 4 con mutantes dlgs.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3: esquema de cruces de cepas transgénicas recombinadas con dlgs con el sistema UAS-Gal4.....</i>	<i>26</i>

Índice de Gráficos

<i>Gráfico 1: Sobrevivencia a 23°C en cepas CS, dlgs97¹³⁸ y dlgs97⁵.....</i>	<i>27</i>
<i>Gráfico 2: Sobrevivencia a 29°C en cepas CS, dlgs97¹³⁸ y dlgs97⁵,.....</i>	<i>27</i>

Gráfico 3: Sobrevida a 23° y 29° C en cepa CS, c.....	28
Gráfico 4: Sobrevida a 23°C y 29° C en cepa.....	28
Gráfico 5: Sobrevida a 23° y 29° C en cepa	29
Gráfico 6: Ovoposición según T° en cepa CS.....	29
Gráfico 7: Ovoposición según T° en cepa dlgs97 ⁵	30
Gráfico 8: Ovoposición, según T° en cepa dlgs97 ¹³⁸	30
Gráfico 9: Ovoposición, comparativa entre cepas CS, dlgs97 ⁵ y dlgs97 ¹³⁸ a 23°C.....	31
Gráfico 10: Ovoposición comparativa entre cepas CS, dlgs97 ⁵ y dlgs97 ¹³⁸ a 29°C	31
Gráfico 11: Porcentaje de pupación según T° en cepa CS.....	32
Gráfico 12: Porcentaje de pupación según T° en cepa dlgs97 ⁵	32
Gráfico 13: % de pupación según T° en cepa.....	33
Gráfico 14: Pupación comparativa a 23°C en cepas CS, y mutantes dlgs97	33
Gráfico 15: Pupación comparativa a 29°C en cepas.....	34
Gráfico 16: Porcentaje de eclosión según T° en cepa control CS,	34
Gráfico 17: % de eclosión según T° en cepa dlgs97 ⁵ , a 23°C	35
Gráfico 18: Porcentaje de eclosión según T° en cepa dlgs97 ¹³⁸ según T°, a 23°C.....	35
Gráfico 19: Eclosión comparativa 23°C, en cepas control y mutantes DlgS97	36
Gráfico 20: Eclosión comparativa 29°C, en cepas control y mutantes DlgS97.	36
Gráfico 21: Índice de locomoción en adultos de cepas control, y mutantes DlgS97; ambientadas a 23°C	37
Gráfico 22: Índice de locomoción en adultos de cepas control, y mutantes DlgS97 ambientadas a 29°C	37
Gráfico 23: Dependencia de la T° en el índice locomotor.....	38
Gráfico 26: Capacidad olfatoria según T° en cepas CS y mutantes dlgs97	40
Gráfico 27: Efecto de T° en la capacidad olfatoria en cepas sin expresión de DLGS97	40
Gráfico 28: Rescate de la capacidad Olfativa mediante sobreexpresión de DlgS97	41
Gráfico 30: Rescate de la capacidad locomotora en larva II.....	43
Gráfico 31: Índice de Fotofobia en larva II en cepas CS y mutantes dlgs97 a 23°C.....	43
Gráfico 32: Índice de Fotofobia en larva II en cepas CS y mutantes dlgs97 a 29°C,.....	44
Gráfico 33: Dependencia de T° en el N° de botones sinápticos en larva III.....	44

ABREVIATURAS

cDNA	: Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DPS	: Densidad Postsináptica
Dlg	: Discs large
EGFP	: “Enhanced Green Fluorescent Protein” (Proteína fluorescente verde mejorada)
FasII	: Fasciclina II
GST	: Glutación S-Transferasa
GUK	: Guanilato quinasa
GUK-h	: GUK-holder (gancho)
IHQ	: Inmunohistoquímica
L2 y L3	: Larva de segundo y tercer estadio respectivamente
mRNA	: Ácido ribonucleico mensajero
MAGUK	: “Membrane-Associated Guanylate Kinases” (Guanilato quinasa asociada a membrana)
NMDA	: N-metil D-aspartato
NT	: neurotransmisor
PAF	: paraformaldehído
Pb	: Pares de bases
PBS	: “Phosphate Buffer Saline” (Tampón fosfato salino)
PBTG	: Amortiguador fosfato de sodio, Triton X-100 0,3%, suero de cabra 5%
PDZ	: PSD-95/ Dlg/ ZO-1
PSD-95	: Proteína de densidad postsináptica de 95 Kda
PT	: Amortiguador fosfato de sodio, Triton X-100 0,3%
RNAi	: Ácido ribonucleico de interferencia
RSS	: Retículo subsináptico
SAP	: “Sinapsis associated protein” (Proteína asociada a sinapsis)
SDS	: dodecilsulfato de sodio
SH3	: dominio de homología src tipo 3
SNM	: sinapsis neuromuscular
UAS	: “upstream activation sequence” (secuencia de activación río arriba)
ZO-1	: Zónula ocludens-1
WB	: Western Blot

RESUMEN

La correcta ubicación de todos los componentes sinápticos durante el desarrollo requiere del ordenamiento preciso de una red de proteínas; este ordenamiento es provisto por proteínas andamio, pertenecientes a 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 a través de sus dominios de interacción proteína-proteína, formando complejos macromoleculares multiproteicos asociados a membrana.

Se ha descrito que el gen *discs-large* de *Drosophila melanogaster*, codifica para, al menos, dos proteínas andamio de la familia MAGUK. La sinapsis neuromuscular de la larva de *Drosophila* es una sinapsis glutamatérgica. En ella la proteína andamio Discs large (Dlg) cumple un papel importante en la formación de la sinapsis y en la localización de proteínas involucradas en la transducción de señales. Gracias a la conservación de los procesos básicos de transmisión sináptica, la sinapsis neuromuscular de la larva de *Drosophila melanogaster* ha demostrado ser un excelente modelo de estudio de sinapsis centrales de mamíferos.

Numerosos estudios han demostrado que la proteína Dlg determina la localización sináptica del canal de potasio tipo Shaker y de Fasciclina II (FasII), una proteína de adhesión celular involucrada en el crecimiento y plasticidad de la sinapsis neuromuscular. Además, Dlg participa en múltiples procesos, incluyendo el mantenimiento de la adhesión y polaridad apicobasal de los epitelios y la neurogénesis embrionaria. El gen *dlg* también participa en el control de la proliferación en tejido epitelial por lo que se le considera un gen supresor de tumores.

Todas estas funciones están asociadas a una única isoforma, DlgA. Sin embargo, en la sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile se aisló 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 estudio se describen los defectos ocasionados por el estrés térmico tanto agudo como crónico en individuos de *Drosophila melanogaster* que expresan variantes del gen *dlg* con dominio S97N, para variables como viabilidad, fertilidad, conducta locomotora de la larva y el adulto, y en la estructura de la sinapsis de la unión neuromuscular de la larva.

SUMMARY

“Temperature dependent defects in mutant of *Drosophila melanogaster* for disc-large synaptic protein”

The correct localization of all synaptic components during development requires the precise arrangement of a protein network, this arrangement is provided by scaffolding proteins of the MAGUK family (membrane-associated guanylate kinases). The members of this family recruit receptors, ion channels, components of signal transduction cascades and cytoskeletal proteins through their protein-protein interaction domains, forming macromolecular multiprotein complexes associated to membrane.

It has been reported that the discs-large (*dlg*) gene, of *Drosophila melanogaster*, encodes at least two scaffold proteins of the MAGUK family. The larval neuromuscular synapse of *Drosophila* is a glutamatergic synapses. There the scaffolding protein Discs large (Dlg) plays an important role in the synapse formation and in the localization of proteins involved in signal transduction. Thanks to the conservation of the basic processes of synaptic transmission, the larval neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster* has proven to be an excellent model for studying mammalian central synapses.

Numerous studies have demonstrated that Dlg is crucial for the synaptic localization of the Shaker potassium channel and of Fasciclin type II (FasII), a protein involved in cell adhesion and growth plasticity at the neuromuscular synapse. Dlg, also participates in multiple processes, including maintenance of the cell adhesion and polarity of epithelia and the embryonic neurogenesis. Dlg is also involved in the control of the proliferation the reason that it is considered a tumor suppressor gene.

All these functions are associated with a single isoform, DlgA. However, in University of Chile, Faculty of Medicine, Cellular Molecular Neurobiology Laboratory' fly room we have isolated a number of transcripts corresponding to alternative processing variants of the *dlg* gene having in the 5' end a region that encodes a segment of 65 amino acids called S97N that is absent in DlgA. Dlg variants containing S97N known as DlgS97 protein are expressed only in nervous system and muscle, unlike DlgA, which is also expressed in epithelial cells. This study describes the effects of both acute and chronic heat stress in *Drosophila* mutants of the *dlgS97* gene (*dlg* variants with S97N domain) on viability, life span, fertility, locomotor behavior of the larva and adult, and the structure of the larval neuromuscular junction.

1.

Revisión Bibliográfica

1.1 Generalidades sobre la sinapsis

Todas las funciones del sistema nervioso central (SN) durante el desarrollo dependen de la formación de una estructura neuronal organizada. Un paso crucial en este proceso es la formación de sinapsis, una unión intercelular especializada que produce la comunicación entre dos células específicas eléctricamente excitables: las neuronas pre y postsinápticas. Las sinapsis son sitios dinámicos de transferencia de información entre neuronas, que se realiza mediante moléculas neurotransmisoras (NT).

La transmisión de la información en la sinapsis depende de la estimulación eléctrica, y de la actividad de las proteínas pre y postsinápticas, que deben localizarse en ambos lados con una perfecta sincronía, tanto espacial como temporal. La sinaptogénesis define el sitio de la unión intercelular y provee el alineamiento entre el aparato presináptico y el receptor postsináptico (Budnik *et al.*, 1996).

En la membrana post sináptica, grupos de receptores de NT se contraponen a los terminales presinápticos, permitiendo la generación de la depolarización postsináptica necesaria para desencadenar el potencial de acción (Sinapsis glutamatérgica, excitatoria).

Los receptores a neurotransmisores, se encuentran en la densidad postsináptica (DPS), un micro-dominio de la membrana postsináptica que contiene además, canales iónicos, proteínas de transducción de señales, moléculas de adhesión y del citoesqueleto que forman grandes complejos proteicos (Garner *et al.*, 2000; Sheng & Sala., 2001). El reclutamiento de estos complejos y su organización requiere del ordenamiento preciso de las proteínas que los componen, a las que se denomina proteínas andamio las cuales presentan varios dominios modulares de interacción proteína-proteína y son componentes centrales de los complejos en los que participa una red de proteínas en la región submembranosa de la célula, tanto pre como postsináptica. Estos complejos juegan un papel esencial en la maduración y la plasticidad sináptica (Funke *et al.*, 2005).

1.2 Proteínas Andamio

Las proteínas andamio son aquellas que permiten el correcto ensamblaje de complejos proteicos específicos en regiones particulares de la célula, donde son necesarios para la transducción de señales o la definición de dominios subcelulares específicos. Entre las proteínas andamio involucradas en la determinación de la estructura sináptica de la sinapsis glutamatérgica, se encuentran proteínas pertenecientes a la familia MAGUK (del inglés “membrane-associated guanylate kinases”), que poseen tres dominios PDZ (PSD-95, Disc large y ZO-1), identificados a partir de la similitud de secuencia entre la proteína de densidad postsináptica 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. Estos dominios son de especial relevancia, ya que a través de ellos mediante la interacción proteína-proteína se reclutan los componentes sinápticos (Kuhlendahl *et al.*, 1998; Sheng & Sala, 2001; Sierralta & Mendoza, 2004;).

Se ha descrito la presencia de la familia MAGUKs en vertebrados, nemátodos y moscas. En la sinapsis glutamatérgica de mamíferos se encuentran SAP97/hDLG, PSD-95/SAP90, SAP102/NE-DLG y Chapsina 110/PSD-93, donde 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 *et al.*, 1992; Caruana, 2002;).

1.3 El gen *dlg*

En la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, existe un único homólogo de la familia de proteínas PSD95/SAP90 (con dominios PDZ) denominada Dlg (discs large) (Woods & Bryant, 1991; Budnik *et al.*, 1996) cuyos productos pertenecen a la familia de proteínas andamio MAGUK de mamífero asociada a sinapsis (SAP) y que se expresan en las sinapsis, particularmente en la sinapsis neuromuscular de la larva (SNM), donde se localizan tanto en el espacio pre como en el 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 UNM de funcionalidad homóloga a la densidad postsináptica (DPS) en vertebrados (Lahey *et al.*, 1994).

Las mutaciones con pérdida de *dlg* total son letales en estadio larval, en tanto que otras mutaciones que producen por ejemplo, proteínas truncadas causan la muerte durante estadios tardíos de pupa. Junto con esto, las mutantes de *dlg* parciales presentan defectos en el desarrollo neural, de los cuales el mejor estudiado es la alteración estructural y funcional de la sinapsis neuromuscular de la larva que muestra una estructura pre y postsináptica anormal, junto con defectos fisiológicos, tal es, como un aumento en la amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas (Budnik *et al.*, 1996).

El gen *dlg* también participa en células epiteliales en el mantenimiento de la polaridad ápico-basal y en el control de la proliferación y la neurogénesis embrionaria (Woods & Bryant, 1991). Por su papel en la proliferación del tejido epitelial, *dlg* ha sido identificado como un gen supresor de tumores en *Drosophila*, puesto que las mutantes *dlg* presentan neoplasias en discos imaginales (tejido especializado de la larva que originan los distintos tejidos del adulto y cerebro), defectos neurogénicos y pérdida de la polaridad ápico-basal en epitelios (Thomas *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 2000.)

En epitelio el mantenimiento de la polaridad ápico-basal y el control de la proliferación han sido atribuidas a un único locus de *dlg*: DLG A. Existe un grupo de variantes que presenta 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 *et al.*, 2000). Dentro de estas variantes está el transcrito denominado *DlgS97*, el cual codifica para una proteína que contiene el dominio S97N seguido por los dominios PDZ1-2-3, SH3 y GUK. Se ha visto que mutantes nulas o altamente hipomorfas de *dlgA* son letales mientras que mutantes *dlgS97* son viables y con defectos leves en la sinapsis que comprometen poco su comportamiento o reproducción a 25°C (condición óptima de desarrollo)(Mendoza-Topáz *et al.*, 2008).

En la larva, Dlg se expresa en los discos imaginales, en la sinapsis neuromuscular glutamatérgica (pre y postsináptico) y en el SNC (Woods & Bryant 1991; Budnick *et al.*, 1996). En el adulto, este gen se expresa en la cabeza, incluyendo el cerebro, los lóbulos ópticos y los ojos (Woods & Bryant., 1989).

Dlg también participa en el agrupamiento de canales de potasio voltaje dependientes y Fascilina II en la sinapsis neuromuscular de la larva (Tejedor *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1997). Dlg en *Drosophila* interactúa directamente con los canales de potasio voltaje dependientes, siendo esta interacción esencial para la agrupación y localización de estos canales en la unión neuromuscular de la larva (Thomas *et al.*, 1997).

En la SNM, DLGA y DLS97 se expresan de manera equivalente y la expresión de ambas variantes se encuentra aumentada cuando la otra variante está ausente. En otras palabras, tanto en mutantes nulos de DlgA como en mutantes nulos DlgS97 los niveles de Dlg (medidos como la inmunoreactividad del dominio PDZ) no se ven alterados más del 20%. Esto es acorde con la relativa normalidad de la conducta y la función sináptica básica de estas mutantes.

Dominios Proteicos de Dlg

Dominios PDZ: Su nombre proviene de la abreviación de las tres proteínas donde fueron identificadas primero: PSD-95, Disc large y ZO-1, que corresponden a dominios modulares de interacción proteína-proteína presentes en una gran variedad de proteínas eucariotas, poseen la capacidad de unirse al extremo de proteínas de membrana, permitiendo que éstas sean localizadas en regiones particulares de la célula a través de la unión a citoesqueleto. En *Drosophila melanogaster*, se ha demostrado su existencia en uniones septadas, que se unen a otras proteínas o a otros dominios PDZ (Doyle *et al.*, 1996).

Dominios SH3, HOOK y GUK: estos dominios determinan la asociación de Dlg con la región submembranosa de la célula y hacen que la proteína se ubique apropiadamente en el dominio sináptico (Houh *et al.*, 1997). El dominio GUK (homólogo de guanilato kinasa con baja o nula actividad quinasa) de PSD-95 se une *in vivo* e *in vitro* a proteínas asociadas a microtúbulos, como por ejemplo, a la proteína adaptadora GKAPs (*Guanilate kinase associated protein*).

1.4 La unión neuromuscular en Drosophila melanogaster como modelo de estudio

Ciclo de Vida de Drosophila melanogaster

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un insecto del orden Díptera holometábolo típico, donde su ciclo de vida se divide en cuatro estados: embrión, larva, pupa y adulto (Fig. 1). Las hembras durante la cima de postura llegan a colocar alrededor de 100 huevos diarios. El desarrollo embrionario óptimo ocurre tras 24 horas a una temperatura estándar de 25°C, donde el primer estadio larval sucede inmediatamente. La larva sufre dos mudas al final de 4 días a 25°C. La pupación toma otras 96 horas a 25°C, período en el que ocurre la metamorfosis. La eclosión de moscas adultas es a los 9 días posteriores a la ovoposición, a 25°C, emergen con las alas plegadas a lo largo, son delgadas y relativamente despigmentadas. Las hembras no se aparean, sino hasta las 12 horas de edad, y permanecen receptivas por al menos una semana, tiempo después del cual la respuesta

receptiva al macho declina paulatinamente. El máximo de ovoposición generalmente se observa entre los 4 y 15 días a 25°C; la segregación de machos y hembras durante las primeras 8 a 10 horas asegura que las hembras sean vírgenes (Sullivan *et al.*, 2000), para posteriores cruza selectivas.

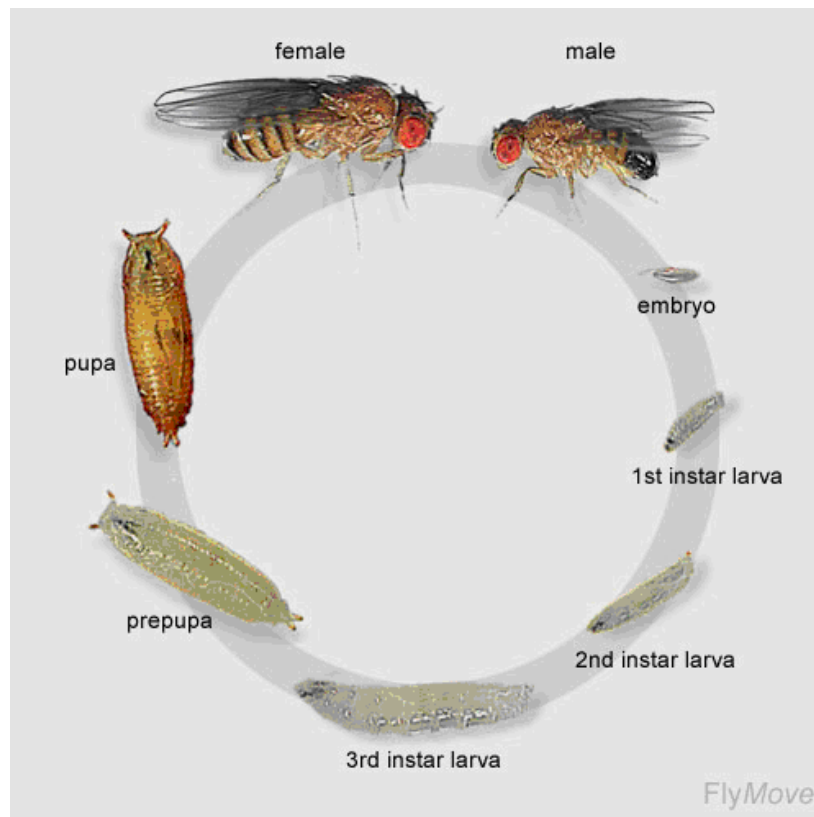


Figura 1: Esquema del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

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

La UNM en larvas de *Drosophila melanogaster* es un modelo de sinapsis glutamatérgica muy ventajoso ya que el tejido es altamente accesible, de fácil manejo y comparte una serie de características con la sinapsis glutamatérgica de mamíferos (Budnik & 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 *et al.*, 1996).

La musculatura larval presenta simetría bilateral y está compuesta de aproximadamente 60 células multinucleadas repetidas segmentalmente. Los segmentos musculares abdominales del A2 al A7 (Fig.2) son equivalentes entre sí, mientras que el A1 es levemente diferente (Keshishian *et al.*, 1996). Los músculos de la pared muscular de la larva son inervados por al menos tres clases de terminales nerviosos estructuralmente diferentes llamados botones sinápticos.

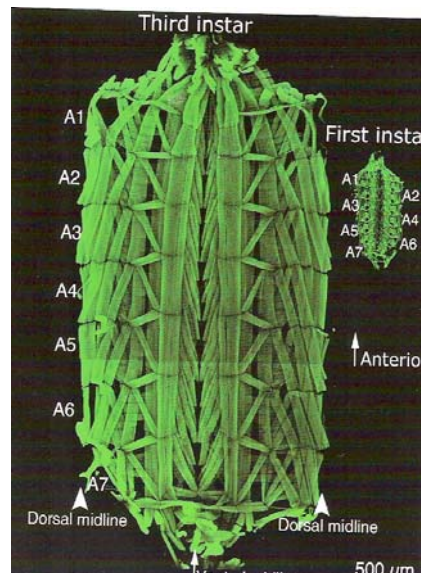


Figura 2: Pared muscular de larva de tercer estadio. (Gorczyca & Budnick, 1999).

Los botones sinápticos tipo I son glutamatergicos, éstos inervan todos los músculos (Fig. 3. A-E). Los botones tipo II (Fig. 3.C-D) contienen octopamina e inervan todos los músculos a excepción del octavo. La tercera clase de botones (Fig. 3.B-D) contienen péptidos tales como proctolina, péptido tipo insulina, o leucoquinina que inervan poblaciones discretas de fibras musculares (Budnik *et al.*, 1996; Budnik & Gramates 1999; Koh *et al.*, 2000). En este estudio, nos centraremos en el músculo 4, específicamente en el segmento abdominal A2, debido a que está inervado exclusivamente por botones tipo I.

En la larva la proteína Dlg se expresa en la membrana pre y postsináptica de los terminales sinápticos glutamatergico tipo I, siendo más prominentes los botones tipo Ib, asociándose al RSS (retículo subsináptico) 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 *et al.*, 1994).

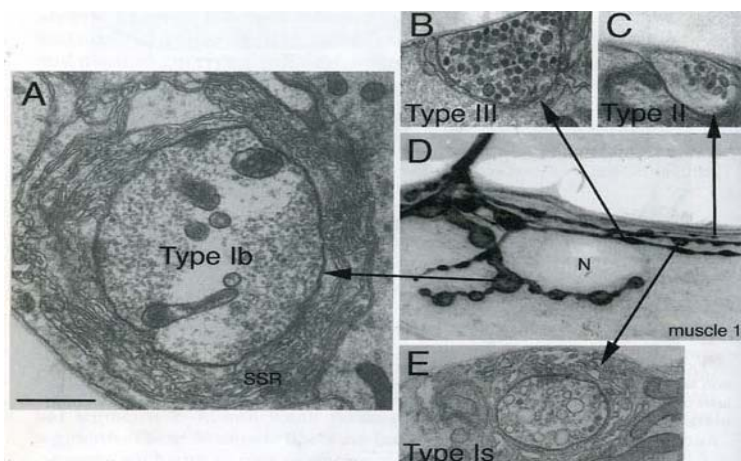


Figura 3: Clasificación de botones sinápticos.

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 & Gramates, 1999).

La mosca del vinagre ha sido uno de los organismos más utilizados como modelo de estudio, debido a características tales como, su pequeño tamaño, contar con un ciclo de vida corto, y por ser de fácil replicación y mantención en grandes cantidades en el laboratorio a muy bajo costo. Por otra parte, además de lo ya mencionado, existe un amplio conocimiento de su biología, su genoma ha sido completamente secuenciado, y en la actualidad existe una gran variedad de moscas mutantes disponibles, características que la convierten en un modelo ideal para la experimentación científica.

1.5 Efectos de la temperatura en el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

La respuesta a cambios en la temperatura ambiente, al igual que la respuesta a otros factores medio ambientales se ha mostrado por diferir genéticamente para una amplia variedad de parámetros en algunas sub-poblaciones de *Drosophila*, incluyendo entre ellos tamaño corporal y fecundidad.

El desarrollo desde la ovoposición hasta la eclosión ocurre más rápido entre 28°C y 29°C acortándose éste entre 1 y 3 días aproximadamente y el límite viable en tanto, se encuentra entre los 33.5°C y 34°C.

La mortalidad larval en extremos térmicos es particularmente mayor. Altas temperaturas pueden causar también problemas de infertilidad en machos; sin embargo, esta esterilidad puede ser resultado del desarrollo en alta temperatura, y es factible recobrarla devolviendo a los machos a un ambiente de 25°C durante unos 4 a 5 días. Las hembras, en tanto, son fértiles hasta 32°C pero con un número reducido de ovarios, y por ende, con una capacidad de postura muy disminuida.

Las sinapsis, así como otros procesos metabólicos son altamente sensibles a los cambios de temperatura. El aumento de la temperatura, conlleva un aumento en la cinética de todas las partículas que están en juego en el potencial de acción, así como también acelera la cinética de los canales iónicos, haciendo que en general todo el proceso sea más eficiente. Ahora bien, como ya se señaló anteriormente, las mutantes para la proteína Dlg, presentan alteraciones en su estructura sináptica y por tanto, cabe esperar que con alzas de temperatura tanto agudas como crónicas, éstas no sean capaces de responder a los estímulos tan eficientemente como un individuo no mutante. Individuos adultos de la mutante *DlgS97*, no presentan defectos en la locomoción, ni en su capacidad olfatoria a temperatura ambiente, a pesar de que en la sinapsis neuromuscular de la larva se detectan defectos en su fisiología, descritos como una amplitud aumentada de los potenciales en miniatura en los mutantes respecto a la moscas silvestres (Mendoza-Topaz *et al.*, 2008). Por otro lado, conductas más complejas o que requieren una mayor coordinación de varios circuitos como las conductas de ritmos circadianos o cortejo presentan defectos medibles (Mendoza-Topaz *et al.*, 2008). Esto sugiere que las sinapsis

están funcionando en su límite de capacidad y que cambios en la exigencia deberían permitir evidenciar los defectos no observables en condiciones de poca exigencia.

Cambios en la temperatura corporal de ectodermos a consecuencia de cambios en la temperatura medioambiental, afectan profundamente el rendimiento en la capacidad de supervivencia y adaptación al medio ambiente, así como también en la adecuación biológica y el traspaso de genes a la próxima generación. Los efectos de la temperatura suelen ser estudios de rutina en el laboratorio a diferentes temperaturas constantes, sin embargo, los efectos agudos de la temperatura en ectodermos han sido poco documentados, y *Drosophila* se presenta como un excelente modelo para establecer los impactos fisiológicos y en la adecuación biológica, producidos a causa de un estrés térmico tanto, agudo como crónico.

1.6 HIPÓTESIS

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

“Los mutantes para la proteína sináptica Dlg presentarán alteraciones sinápticas a altas temperaturas (29°C), aplicadas en forma aguda y crónica, que no se evidencian a temperatura ambiente (23°C-25°C) en individuos larvas y adultos de *Drosophila melanogaster*.”

1.7 OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones en la función sináptica inducidas por estrés térmico aplicado en forma aguda o crónica, en larvas y adultos de dos cepas mutantes para la proteína sináptica Dlg de *Drosophila melanogaster*

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las alteraciones en locomoción y capacidad olfatoria que se pueden presentar por efecto de un alza térmica aguda en adultos mutantes nulos para la proteína sináptica DlgS97 de *D. melanogaster*.
2. Evaluar posibles alteraciones en el desarrollo embrionario o neurodegeneración determinando las alteraciones en las curvas de supervivencia y fertilidad en ejemplares de mutantes nulos de la proteína DlgS97 sometidos a altas temperaturas en forma permanente.

3. Determinar posibles defectos causados por la alta temperatura aplicada en forma aguda en la locomoción y fototactismo en larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* mutantes para la proteína DlgS97.
4. Determinar posibles alteraciones del desarrollo neuromuscular en moscas mutantes nulas de la proteína DlgS97 al llevar a cabo su ciclo de vida a 29°C.

2. MATERIAL 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 (wilde tipe)	Seudonativa cantones (CS) con mutación el gen white que le confiere ojos blancos	Gentileza Dr. P. Labarca, CEC, Valdivia, Chile
<i>DlgS97¹³⁸</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ¹³⁸)	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.
<i>DlgS97⁵</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ⁵)	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.
<i>dlgS97¹³⁸ UAS dlg A</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ¹³⁸) que puede expresar el transcrito <i>dlgA</i> en tejidos que expresen el factor de transcripción GAL4	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.
<i>dlg⁵ UAS dlgA</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ⁵) que puede expresar el transcrito DlgA en tejidos que expresen el factor de transcripción GAL4	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.
<i>dlgS97¹³⁸ UAS dlg S97</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ¹³⁸) que puede expresar el transcrito <i>dlgS97</i> en tejidos que expresen el factor de transcripción GAL4	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile .
<i>dlgS97⁵ UAS dlg S97</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ⁵) que puede expresar el transcrito <i>dlgS97</i> en tejidos que expresen el factor de transcripción GAL4	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.
<i>dlgS97¹³⁸ UAS dlg S97 RT</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ¹³⁸) que puede expresar el transcrito <i>dlgS97</i> variante RT en tejidos que expresen el factor de	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

	transcripción GAL4	
<i>dlgS97¹³⁸ Gal 4-elav</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ¹³⁸) que expresa el factor de transcripción Gal4 en tejidos neuronales	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.
<i>dlgS97⁵ Gal 4-elav</i>	Mutante nula de DlgS97 (cepa ⁵) que expresa el factor de transcripción Gal4 en tejidos neuronales	Generada en sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

El stock de moscas fue mantenido a 23°C en botellas y tubos de crecimiento con medio de cultivo estándar (levadura, glucosa, harina, agar, ácido propiónico, nipagin, agua). Una replica del *stock* fue mantenida en incubador de 29°C en la sala de moscas del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

- Cepas pseudo-nativas: Como cepa tipo silvestre, se utilizó la cepa pseudo-nativa W1118 (CS) del tipo cantones.
- Cepas transgénicas: Se utilizó el sistema de expresión UAS-Gal4 para producir la sobreexpresión de la variante Dlg. Las cepas transgénicas Gal4 utilizadas fueron Gal4-C57 con expresión específica de UAS en músculo y Gal 4- elav con expresión específica neuronal. Las cepas UAS utilizadas fueron UAS S97, UAS DlgA´.
- Cepas mutantes: Como alelos mutantes de *dlg* se utilizaron *dlgS97¹³⁸* y *dlg⁵*.

2.1.2 Ensayos de sobrevivencia y locomoción

Tubos y botellas de crecimiento con medio de cultivo estándar.

Tubos de ensayo.

Benzaldehido 1%, como sustancia odorante repelente.

Algodón.

Placas petri de 150mm de circunferencia x 15mm de diámetro con superficie de agarosa 1,5%.

Levadura seca granulada Lefersa ®.

2.1.3 Reactivos y Soluciones

Reactivos

ANTICUERPOS PRIMARIOS:

Anti-DlgS97N, anticuerpo policlonal de conejo generado en el Laboratorio de Neurobiología Celular Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile contra el producto de la secuencia de 410 pb desde el ATG del clon EST LP07807 (Mendoza *et al.*, 2003), dilución 1:100.

Anti- DlgPDZ1-2(4F3), anticuerpo monoclonal contra los dominios PDZ 1 y 2 de Dlg (Hibridoma Bank, Iowa City, EE.UU.), dilución 1:100.

Anti-HRP (anti-horseradish peroxidase) conjugado a Cy5 (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, Pensilvania, EE.UU.), dilución 1:100.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS:

Anti-IgG de conejo y ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove Pensilvania, EE.UU.), dilución 1:300.

Anti- IgG (H+L) de conejo conjugado a Fit-C (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.), dilución 1:200.

Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a TRIT-C (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.), dilución 1:200.

Anti-IgG (H+L) de rata y conejo conjugado a Cy3 (Jackson ImmunoResearch 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 (tampón de lisis 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 CO₂ para anestesia de adultos.

Pinzas N° 5 Detmoxel no magnéticas.

Tijeras quirúrgicas.

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

INMUNOHISTOQUÍMICA

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.

Cámaras magnéticas para disección de larvas.

Pinzas N° 5 Detmoxel no magnéticas.

Tijeras quirúrgicas.

Formaldehído al 4% (Merck, Darmstadt, Alemania).

BSA (sero albúmina bovina) (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, Hércules, 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 0,5 % (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).

2.2. Métodos

2.2.1 Ensayo Para Obtener Curvas de Sobrevida

Se utilizaron tres tratamientos, con tres tubos de crecimiento o viales con 30 moscas machos por vial, de cada una de las cepas (cantonés y ambas mutantes) y fueron mantenidas en incubador de 29°C, hasta que murió el 100% de las moscas, esto a fin de determinar cuánto tiempo son capaces de vivir en estas condiciones, el cambio a tubos con medio de cultivo fresco se realizó cada 4 días y al mismo tiempo se realizó el conteo de sobrevivientes.

2.2.2 Ensayo Curvas de Fertilidad

Se utilizaron tres grupos, de 3 tubos de crecimiento con 5 hembras y 5 machos vírgenes para cada una de las cepas, y se fueron traspasando de un tubo a otro una vez al día durante 5 días consecutivos, al final de cada día se contó el número de huevos fecundados en cada tubo, esto se realizó tanto a temperatura ambiente de 23°C como a 29°C. En dichos tubos se contabilizó el número de pupas formadas al cuarto o quinto día post- ovoposición y al día 13 post- ovoposición se obtuvo el número de individuos eclosionados.

2.2.3 Ensayo Locomoción y Capacidad Olfatoria en Adultos.

Consiste en permitir que moscas adultas de 3 a 5 días de vida, no separadas por género, suban por un tubo de ensayo de 23 cm en posición vertical, al que se le ha acoplado otro tubo igual. Se observó el número de individuos capaz de pasar de un tubo a otro al cabo de 20 segundos. Aquellas moscas que pasaron al tubo de arriba se dejaron subir de un tubo en otro, de forma secuencial hasta completar diez tubos consecutivos. Se realizó el ensayo con moscas pseudo-nativas, mutantes, y transgénicas a temperatura ambiente de 23°C y luego se repitió el mismo ensayo en moscas criadas a igual temperatura pero a temperatura ambiente de 29°C y ambientadas en incubador de 29°C durante 3 horas previo al ensayo.

En este experimento se utilizaron tubos de ensayo, tapados con algodón con un n muestral de 35 a 40 moscas cada uno. Este ensayo es realizado a lo menos diez veces para cada cepa y se ha usado como indicador el número de moscas que queda en el primer tubo cada 20 segundos expresado como un índice de locomoción en factor del tiempo. El cálculo del índice de locomoción se hace asignando al primer tubo un puntaje de 0,5, que va aumentando consecutivamente con cada tubo, luego en número de moscas que no pasa al tubo siguiente, es multiplicado por el factor asignado a cada tubo y luego los resultados obtenidos a ambas temperaturas es analizado mediante la prueba t de student.

Para determinar la capacidad olfatoria de las moscas, se colocaron 5 moscas jóvenes, no separadas por género (3 a 5 días de vida) en tubos de crecimiento vacíos, y con un ayuno previo de 2 a 3 horas, posteriormente los tubos son marcados con lápiz de tinta, separando el tubo en dos compartimientos de 3 cm cada uno, luego se coloca el tubo horizontalmente con una sustancia odorante *repelente* (benzaldehído 1%) en la boca del mismo durante 1 min. El índice de olfacción está determinado por el número de moscas en el extremo más alejado del odorante, en lapsos de 5 segundos consecutivos durante un minuto. Este ensayo se realizó primero con moscas de la cepa pseudo-nativa, mutantes y transgénicas a 23°C y posteriormente en las mismas cepas en sala temperada a 29°C y ambientadas previamente durante 3 horas y en ayuno en incubador de 29°C. El índice de olfacción corresponde a la media entre aquellos individuos que permanecen alejados del odorante.

2.2.4 Ensayo de Locomoción, Plasticidad y Fototáctismo en Larvas de Segundo Estadio Tardío de D. melanogaster.

Los ensayos se realizaron en larvas de segundo estadio tardío, (larvas que viven enterradas en el alimento) en placas de gel de agar. Se utilizan cápsulas de Petri de 150 x 15 mm, cubiertas con 75 ml de agarosa al 1,5% enfiada a temperatura ambiente. Para el ensayo de locomoción, se colectaron larvas de segundo estadio, los restos de alimento fueron retirados con abundante agua destilada tibia, luego aproximadamente 10 larvas fueron puestas en el borde de la placa, mientras que, sobre el centro de la superficie de agar se colocó una pasta de levadura disuelta en agua destilada y se midió el tiempo que tardaron las larvas en llegar al alimento.

Para el ensayo de fototáctismo, se utilizó una placa Petri idéntica a la anterior, donde en su extremo superior fue cubierto cubierta por un forro de cartón con un orificio circular de 2 cm de diámetro en el centro de la placa, las larvas se pusieron en el centro y por la ventana en el cartón se dejó pasar un haz de luz fría; luego se registró el tiempo de huida de las larvas. La determinación de la plasticidad sináptica se estableció a partir de la comparación estadística de estos ensayos realizados a 22°C y a 29°C, para cada una de las cepas en estudio. Para cada ensayo, el índice de locomoción resultó del tiempo de llegada o la distribución espacial de las larvas en la placa de agar. El tiempo medio corresponde al tiempo en que la mitad del total de larvas en el ensayo alcanza la levadura.

2.2.5 Inmunohistoquímica de Botones Sinápticos:

Con el fin de determinar el cambio en el número de botones sinápticos en función de la temperatura en las mutantes *dlg*, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica en larvas de tercer estadio (larvas que ascienden por las paredes del vial sin espiráculos visibles) de *Drosophila melanogaster*, analizando los botones tipo I en el músculo 4 en el segundo segmento abdominal de la

larva, A2. Para realizar dichos experimentos, se colectaron larvas que ascienden por el tubo y se colocaron en medio de disección frío, se inmovilizaron fijando sus extremos anterior y posterior con alfileres entomológicos, en cámaras magnéticas para larvas, con la región dorsal hacia arriba. Una vez inmovilizadas fueron disecadas 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 se abrió completamente con otros alfileres, dejando los músculos expuestos y estirados. El material así dispuesto se fijó en paraformaldehído al 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 4 veces durante 15 minutos con tampón PT (PBS, Tritón X-100 0,1 %), para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo primario, anti-Dlg PDZ1-2 (4F3), a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, después de lavar nuevamente 4 veces durante 15 minutos con PT las paredes musculares se incubaron con el anticuerpo secundario, FitC, durante 2 horas a temperatura ambiente, luego fueron lavadas nuevamente 4 veces durante 15 minutos con PT, para posteriormente ser equilibradas con glicerol 80% durante una hora y finalmente ser colocadas en medio de montaje “vecta shield” sobre un portaobjetos. Las muestras obtenidas se observaron mediante microscopio de fluorescencia Nikon, dónde se registró el número de botones sinápticos visibles en los segmento A2, en larvas realizadas de todas las cepas en estudio, mantenidas a 23°C y contrastadas con aquellas mantenidas por tres horas en estrés térmico de 29°C.

2.2.6 Rescate del gen Dlg, a fin de recuperar la correcta función sináptica.

Construcción del sistema de regulación de la expresión de Dlg mediante el sistema UAS-Gal4.

Se utilizó el sistema de expresión UAS-Gal4 (secuencia activadora río-arriba, “Upstream Activation Sequence”) como herramienta para dirigir expresión de genes. Para esto cepas mutantes *dlgS97* (línea⁵ y línea¹³⁸) fueron recombinadas con cepas Gal4 de expresión neuronal y muscular o con cepas UAS para *dlgA* y *dlgS97*. Estas cepas fueron generadas en el laboratorio previamente. Sin embargo al poner a prueba estas cepas se detectó una falta de fenotipo mutante en la mayoría de las cepas. Para recuperar el fenotipo mutante se realizó una serie de cruza de las cepas recombinadas con las cepas mutantes originales (con ojos blancos). En total se realizó esta crusa durante 8 generaciones consecutivas, siempre recuperando las moscas mutantes y con inserciones ya sea Gal4 o UAS (con ojos rojos). Al final de esta serie de cruza se realizaron ensayos conductuales que mostraron los defectos descritos previamente para las mutantes, demostrando así que la limpieza genotípica permitió recuperar el fenotipo mutante. El objetivo de realizar estas cruza fue magnificar fenotípicamente los posibles defectos que presentaran las mutantes nulas de *DlgS97*, a causa de la carencia de expresión de los transcritos *dlgS97* y *dlgA* en UNM y poder cuantificar la magnitud del daño en funciones fisiológicas tales como, locomoción, plasticidad, fototactismo y capacidad olfativa.

Tabla 2: esquema de cruzas de cepas transgénicas UAS-Gal 4 con mutantes *dlg*

Macho	Hembra
<i>dlgS97¹³⁸</i>	<i>dlgS97¹³⁸ UAS <i>dlg A</i></i>
<i>dlgS97¹³⁸</i>	<i>dlgS97¹³⁸ UAS <i>dlg S97</i></i>
<i>dlgS97¹³⁸</i>	<i>dlgS97¹³⁸ UAS <i>dlg S97 RT</i></i>
<i>dlgS97¹³⁸</i>	<i>dlgS97¹³⁸ Gal 4-<i>elav</i></i>
<i>dlgS97⁵</i>	<i>dlgS97⁵ UAS <i>dlgA</i></i>
<i>dlgS97⁵</i>	<i>dlgS97⁵ UAS <i>dlg S97</i></i>
<i>dlgS97⁵</i>	<i>dlg⁵ dlgS97⁵ Gal 4-<i>elav</i></i>

Estas cepas fueron utilizadas como controles mutantes y las cruzas entre ellas permitieron realizar los rescates fenotípicos a 23° y 29°C en los ensayos de locomoción y olfacción en adultos de mutantes para el gen *dlg* de *Drosophila melanogaster*. La pérdida de la expresión de DlgS97 es demostrada mediante WB.

Western Blot

Preparación de extractos de cabeza de mosca adulta de 3 a 5 días de vida: Las moscas adultas se colectaron de las botellas de crianza y se colocaron sobre una cámara de CO₂, una vez anestesiadas se cortaron las cabezas y rápidamente fueron traspasadas a placas que contenían el amortiguador salino de disección frío. Una vez que se obtuvieron 20 cabezas para cada cepa, estas fueron homogeneizadas manualmente sobre hielo en un homogeneizador de vidrio que contenía 100 µl de tampón de lisis RIPA para 20 cabezas. 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 SDS-PAGE de poliacrilamida. Se cargó una cantidad equivalente de microgramos de proteínas totales en cada carril, correspondiente a dos cabezas por carril y se resolvieron en un gel de acrilamida SDS al 10%. Cada gel se sometió a un voltaje constante de 110 volts y 0.05 A, hasta la caída del frente de corrida.

Inmunomarcación en membranas de nitrocelulosa: Las proteínas separadas electroforéticamente en condiciones desnaturantes fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a 110 volts, 0.2 A. 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 20, 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 20, 0,5 %+ leche descremada en polvo 5% durante toda la noche con agitación a 4°C. Los anticuerpos usados fueron un anticuerpo policlonal purificado anti-Dlg_{S97N} (1:500) generados en conejo, un anticuerpo monoclonal anti- Dlg_{PDZ1-2}, ambos anti-ratón (1:1000). Como control de carga se corrió un gel de poliacrilamida con las mismas cantidades de proteína, teñido con solución de azul de Coomassie y secado mediante método manual en bastidor.

Luego de incubar con el anticuerpo primario se lavó 4 veces con agitación durante 5 minutos con PBS Tween 20 0,5% a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Anti-DlgS97N (purificado) anti-conejo (1:5.000) o Anti-DlgPDZ anti-ratón (1:20.000) 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 sumergida 5 minutos en una solución fijadora.

Construcción del sistema de rescate de la expresión de Dlg mediante el sistema UAS-Gal4.

En este caso se utilizó el sistema UAS-Gal 4 para producir la sobre expresión de la proteína DlgA o DlgS97, las que se expresan como proteína de fusión a GFP (del inglés *green fluorescent protein*). El activador transcripcional de levadura Gal4 se une a la secuencia UAS, la cual está unida al gen Dlg. 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 *Dlg* estará dirigida por alguno de estos patrones de expresión gracias al cruce apropiado entre la línea enhancer trap Gal4 y el transgén *dlg* unido a UAS.

El cruce selectivo entre estas cepas permite recuperar la expresión fenotípica en UNM y otros sitios de expresión ya mencionados para los transcritos *dlgS97* y *dlgA*. El rescate es demostrado mediante ensayos de locomoción y olfato en larvas y adultos, dónde se espera la recuperación de un patrón normal de movimiento similar estadísticamente a la cepa pseudo-nativa. Para esto se realizan las siguientes cruces:

Tabla 3: esquema de cruzas de cepas transgénicas recombinadas con *dlg* con el sistema UAS-Gal4.

Macho	Hembra	Genotipo F1/Característica
<i>dlgS97⁵-Gal4- C57</i>	<i>dlgS97¹³⁸;UAS dlg A</i>	Expresión postsináptica de DlgA en cepa mutante DlgS97 (cepa ^{5/138}) <i>dlgS97⁵/dlgS97¹³⁸, Gal4-C57/UAS-dlgA</i>
<i>dlgS97⁵;Gal4- C57</i>	<i>dlgS97¹³⁸;UAS dlg S97</i>	Expresión postsináptica de DlgS97 en cepa mutante <i>dlgS97</i> (cepa ^{5/138})
<i>dlgS97⁵;Gal4- C57</i>	<i>dlgS97⁵;UAS dlgA</i>	Expresión postsináptica de DlgA, en cepa mutante <i>dlgS97</i> (cepa ⁵)
<i>dlgS97⁵;Gal4- C57</i>	<i>dlgS97⁵;UAS dlg S97</i>	Expresión postsináptica de DlgS97, en cepa mutante <i>dlgS97</i> (cepa ⁵)
<i>dlgS97¹³⁸,Gal4-elav</i>	<i>dlgS97¹³⁸;UAS dlg A</i>	Expresión neuronal de DlgA en cepa mutante <i>dlgS97</i> (cepa ¹³⁸)
<i>dlgS97⁵,Gal4-elav</i>	<i>dlgS97⁵;UAS dlgA</i>	Expresión neuronal de DlgA en cepa mutante de <i>dlgS97</i> (cepa ⁵)
<i>dlgS97⁵,Gal4-elav</i>	<i>dlgS97⁵;UAS dlg S97</i>	Expresión neuronal de DlgS97, en cepa mutante de <i>dlgS97</i> (cepa ⁵)

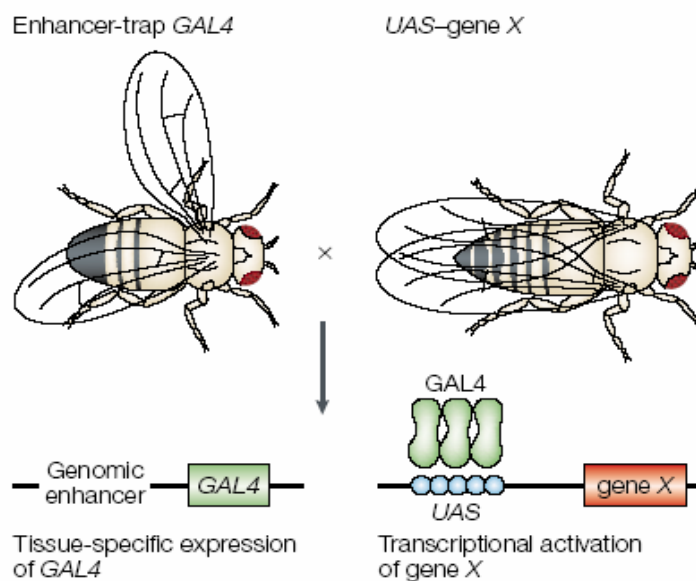


Figura 4: Esquema del sistema UAS-GAL4 como herramienta para dirigir expresión de genes. El activador transcripcional de levadura Gal4 se une a la secuencia de activación río arriba (UAS) la cual esta unida al gen de interés (gen X). El gen Gal4 se inserta al azar en el genoma de *Drosophila* generándose líneas (enhancer trap) que tendrá 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 transgén X unido a UAS.

2.2.7 Análisis estadístico.

El análisis estadístico paramétrico se realizó mediante el uso del software Microsoft Office Excel 2003 utilizando la prueba T de student, ya que se analizó el comportamiento de diferentes cepas frente a dos parámetros de temperatura distintos, y en aquellos casos con más de dos variables se utilizó análisis de varianza. 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 curvas de sobrevivencia (longevidad).

En los ensayos realizados en cepas *dlgS97¹³⁸* y *dlgS97⁵* comparadas con la cepa control CS, para obtener curvas de longevidad a 23°C y 29°C, se observó que a una temperatura ambiente de 23°C, no existen diferencias significativas entre las cepas, en tanto que a 29°C se observó una disminución de la tasa de sobrevivencia en las cepas mutantes, con un -33% en el caso de *dlgS97⁵*, y un -26,6% en la cepa *dlgS97¹³⁸* ($n=30$ para cada cepa, $p<0,0001$)

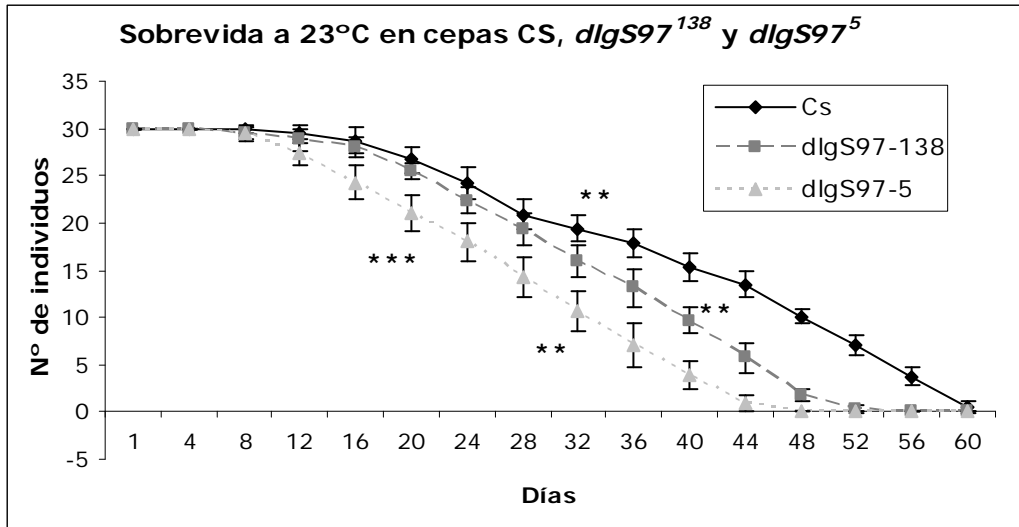


Gráfico 1: Sobrevivencia a 23°C en cepas CS, *dlgS97¹³⁸* y *dlgS97⁵*, Muestra la longevidad máxima en cepas sudo-nativas y mutantes nulas de *DlgS97*, donde la longevidad máxima está dada por la cepa CS desarrollada a 23°C. Cepas mutantes presentan una longevidad disminuida con diferencias significativas. (** = $p<0,001$, *** = $p<0,0001$).

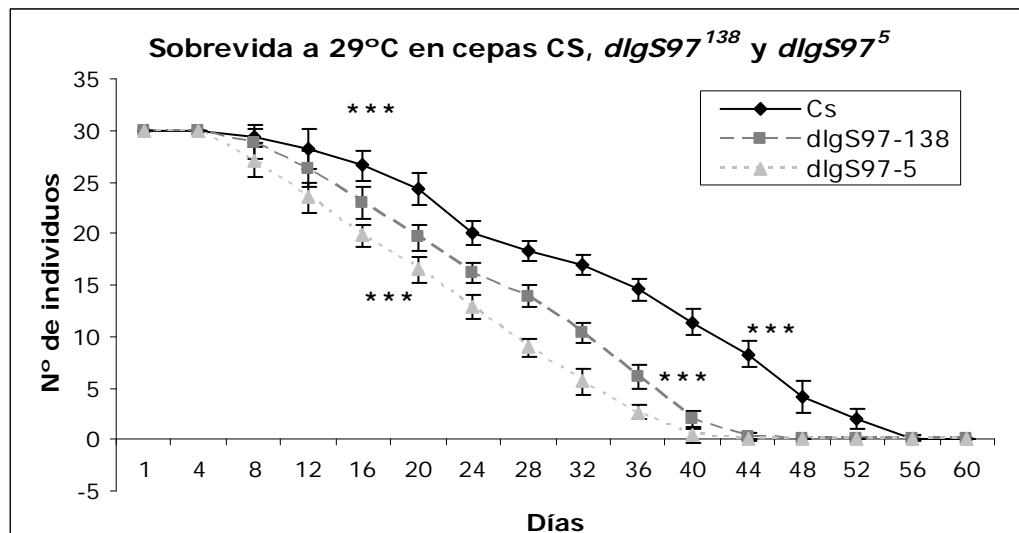


Gráfico 2: Sobrevivencia a 29°C en cepas CS, *dlgS97¹³⁸* y *dlgS97⁵*, comparación de cepa CS con mutantes nulas de *dlgS97*, a 29°C, donde la longevidad de las mutantes se ve significativamente disminuida (***) = $p<0,0001$).

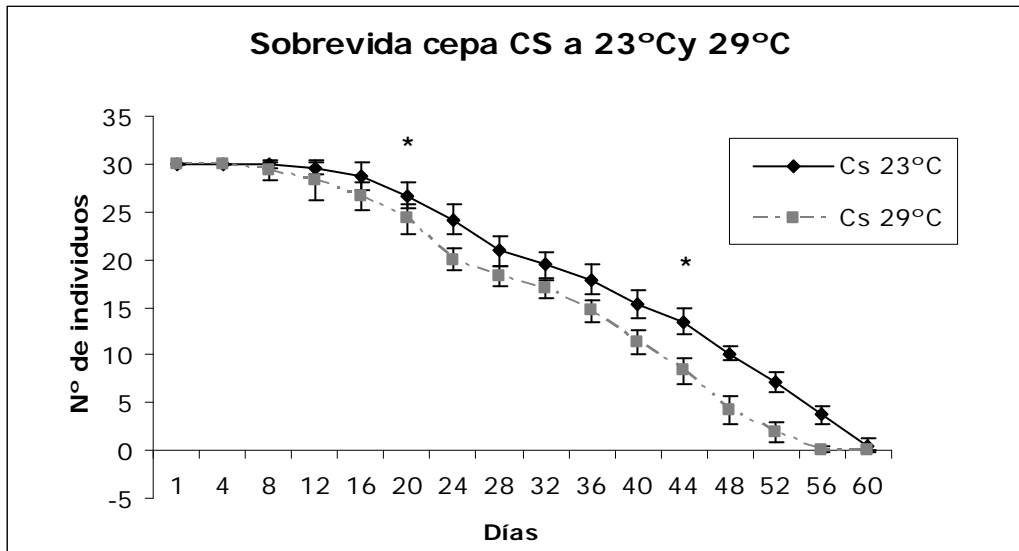


Gráfico 3: Sobrevida a 23° y 29° C en cepa CS, compara la capacidad de supervivencia en cepa CS, a 23°C y 29°C, se observan diferencias significativas. (*= $p < 0.01$).

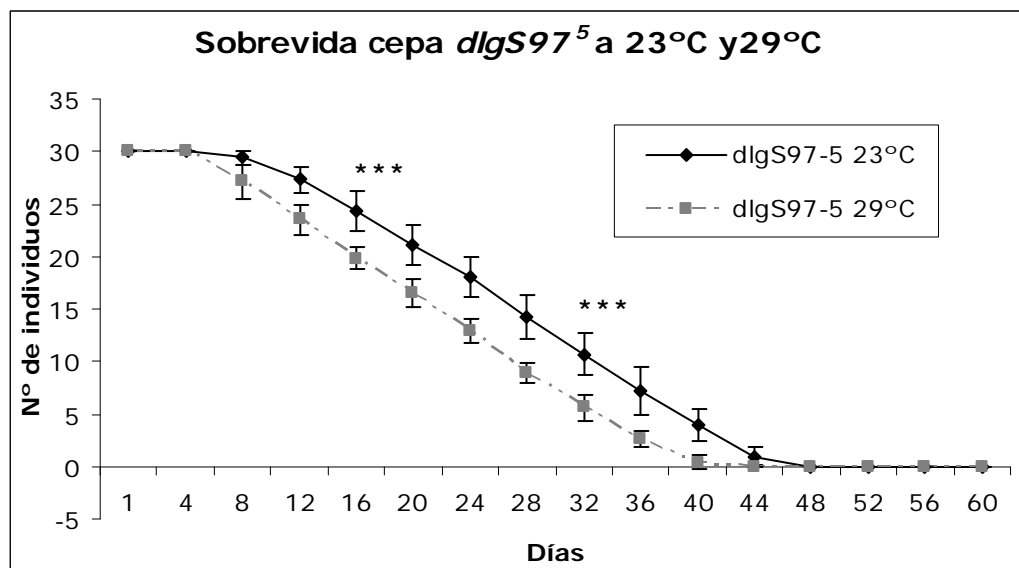


Gráfico 4: Sobrevida a 23°C y 29° C en cepa dlGS97⁵ compara la capacidad de supervivencia en cepa dlGS97⁵, a 23°C y 29°C, donde se observan mortalidad significativa (**= $p < 0.0001$) en los días 16 y 36, lo que se traduce en un acortamiento de la supervivencia en un 33%.

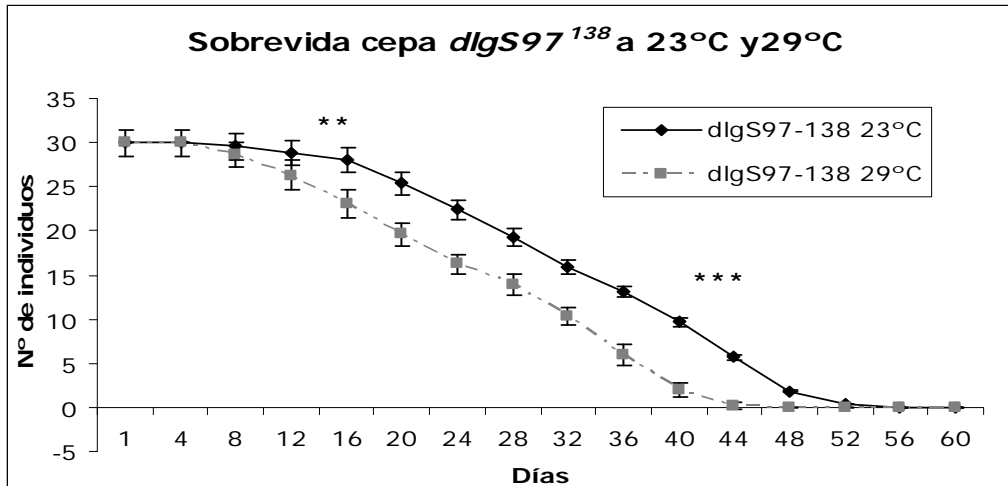


Gráfico 5: Sobrevida a 23° y 29° C en cepa *dlgS97¹³⁸* compara la capacidad de supervivencia en cepa *dlgS97¹³⁸*, a 23° y 29° C, donde se observa mortalidad significativa (**= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$) en los días 12 y 44, lo que se traduce en un acortamiento de la supervivencia en un 26.6%.

3.2 Determinación de Curvas de fertilidad.

En los ensayos para obtener curvas de ovoposición, pupación y eclosión, no se observaron diferencias entre cepas mutantes y cantones a 23°C, pero sí se observan diferencias significativas a 29°C, donde se obtuvieron tasas de postura similares a CS, pero la tasa de pupación fue menor y por ende se vio afectada la tasa de eclosión. Las diferencias observadas obedecen más bien a un cambio en el máximo de postura que se ve retrasado a 29°C y que se observa como un traslado en las curvas hacia la derecha, pero que carece de significancia estadística. (n=5 hembras/5 machos por cada cepa, $p < 0.0001$)

3.2.1 Curvas de Ovoposición, según T° en cepas control y mutantes *dlgS97*.

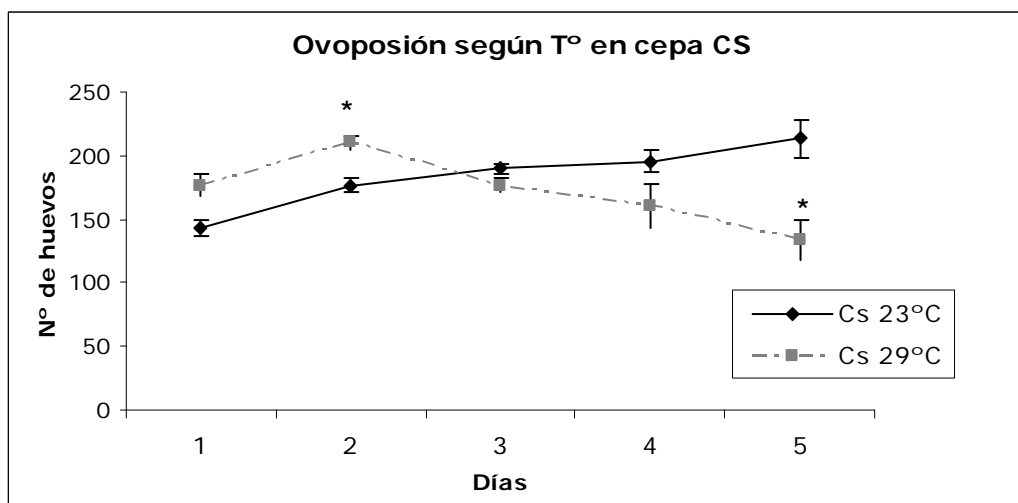


Gráfico 6: Ovoposición según T° en cepa CS, muestra la cantidad de postura diaria, durante 5 días consecutivos a 29°C, se observó un aceleramiento significativo en la receptividad de la hembra al macho, ya que,

la cima de postura a 23°C se alcanza al 5^{to} día, en tanto que a 29°C se alcanza al 2^{do} día, con una disminución significativa al día 5. (*= $p<0.01$).

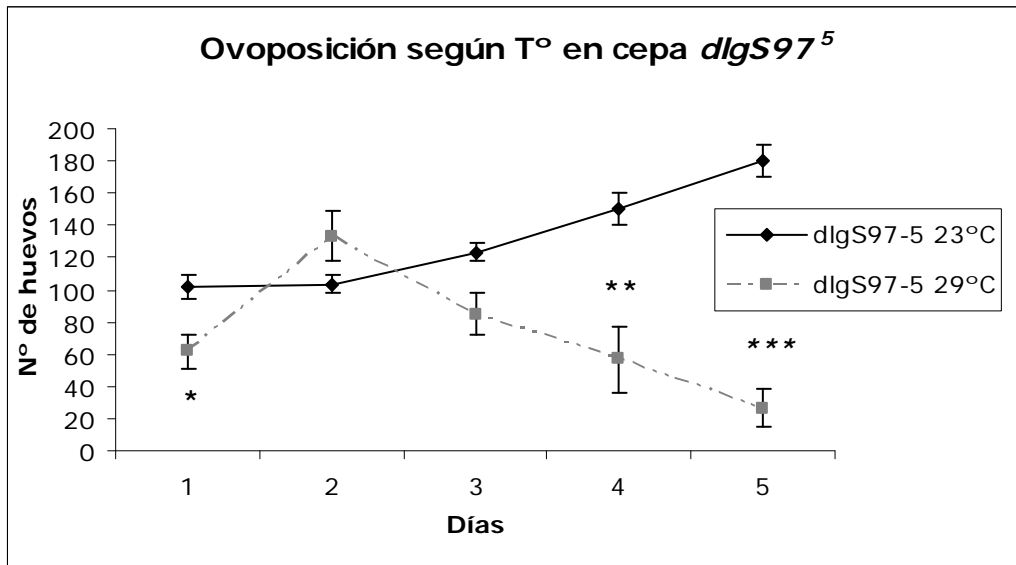


Gráfico 7: Ovoposición según T° en cepa $dlgS97^5$, se observa un disminución significativa en la ovoposición desde el primer día, siendo mayor al 4 y 5^{to} día en individuos sometidos a 29°C (*= $p<0.01$, **= $p<0.001$ y ***= $p<0.0001$). La cima de postura a 29°C se alcanzó al 2^{do} día de ensayo.

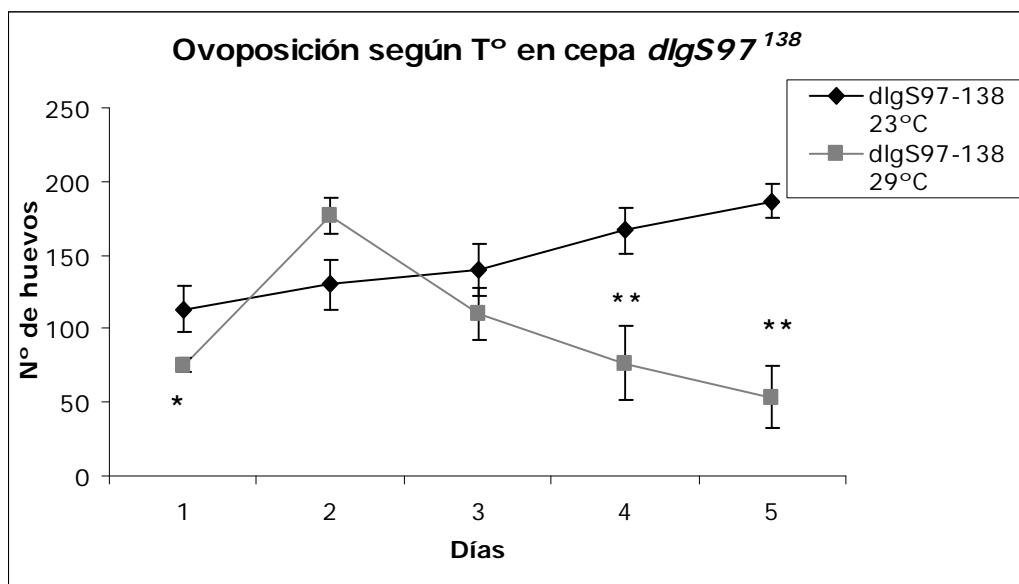


Gráfico 8: Ovoposición, según T° en cepa $dlgS97^{138}$, se observa una disminución significativa en la ovoposición al 4 y 5^{to} día en individuos sometidos a 29°C (*= $p<0.01$, **= $p<0.001$ y ***= $p<0.0001$). La cima de postura a 29°C se alcanzó al 2^{do} día de ensayo.

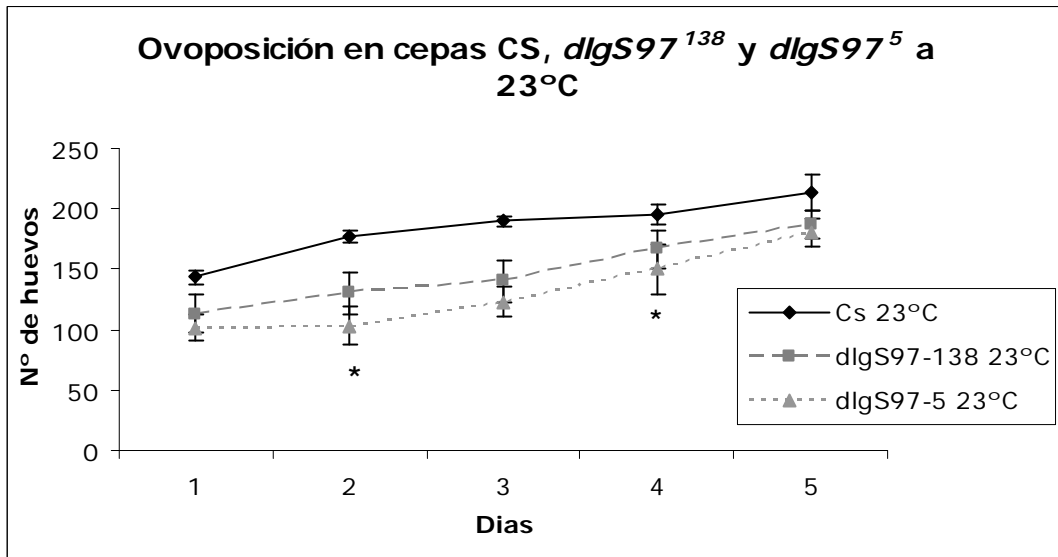


Gráfico 9: Ovoposición, comparativa entre cepas CS, *dlgS97*⁵ y *dlgS97*¹³⁸ a 23°C, donde la cima de postura para todas las cepas se alcanza al 5^{to} día, y aunque las mutantes *dlg* presentan una leve disminución en la capacidad de postura, esta no es importante estadísticamente, salvo en el caso de *dlgS97*⁵. (*= $p < 0.01$).

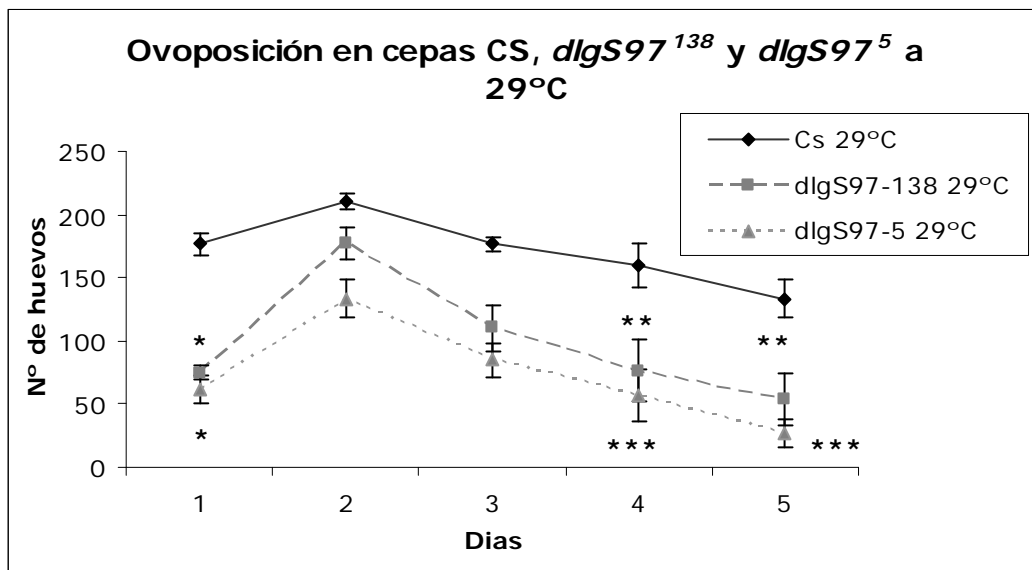


Gráfico 10: Ovoposición comparativa entre cepas CS, *dlgS97*⁵ y *dlgS97*¹³⁸ a 29°C, se observó que las mutantes nulas *DlgS97*, presentan la cima de postura el 2^{do} día, para luego disminuir hasta en un 70% al 5^{to} día, siendo más marcada en el caso de la cepa *dlgS97*⁵, en comparación con la cepa seudonativa. (*= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$).

3.2.2 Curvas de pupación según T° para cepas control y mutantes *dlgS97*.

Cinco días después de que se pusieron los huevos, se determinó el porcentaje de ellos que se convirtieron en pupas. La pupación a 23°C se observa un patrón de distribución similar entre las cepas mutantes y seudonativa, el porcentaje de pupación es parejo para los huevos puestos en los distintos días y es cercano al 100%, en cambio, cuando los individuos fueron mantenidos a 29°C, el porcentaje entre los distintos días de postura varió más y alcanzó sólo un 80%. ($n = 200$ huevos por cepa, $p < 0.0001$).

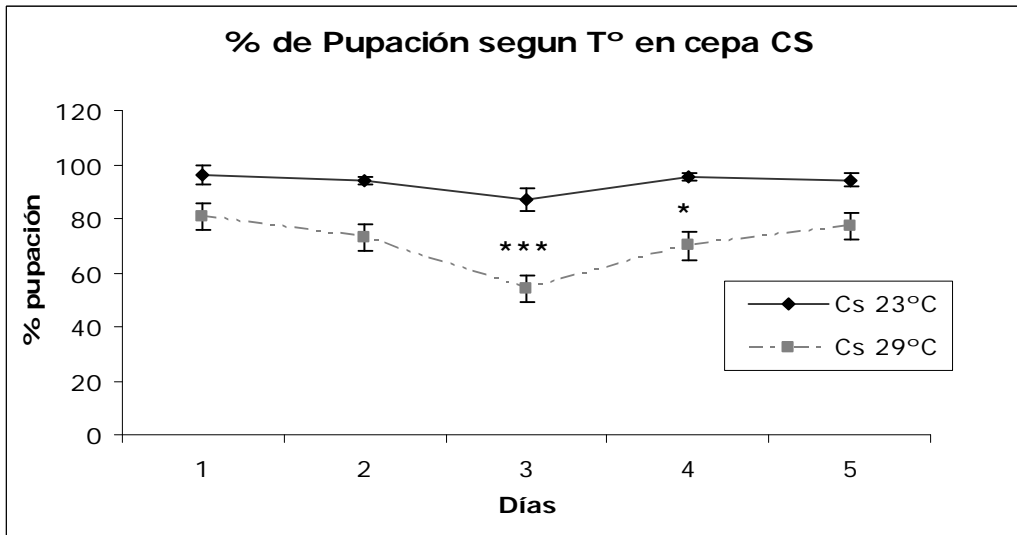


Gráfico 11: Porcentaje de pupación según T° en cepa CS. En la cepa control la pupación en cualquiera de los días de postura es cercana al 100% a 23°C, en cambio a 29°C este porcentaje baja a valores cercanos al 80% siendo significativa la diferencia sólo los días 3 y 4 (*= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.0001$).

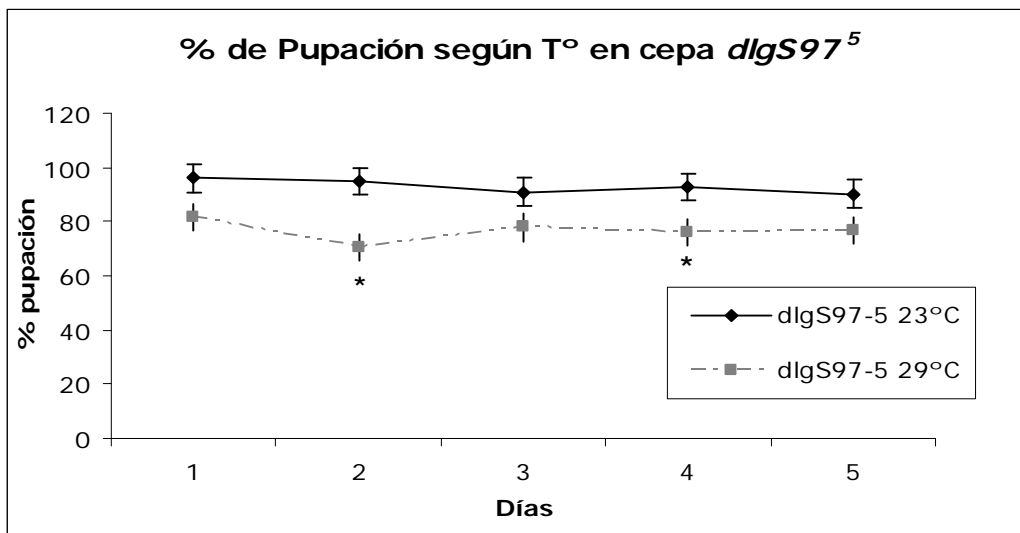


Gráfico 12: Porcentaje de pupación según T° en cepa *dlgS97*⁵, se observó que, al igual que en la cepa control, el índice de pupación en cualquiera de los días de postura es cercano al 100% a 23°C, mientras que a 29°C baja al 80% siendo significativa la diferencia el día 2 y 4 (*= $p < 0.01$)

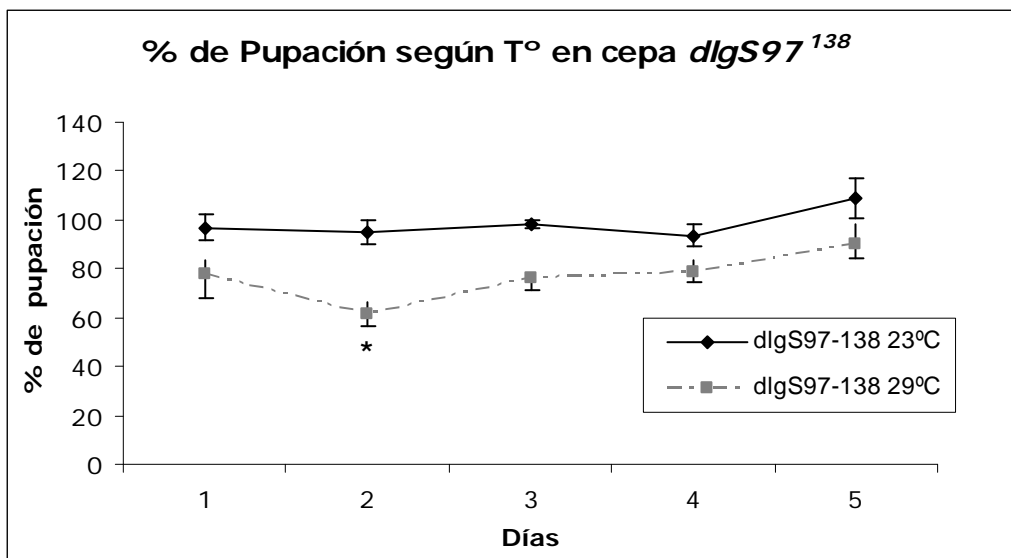


Gráfico 13: Porcentaje de pupación según T° en cepa *dlgS97*¹³⁸, se observó que, al igual que en la cepa control y la cepa *dlgS97*⁵, el índice de pupación en cualquiera de los días de postura es cercano al 100% a 23°C, mientras que a 29°C baja al 80% siendo significativa la diferencia sólo el día 2 (*= $p < 0.01$).

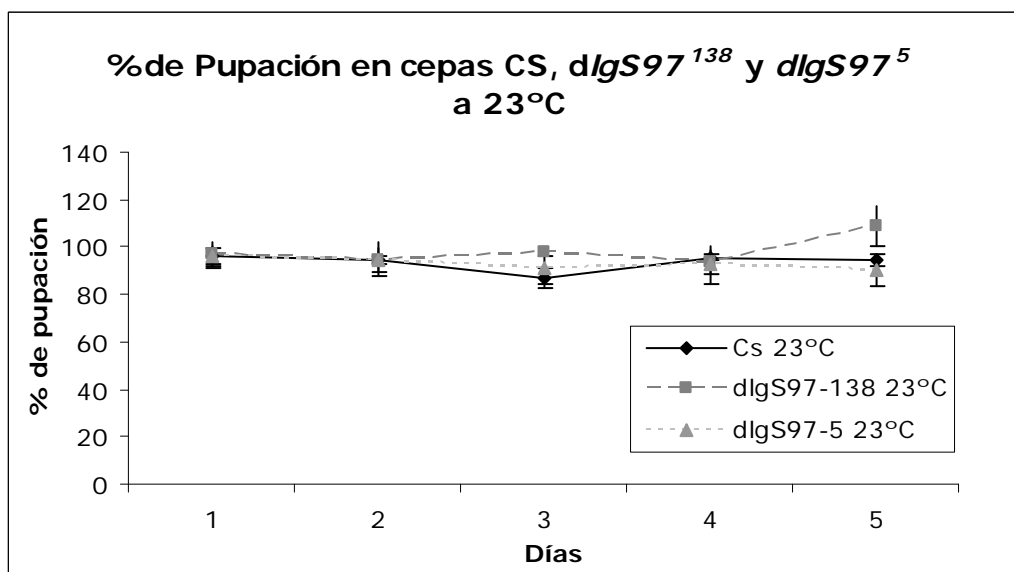


Gráfico 14: Pupación comparativa a 23°C en cepas CS, y mutantes *dlgS97* todas las cepas alcanzan porcentajes de pupación cercanos al 100% durante todos los días de postura y no se observaron diferencias significativas entre cepas durante esta etapa del desarrollo. ($p < 0.01$).

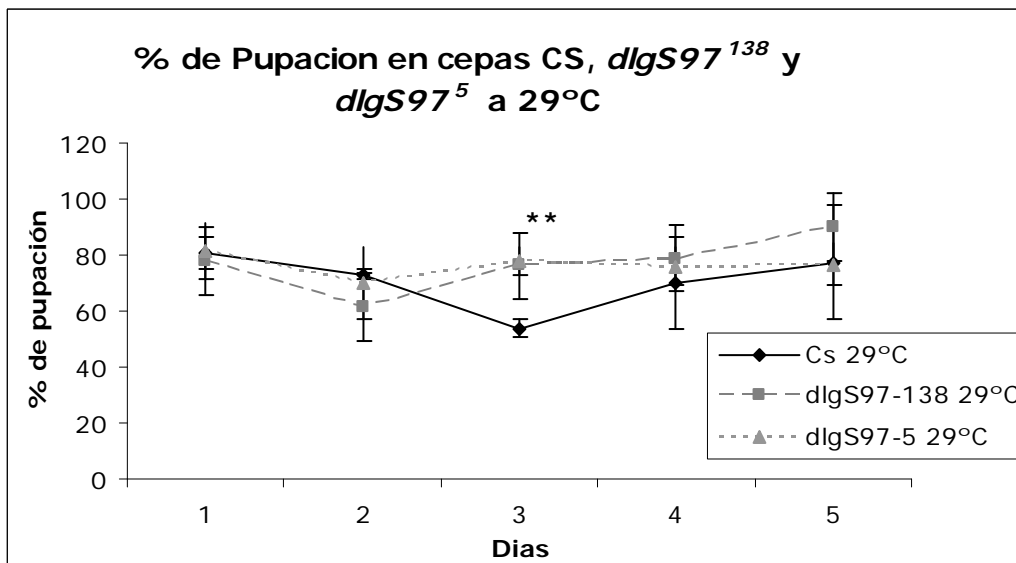


Gráfico 15: Pupación comparativa a 29°C en cepas CS, y mutantes *dlgS97*. Se observó que al aumentar la T°, tanto la cepa control como las cepas mutantes bajan a valores cercanos al 80% de pupación. La disminución en las cepas mutantes es marcadamente significativa al comparar el tercer día de postura. (**= $p<0.001$)

3.2.3 Curvas de eclosión según T° para cepas control y mutantes *dlgS97*.

Ocho a catorce días después de que los huevos se pusieron se determinó el porcentaje de moscas eclosionadas. Para la eclosión, se observó un patrón general donde a 23° las primeras eclosiones en las tres cepas, ocurren desde el décimo día de desarrollo y el 100% de los individuos ha eclosionado al día 14 de desarrollo. A 29°C, en cambio las primeras eclosiones ocurren desde el octavo día de desarrollo y se han completado al décimo tercer día. ($n=100$ pupas diarias para cada cepa, $p<0.0001$).

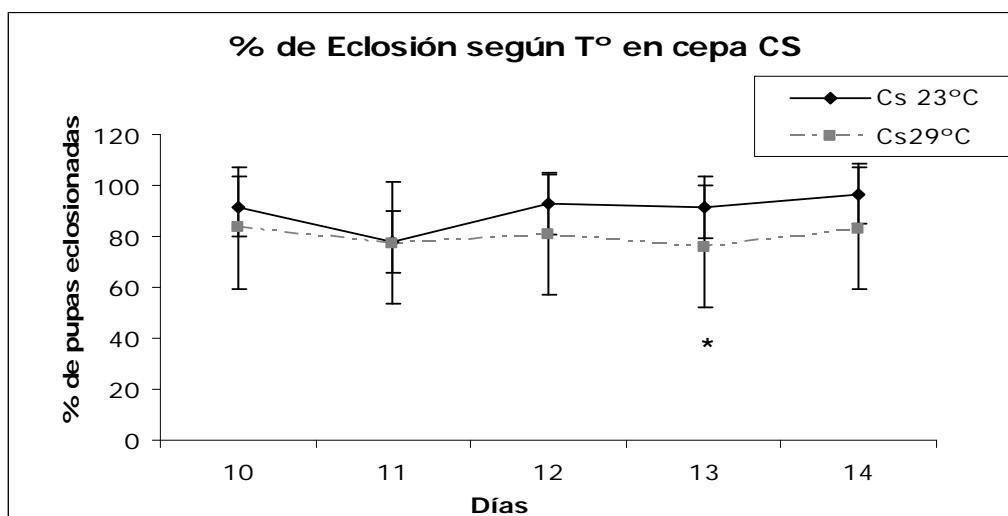


Gráfico 16: Porcentaje de eclosión según T° en cepa control CS, se observa que cerca del 100% de los individuos eclosiona cada día desde el día 10 al 14 de eclosión al igual que a 29°C, siendo sólo significativamente menor el día 13. (*= $p<0.01$).

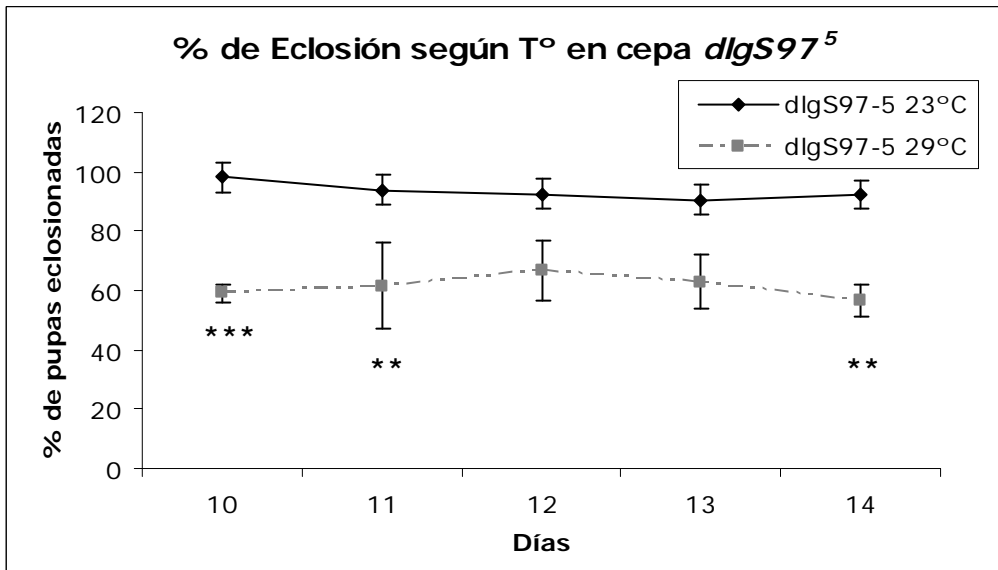


Gráfico 17: % de eclosión según T° en cepa dIgS97⁵, a 23°C se observa un patrón de eclosión similar a la cepa control, sin embargo a 29°C, el porcentaje de eclosión diaria baja desde el primer día de registro a valores cercanos al 60% (**=p<0.001, ***=p<0.0001).

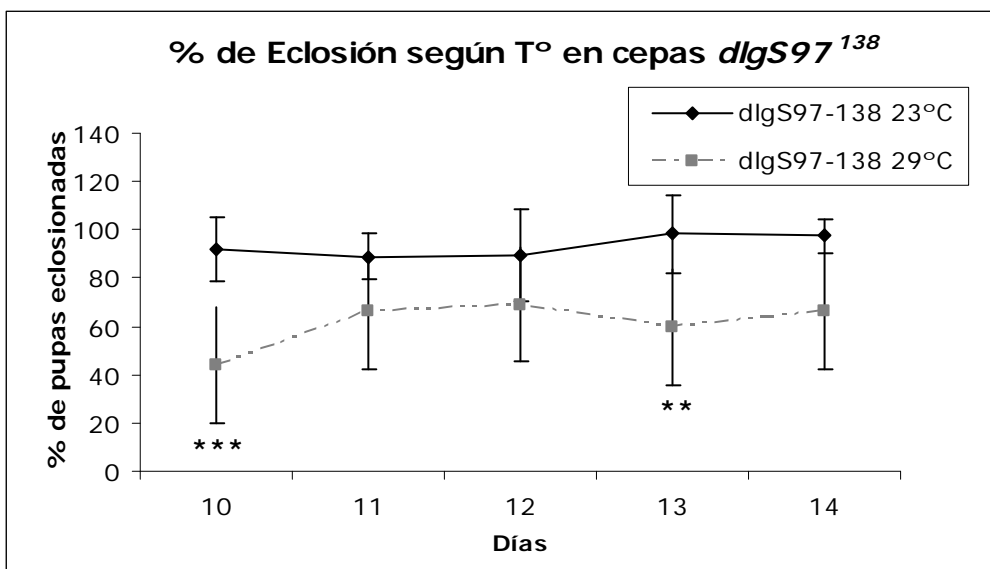


Gráfico 18: Porcentaje de eclosión según T° en cepa dIgS97¹³⁸ según T°, a 23°C se observa un patrón de eclosión similar a la cepa control, sin embargo a 29°C, el porcentaje de eclosiones diaria baja desde el primer día inclusive hasta un 40 % (**=p<0.001 y ***=p<0.0001).

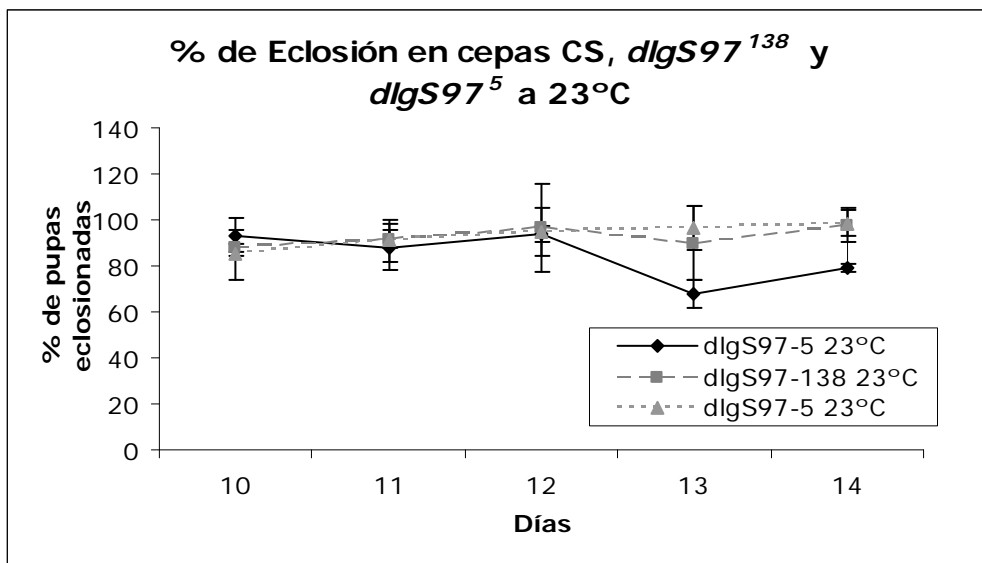


Gráfico 19: Eclosión comparativa 23°C, en cepas control y mutantes *DlgS97*. Donde en todas las cepas se alcanza el 100% de eclosión sin diferencias significativas. ($p < 0.01$)

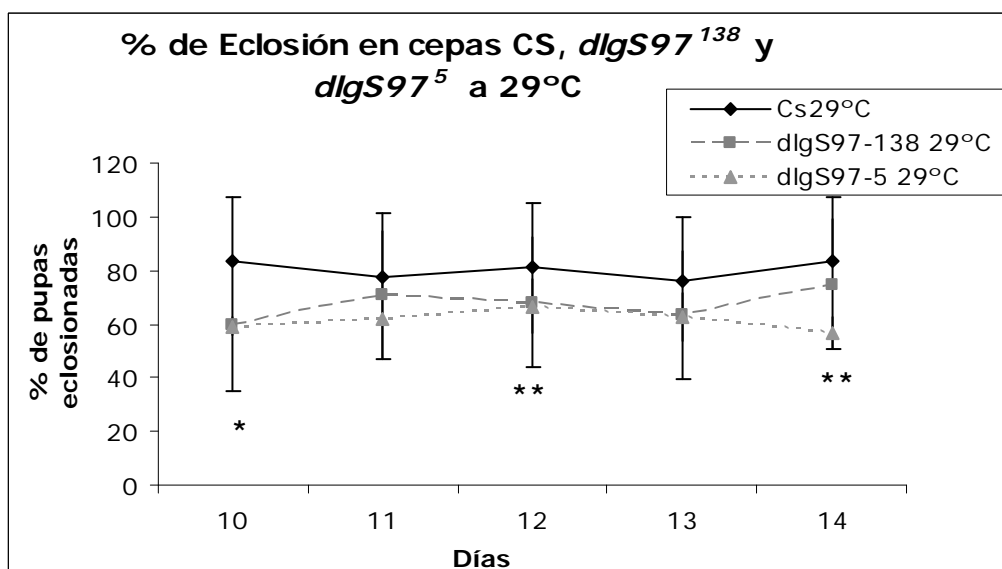


Gráfico 20: Eclosión comparativa 29°C, en cepas control y mutantes *DlgS97*. En cepa seudonativa se alcanzan porcentajes de eclosión diaria cercanos al 80%, en cepas mutantes la eclosión disminuye entre un 15 y 20% con respecto a la cepa control (*= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$).

3.3 Determinación de patrón de locomoción en adultos a 23° y 29°C

Para los ensayos de locomoción tanto para larvas como para adultos de las mismas cepas, a 23° no se observaron diferencias en la capacidad locomotora, no así a 29° donde se observó un claro detrimento de la capacidad locomotora de los individuos mutantes, con respecto a CS, y que se correlaciona con un menor aumento de botones sinápticos observados en ensayos de inmunohistoquímica realizados en larvas ambientadas a 29°C durante 2 a 3 horas. ($n = 40$ adultos 3 a 5 días de vida)

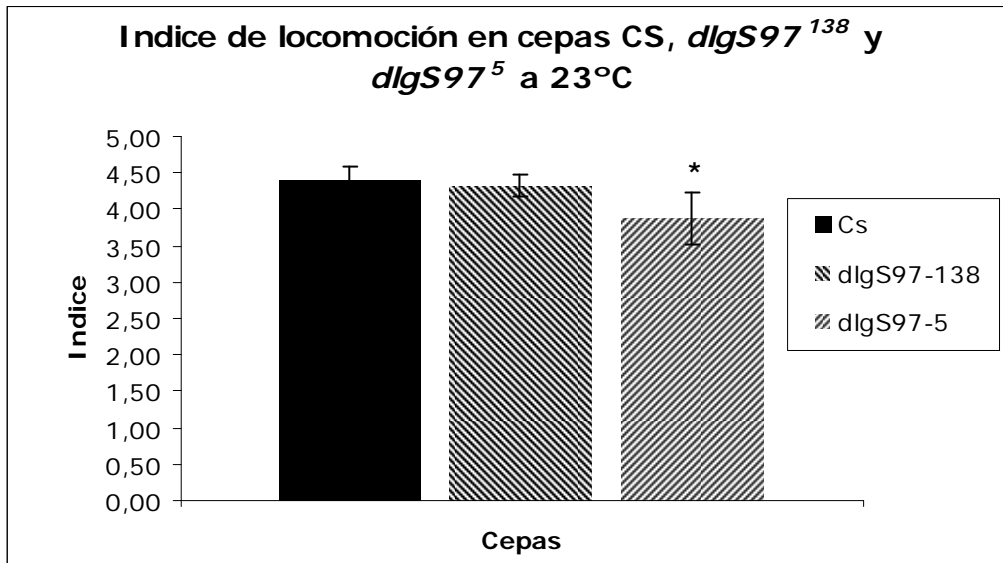


Gráfico 21: Índice de locomoción en adultos de cepas control, y mutantes *DlgS97*; ambientadas a 23°C. *dlgS97*¹³⁸ es estadísticamente similar a CS, sin embargo *dlgS97*⁵ presenta una pérdida de su capacidad locomotora (*= $p < 0.01$)

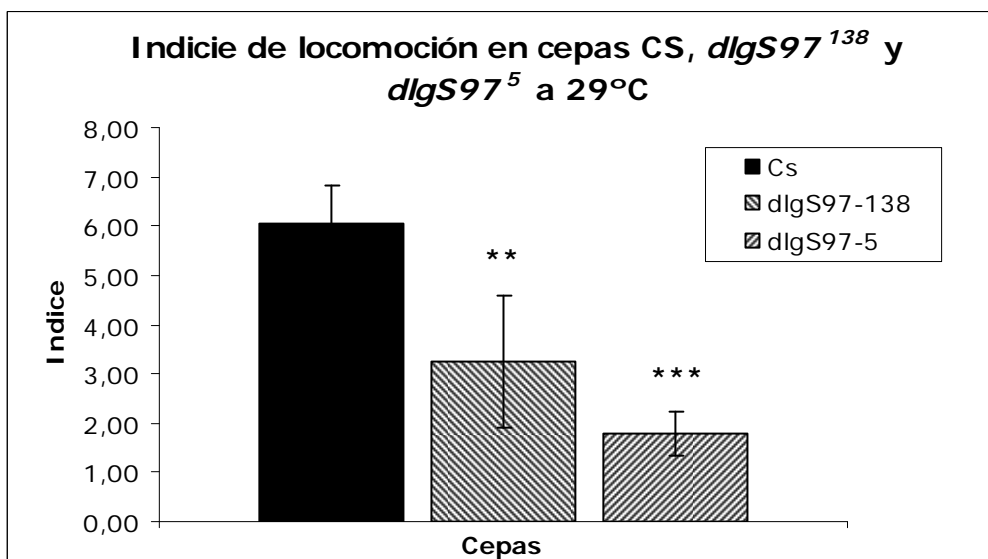


Gráfico 22: Índice de locomoción en adultos de cepas control, y mutantes *DlgS97* ambientadas a 29°C. *dlgS97*¹³⁸ y *dlgS97*⁵ presentan una pérdida significativa de su capacidad locomotora, respecto de la cepa control (**= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$).

En los ensayos de locomoción realizados en las cepas recombinadas para pérdida de función, (corroborada mediante WB) se observó que a 23°C, para todos los ensayos las cepas mutantes se comportan de manera similar a CS, y que al ser sometidas a los mismos test a 29°C de temperatura, presentan una disminución marcada y significativa de la capacidad locomotora.

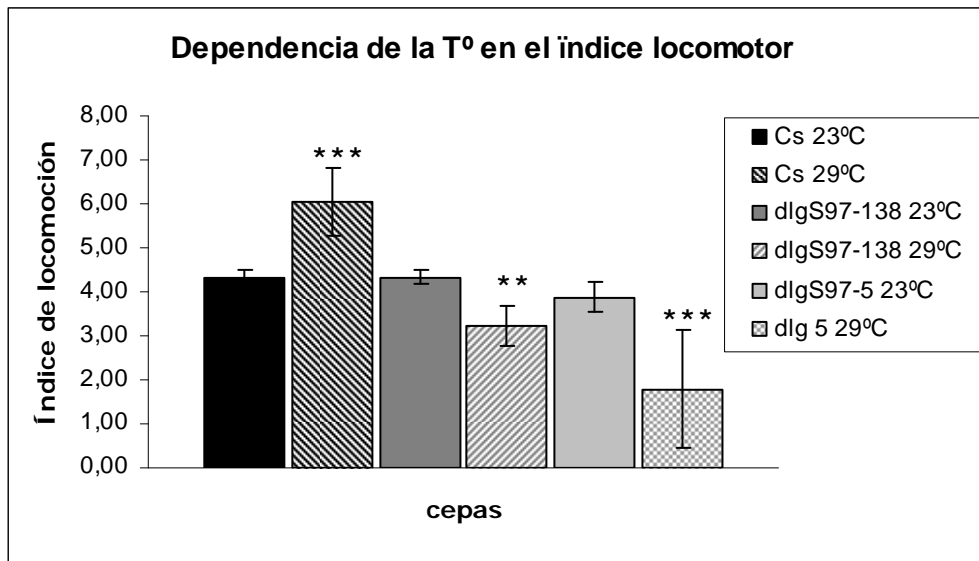
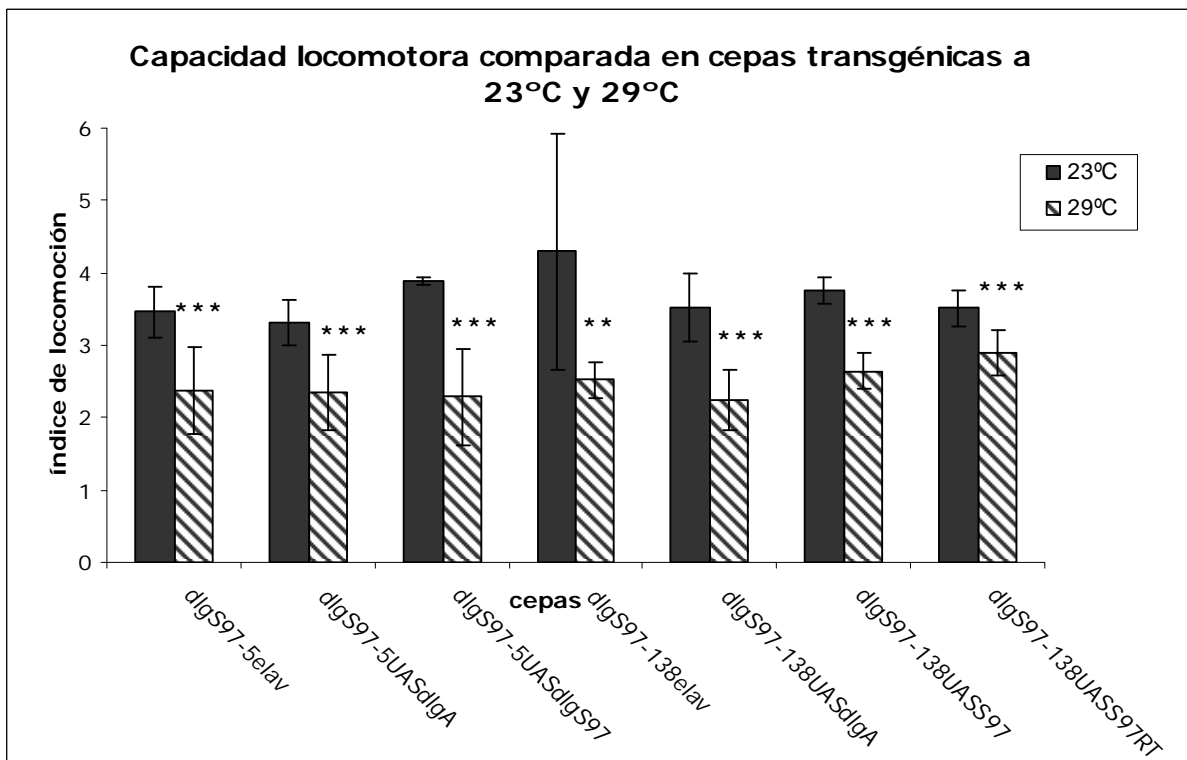


Gráfico 23: Dependencia de la T° en el índice locomotor Al aumentar la temperatura el índice locomotor en la cepa control aumenta significativamente, sin embargo, bajo las mismas condiciones las cepas mutantes empeoran su capacidad locomotora (**= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$)

3.3.1 Determinación de capacidad locomotora en cepas controles transgénicas con pérdida de expresión de la proteína sináptica Dlg S97.

Gráfico 24: Capacidad locomotora en cepas mutantes DlgS97 y transgénicas a 23° y a 29°C. Aunque



se observaron diferencias en el índice locomotor en las distintas cepas transgénicas, en todas ellas se vio una

pérdida de función estadísticamente significativa al ser sometidas a estrés térmico agudo. (**= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$).

3.3.2 Determinación de rescate de la capacidad locomotora en adultos de cepas transgénicas por recuperación de la expresión de Dlg S97, mediante cruzas selectivas con el conductor neuronal *elav*, y el conductor muscular *C57*.

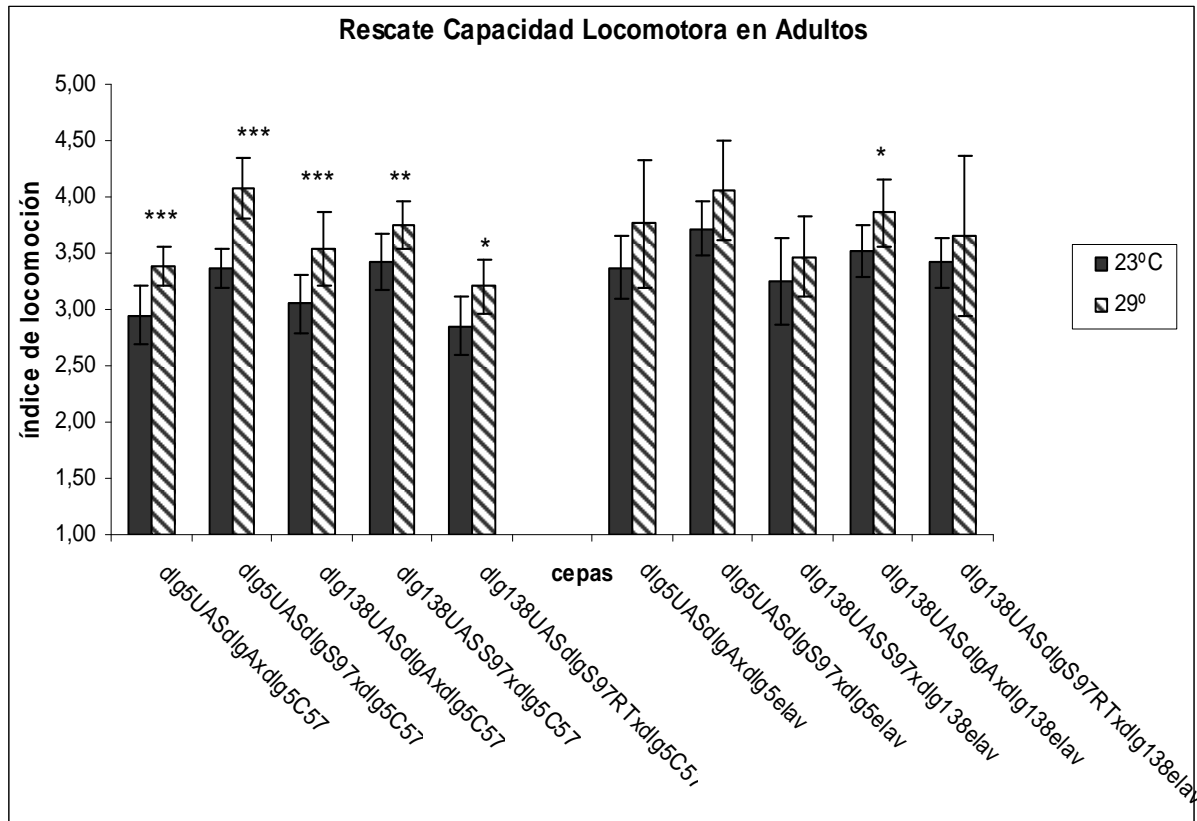


Gráfico 25: Rescate de la capacidad locomotora en adultos, mediante la sobreexpresión de *dlgS97*.

Se observó un rescate real de la capacidad locomotora a 29°C en adultos en todas las cruzas realizadas con el driver muscular *C57*, en tanto que las cruzas con el drive neuronal *elav*, se observó que en general las cepas logran un rendimiento similar al que se observa a 23°C, siendo significativo sólo en la craza de la cepa *dlgS97¹³⁸UASS97xlgS97¹³⁸elav*. (*= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$).

3.4 Determinación de Capacidad Olfatoria en Adultos

3.4.1 Determinación de capacidad olfatoria en cepas cantones y mutantes *dlgS97* a 23°C y 29°C.

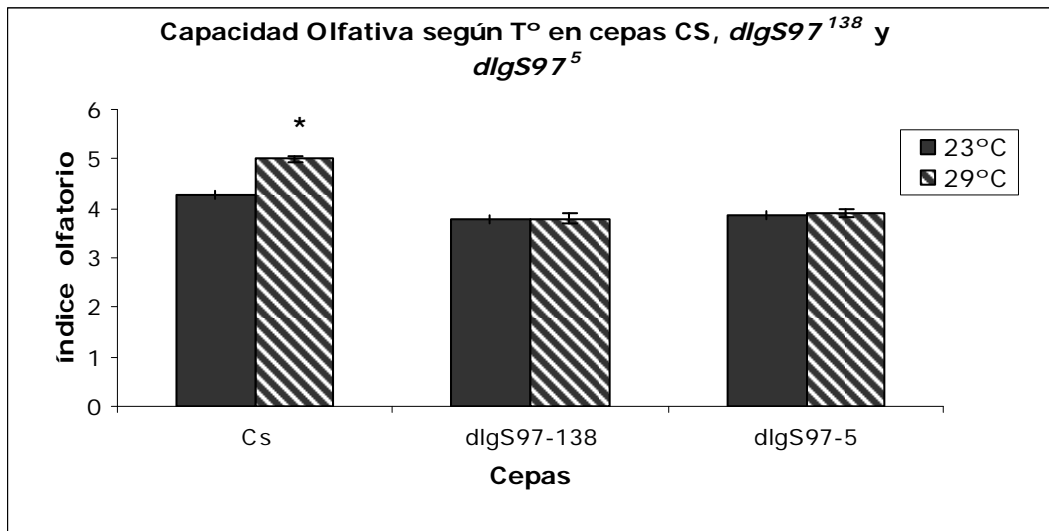


Gráfico 26: Capacidad olfatoria según T° en cepas CS y mutantes *dlgS97*. En adultos jóvenes de *Drosophila*, de cepas CS, *dlgS97*¹³⁸ y *dlgS97*⁵ ambientadas a 23°C se vio un comportamiento equivalente a temperatura ambiente, pero al aumentar la T° las cepas control mejora su rendimiento significativamente, en tanto que individuos mutantes no son capaces de mejorar. (*= $p < 0.01$).

3.4.2 Determinación de capacidad olfativa en cepas controles transgénicas con pérdida de expresión de la proteína sináptica *Dlg S97*.

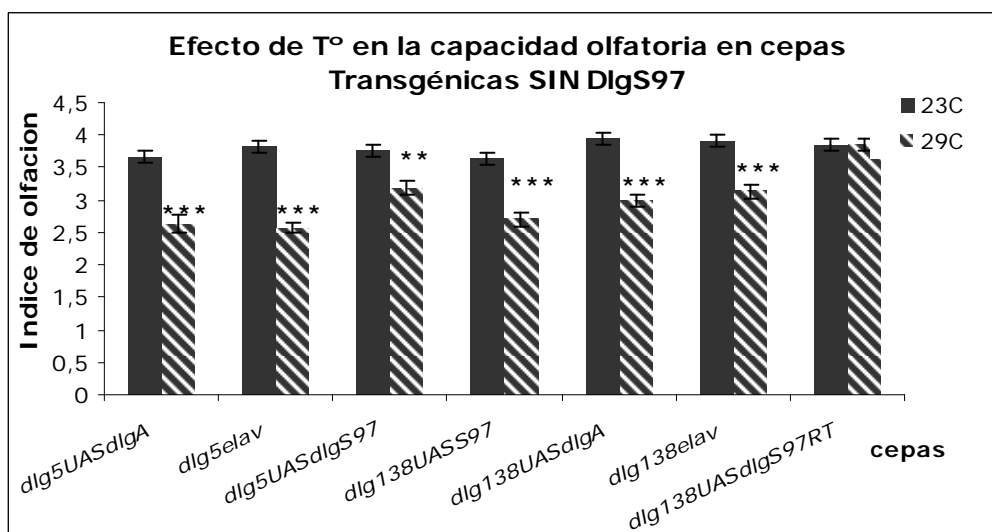


Gráfico 27: Efecto de T° en la capacidad olfatoria en cepas sin expresión de *DLGS97*. En los ensayos realizados en individuos adultos de cepas transgénicas *dlgS97* nulas a 23°C, no se revelaron diferencias con

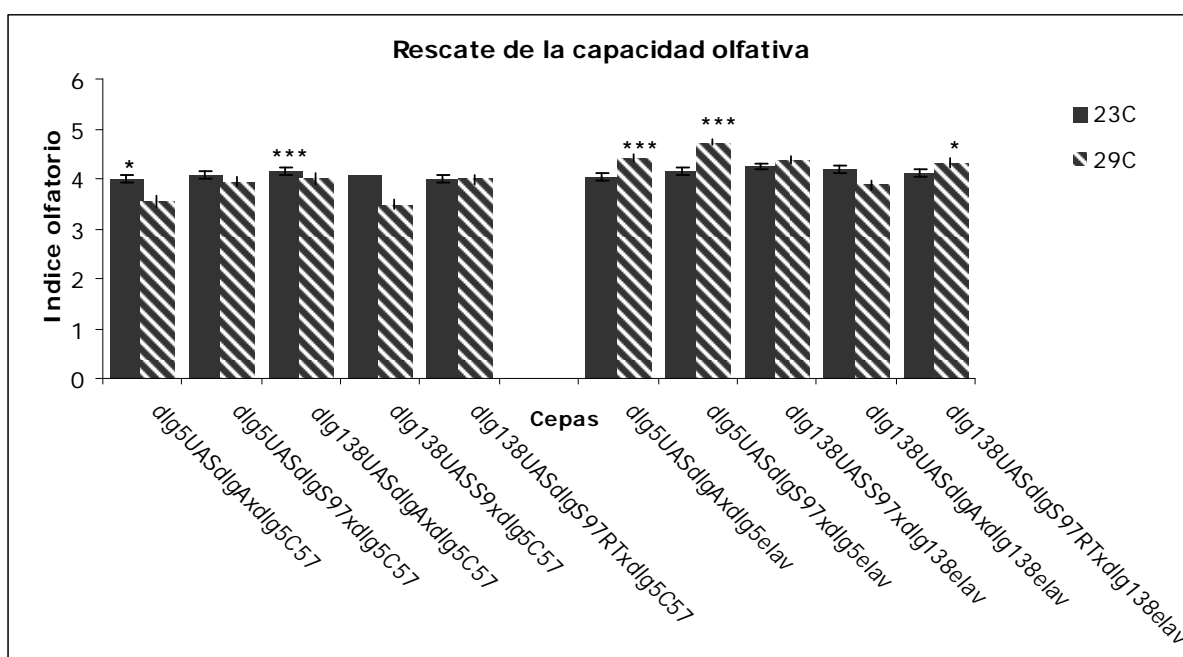
respecto a la cepa CS, pero sí se evidenció una pérdida significativa en la capacidad olfativa cuando se les somete al mismo ensayo a 29°C de temperatura (**= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$).

3.4.3 Determinación de rescate de la capacidad olfatoria en cepas transgénicas por recuperación de la expresión de Dlg S97.

En los ensayos realizados en las cepas rescate se observó, que en el caso del ensayo de recuperación de la capacidad olfativa, en el rescate mediante la cruce con la cepa *dlgS97⁵;Gal4-C57*, al realizar el ensayo a 29°C no hubo mejoría significativa, esto debido a que Gal4-C57 corresponde a un conductor netamente muscular, en cambio, con el rescate mediante el conductor UAS-Elav, cuya naturaleza es neuronal la mejoría de la capacidad olfativa, fue significativa.

En las cruza con ambos conductores, la cruce de *dlgS97¹³⁸UAS-DlgS97*, con Gal4-C57, presentan una leve tendencia a la mejora aunque no es estadísticamente significativa, las cruza de *dlgA* con Gal4-C57, no presentan mejora alguna, pero cuando son cruzadas con UAS-Elav, la respuesta mejora significativamente, igual cosa sucede en cruce la UAS-Elav con *dlg⁵dlgS97*, en tanto *dlgS97¹³⁸dlgUAS-DlgS97Rt*, no presentó diferencia alguna, con ninguno de los conductores en comparación a la misma cepa antes del rescate.

Gráfico 28: Rescate de la capacidad Olfativa mediante sobreexpresion de DlgS97, ensayo de capacidad olfativa en cepas transgénicas con sobreexpresión de la proteína sináptica DlgS97, donde se observo un rescate real en cepas cruzadas con el driver neuronal UAS-Elav, cosa que no ocurre en cepas cruzadas con el conductor muscular Gal 4-C57. (*= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$)



3.5 Determinación de índice locomotor y capacidad olfatoria en larvas de segundo estadio de *Drosophila melanogaster*, cepas cantones, y mutantes *dlg*, utilizadas como controles, a 23°C y 29°C y rescate de la capacidad locomotora en cepas transgénicas con sobreexpresión de la proteína sináptica *Dlg* S97.

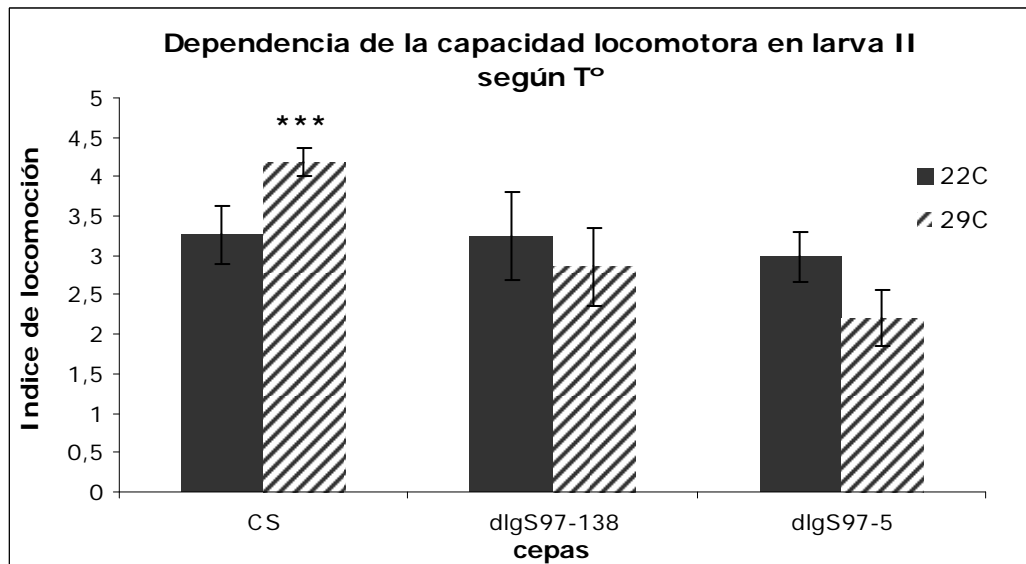


Gráfico 29: Dependencia de la capacidad locomotora en larva II según T°. En el ensayo realizado a 23°C comparando mutantes nulas de *DlgS97* con la cepa CS, se observó un patrón locomotor similar entre cepas, pero al someter a las larvas al mismo ensayo a 29°C se presenta una clara disminución en la capacidad locomotora de los individuos mutantes, en comparación a CS que mejora su rendimiento, al ser sometido a estrés térmico agudo. (***)= $p < 0.0001$)

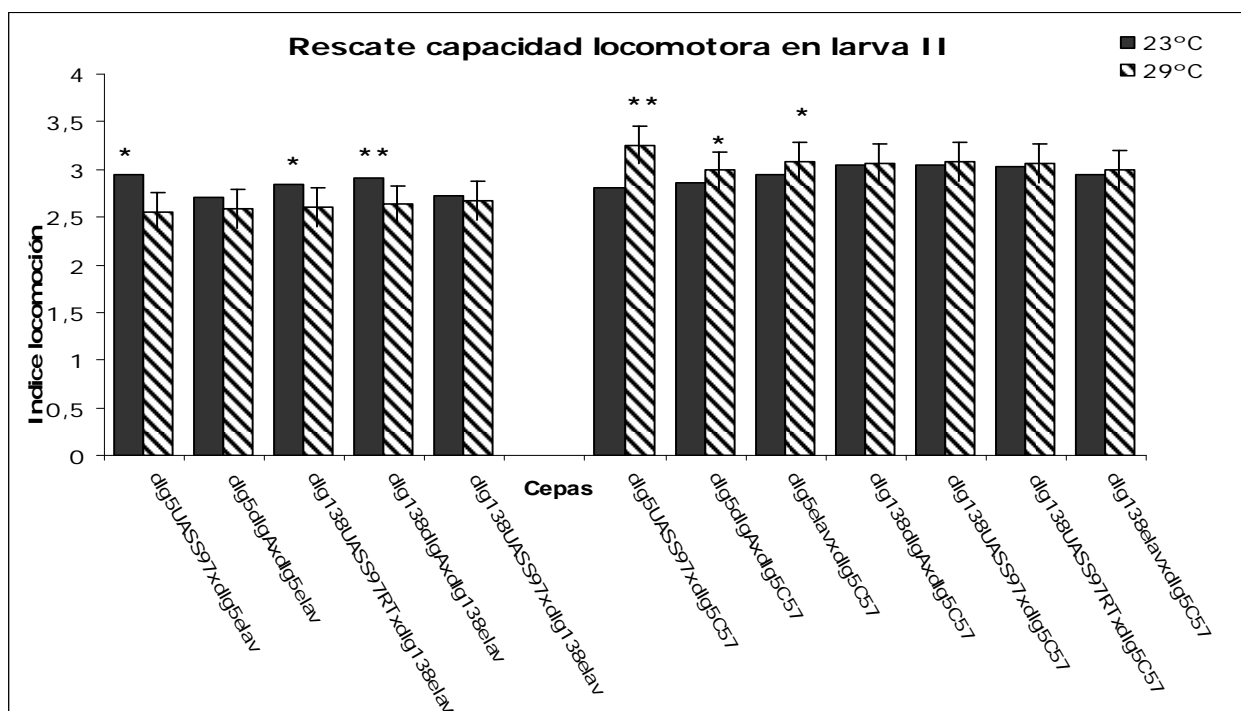


Gráfico 30: Rescate de la capacidad locomotora en larva II provenientes de las diversa cruzas realizadas con el fin de rescatar la expresión de *dlgS97*, se pudo observar que en las cruzas con el conductor neuronal UAS-Elav, no se obtuvo ninguna respuesta ya que la pérdida de la función locomotora seguía siendo significativa, en tanto que en cruzas con el conductor muscular Gal4-C57, se obtuvo una respuesta similar tanto a 23° como 29°C, e inclusive una mejora en la función en las cruzas *dlgS97⁵;UASdlgS97 x dlgS97⁵;Gal4-C57*, *dlgS97⁵; dlgA x dlgS97⁵;Gal4-C57* y *dlg⁵elav x dlgS97⁵;Gal4-C57* lo que demuestra que es posible rescatar la expresión de *dlg* en la sinápsis neuromuscular de la larva.

3.6 Determinación de índice de fotofobia en larvas de segundo estadio de *Drosophila melanogaster*.

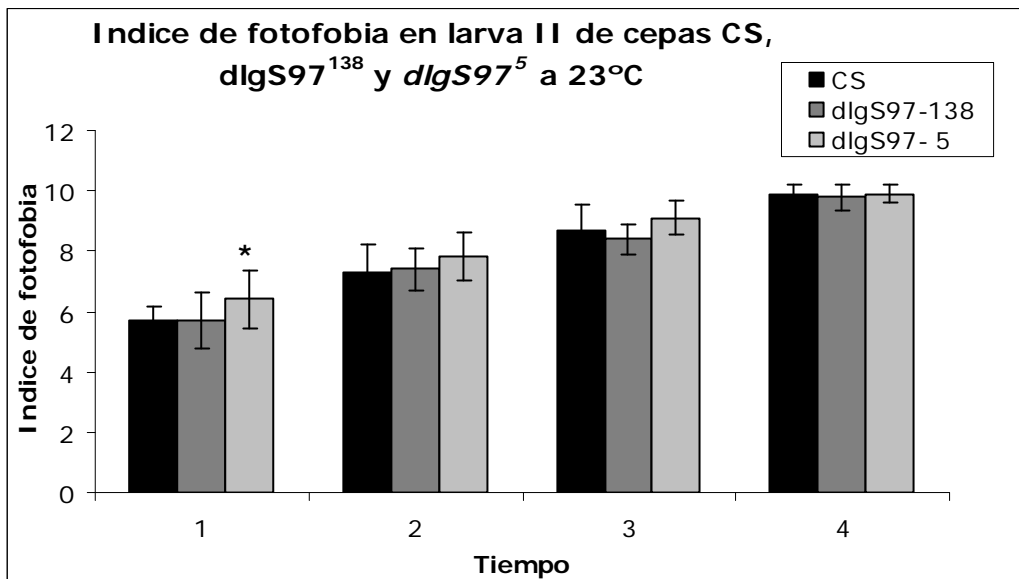


Gráfico 31: Índice de Fotofobia en larva II en cepas CS y mutantes *dlgS97* a 23°C. A esta T° todas las cepas tienen un comportamiento de huida similar, salvo la cepa *dlgS97⁵*, que desde el primer minuto se mueve mas lentamente. (*= p<0.05)

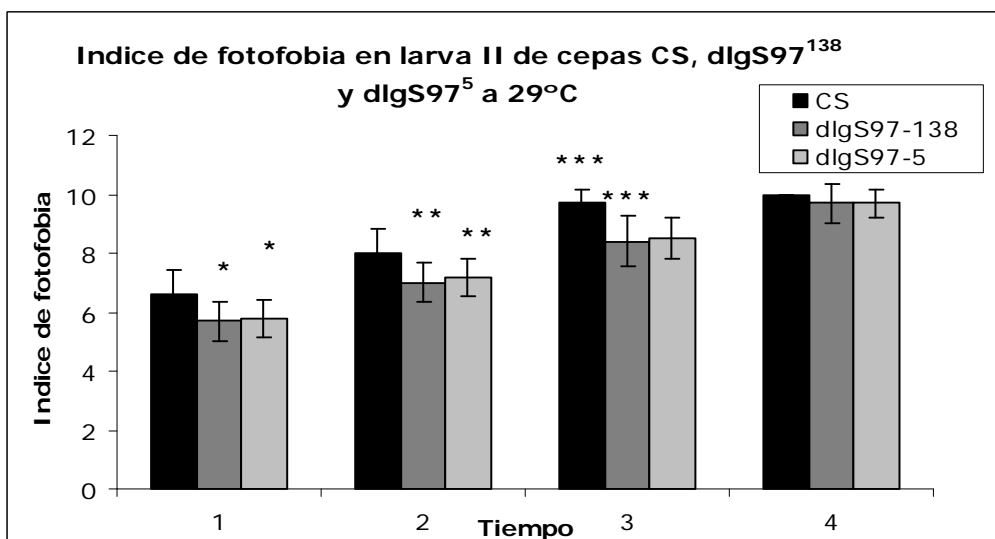


Gráfico 32: Índice de Fotofobia en larva II en cepas CS y mutantes *dlgS97* a 29°C. Al aumentar la T°, se observó un aumento en la velocidad de huida del estímulo lumínico, en la cepa control, cuya velocidad es mayor en los primeros minutos, y no así en larvas de mutantes *dlgS97*, que más bien empeoraron su rendimiento significativamente ($p < 0.01$)

3.7 Conteo de botones Sinápticos mediante IHQ.

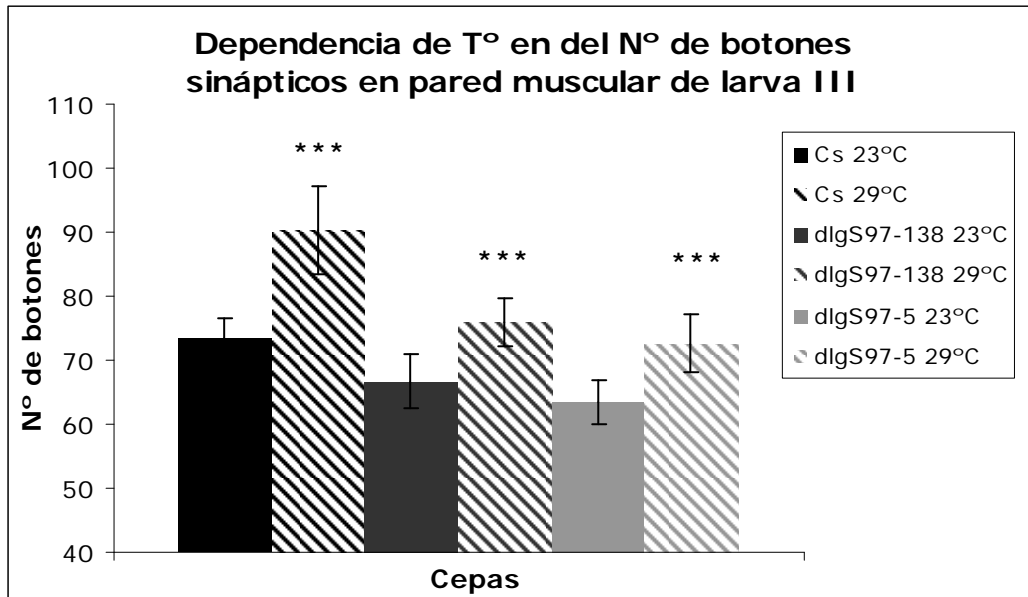


Gráfico 33: Dependencia de T° en el N° de botones sinápticos en larva III. El aumento de la T°, se traduce en el aumento de botones sinápticos, sin embargo, en las cepas mutantes, este aumento es significativamente menor. ($p < 0.001$)

3.8. Determinación de la pérdida de expresión de diversas isoformas de la proteína sináptica *Disc-large*, en cepas recombinadas, mediante 8 cruza consecutivas con mutantes nulas para *DlgS97*.

Para confirmar que las cepas recombinadas siguen siendo mutantes de *dlgS97* se realizó un Western-Blot y se detectó la presencia de *dlgS97*.

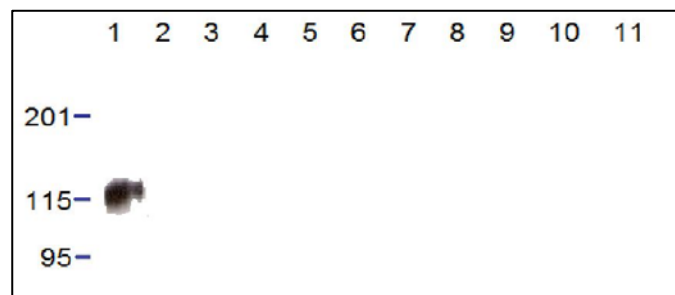


Figura 5: WB, Anticuerpo primario: Sn97 1/500, Anticuerpo secundario: Jacson Rabbit 1/5000

1- W1118, cepa silvestre

2- *dlgS97*¹³⁸

- | | |
|--|--|
| 3- <i>dlgS97⁵</i> | 8- <i>dlgS97⁵;UAS dlgA x dlgS97⁵</i> |
| 4- <i>dlgS97¹³⁸;UAS dlg S97 RT</i> | 9- <i>dlgS97¹³⁸;UAS dlgA x dlgS97¹³⁸</i> |
| 5- <i>dlgS97¹³⁸;UAS dlg S97 RT x dlgS97¹³⁸</i> | 10- <i>dlgS97⁵,Gal 4-elav x dlgS97⁵</i> |
| 6- <i>dlgS97¹³⁸;UAS dlg S97 x dlgS97¹³⁸</i> | 11- <i>dlgS97⁵;UAS dlgS97 x dlgS97⁵</i> |
| 7- <i>dlgS97¹³⁸;Gal 4-elav x dlgS97¹³⁸</i> | |

4. Discusión

La proteína Dlg es un factor de expresión neuronal y epitelial necesario para el desarrollo y la funcionalidad sináptica. La variante de *splicing* DLGS97 es de expresión exclusiva de esta variante en tejidos excitables (neuronas y músculo). Cepas de moscas mutantes que carecen totalmente de la expresión son capaces de llegar a la adultez con muy pocos defectos en la viabilidad, comportamiento y fecundidad. En este estudio, se evaluaron los efectos de un estrés térmico en parámetros de sobrevivencia, fecundidad, actividad locomotora y olfato en cepas mutantes para DLGS97 de *D. melanogaster*. El objetivo de este estudio fue determinar si los defectos sinápticos que de otra manera a temperatura ambiente no se evidencian, se pueden presentar frente a un estrés térmico, de forma de evaluar cuán necesaria es la presencia de esta proteína para el normal funcionamiento de la sinapsis.

Cepas de *D. melanogaster* pseudonativas, mantenidas a altas temperaturas como 29°C por un periodo prolongado de tiempo, cumplen su ciclo de vida en menor tiempo y son más pequeñas en comparación a aquellas cepas mantenidas a temperaturas más bajas y por otra parte, la exposición a 29°C no altera la fecundidad de la progenie ni la viabilidad relativa de las moscas control. Como era de esperar, el aumento de la temperatura ambiente tuvo un fuerte efecto sobre la tasa de sobrevivencia en cepas mutantes nulas para la proteína sináptica *DlgS97*. Aunque DLGS97, no es necesaria para conductas básicas, si es requerido para conductas más complejas, tales como, fototáctismo, cortejo, y ritmos circadianos, (Mendoza-Topaz *et al.*,2008). Estos defectos podrían estar cumpliendo un papel en la menor longevidad. Sin embargo la menor capacidad locomotora detectada a 29°C podría contribuir a disminuir la longevidad, ya que, las moscas con baja capacidad locomotora tienen más problemas para mantenerse alejadas del sustrato y mayor probabilidad de quedar atrapadas por las alas en la comida. No podemos descartar una frecuencia de muerte mayor por un aumento de la tasa de infección o neurodegeneración acelerada, dos parámetros que no se midieron.

Las variaciones de temperatura también afectan la fecundidad, los efectos más importantes se vieron en la capacidad de poner huevos, más que en las tasas de pupación o eclosión. Esto se correlaciona con datos previos del laboratorio, que muestran una importante expresión de DLGS97 en el ovario de las hembras ponedoras. Sabemos que DLGS97 es necesaria para una correcta expresión de la conducta de cortejo, sin embargo a 23°C la fecundidad medida como el total de huevos puestos en 5 días no disminuyó significativamente (total de huevos a 23°C :CS =918 ±57; *dlgS97¹³⁸* =736±38;

$dlgS97^5=658\pm 8$, $p<0,05$ Cs vs $dlgS97^5$ no significativo Cs vs $dlgS97^{138}$). Por el contrario la fecundidad a 29°C no fue diferente para la cepa control pero disminuyó significativamente en las cepas mutantes (total de huevos a 29°C: CS = 856 ± 89 ; $dlgS97^{138} = 491 \pm 58$, $p < 0,05$; $dlgS97^5 = 363 \pm 38$, $p < 0,01$) en los ensayos realizados a 29°C se observó que la fecundidad total disminuyó.

La habilidad de adaptarse a los cambios, es esencial para la supervivencia de un organismo. La adaptación del organismo en respuesta al estrés circundante, tiene la ventaja de permitir cambios rápidos en el SNC seguidos por una rápida restauración de la homeostasis. Estos experimentos demuestran que la falta de DLGS97 afecta los mecanismos de adaptación a mediano y largo plazo.

La expresión de DLGA en SNC se observa tempranamente en el desarrollo embrionario en tanto que transcritos de DLGS97, se observan desde etapas embrionarias más tardías (Albornoz *et al.*, 2008). En el desarrollo larval en *Drosophila*, existen dos etapas anteriores a la pupación; la etapa de alimentación se extiende desde larva de primer estadio hasta larva de tercer estadio, en la cual se mantienen alimentándose enterradas profundamente en el alimento, durante este tiempo la larva es fotofóbica y huyen activamente de la luz brillante, además durante esta etapa del desarrollo, DLGS97 se expresa en células fotorreceptoras. En la segunda etapa la larva se torna errante y trepa por el tubo de crecimiento y su repulsión a la luz decrece (Sawin-MacCormack *et al.*, 1995).

En tanto que el movimiento larval, se caracteriza por ondas peristálticas interrumpidas por periodos cortos de pausas e inflexiones (Suster *et al.*, 2003). Los estímulos lumínicos resultan en una conducta estereotipada, por un movimiento de búsqueda y una actividad natatoria de la cabeza, una reducción en la longitud de las ondas peristálticas y un aumento de las inflexiones (Hassan *et al.*, 2000).

Como ya se ha resaltado, aunque DLGA en general, se expresa en epitelio, músculo somático, y sistema nervioso (Woods & Bryant., 1991), DLGS97 es exclusivo de sistema nervioso y de UNM, (Mendoza *et al.*, 2003). En los ensayos, realizados en larva de segundo estadio de *Drosophila* a fin de pesquisar fotofobia, se observó un enlentecimiento en larvas de mutantes con respecto a la cepa sudonativa, cuando el ensayo era realizado a 29°C. Dicha “tardanza” puede ser atribuida a una posible pérdida de la sensibilidad frente al estímulo lumínico, o bien a una eventual pérdida de la función de fotorreceptores, asociada a la falta de DLGS97 o inclusive estar dada por una mayor rapidez en la adaptación al estímulo lumínico. Sin embargo, basado en los experimentos de locomoción en adultos que también presentan una disminución a 29°C, creemos que debe atribuirse a la pérdida de la función sináptica en la UNM a alta temperatura lo que afectaría la locomoción tanto en adultos como en larvas. Esto se correlaciona con que mutantes nulas de DLGS97, presentan anomalías estructurales y funcionales en la UNM de larva (Mendoza-Topaz *et al.*, 2008).

Como es sabido, el aprendizaje asociativo es crucial en los seres vivos, ya que les permite predecir importantes eventos, tales como, encontrar alimento, la presencia de predadores, patrones de conducta social y cambios en las condiciones medioambientales. El aprendizaje asociativo mediado por el sentido del olfato es poco conocido en larvas de *Drosophila*, y es por eso que en este estudio se uso la íntima relación que existe entre las proyecciones centrales del gusto y el olfato usando el supuesto de que es más fácil para la larva asociar estímulos a partir de estas dos modalidades.

La larva de *Drosophila* posee un sistema olfativo simple. Donde los componentes principales del sistema químiosensorial de la larva consisten en un órgano dorsal, el órgano terminal, el órgano ventral y una serie de papilas faríngeas (Stocker, 1994, Cobb, 1999). La expresión de DLGS97 también ha sido observada en los órganos dorsal y terminal que forman el complejo antenomaxilar y están involucrados en olfacción y el gusto respectivamente (Singh & Singh, 1984; Heimbeck *et al.*, 1999; Oppliger *et al.*, 2000). El órgano dorsal, que consiste en la antena larval y es el principal órgano olfatorio, contiene 21 neuronas receptoras de odorantes, mientras que el órgano terminal posee aproximadamente 80 neuronas gustativas (Tissot *et al.*, 1997; Heimbeck *et al.*, 1999; Python & Stocker, 2002). El órgano de “Bolwing”, es el ojo de la larva, y es el órgano sensible a la luz, está compuesto de dos grupos bilaterales de 12 células fotorreceptoras ubicadas en los ganchos bucales de la larva. El nervio óptico de la larva está formado por el axón fotorreceptor e inerva la porción del lóbulo óptico primordial en el cerebro (Green *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 1995).

En los ensayos de locomoción-olfación en larvas, no fue posible evidenciar que el movimiento se debe a la asociación olfativa, debido en parte a que existe una presumiblemente alta variabilidad inter-individual, en tanto que el sentido del gusto refuerza el aprendizaje ya que la evolución ha hecho que el estado larvario sea una etapa de alimentación, por tanto, en dichos ensayos donde se observó que larvas de individuos mutantes presentaban una pérdida de interés en el estímulo olfativo-gustativo (pasta de levadura) lo que podría estar dado tanto por la pérdida de la capacidad locomotora, asociada a los defectos presentes en la UNM de larvas nulas para DLGS97, observada mediante inmunohistoquímica como una menor cantidad de botones sinápticos en individuos sometidos a estrés térmico agudo en preparaciones de larvas de tercer estadio, asociada a la pérdida de expresión de la proteína sináptica *dlgS97*.

También la falta de respuesta asociativa puede relacionarse con una probable pérdida o perversión de la función olfativa-gustativa, asociadas a anomalías en la sinapsis glutamatergica, a causa de la falta de transcritos de *dlgS97* en células olfatoreceptoras, en las cepas ^(138 y 5). Al igual que en el ensayo frente a estímulos lumínicos, no fue posible determinar el grado de participación de las alteraciones en las funciones neuromuscular y olfativa-gustativa, aunque al correlacionar resultados

obtenidos en adultos, midiendo ambas características, se pudo ver que ambas se encuentran visiblemente alteradas en adultos mutantes nulos de *dlgS97*, sometidos a estrés térmico agudo.

La unión neuromuscular en músculos somáticos de *Drosophila* es un excelente modelo para el estudio de las rutas axonales, sinaptogénesis, reciclaje de vesículas sinápticas y otros muchos aspectos de la función sináptica (Budnick & Gramates, 1999; Keshishian & Kim, 2004; Kidokoro *et al.*, 2004). La mayoría de estos estudios se han realizado en embriones y estados larvarios, pero son pocos los estudios en su contraparte adulta.

En el caso de larvas de tercer estadio de cepa seudonativa al ser sometidas a un estrés térmico agudo, en la SNM se observó un aumento en la capacidad de respuesta al estrés térmico expresada como un mayor conteo de botones sinápticos presentes en la unión neuromuscular, mientras que, en individuos mutantes con la expresión de la proteína sináptica disc-large alterada, se observó más bien, una tendencia a la mantención de un patrón similar al que se observa en individuos crecidos a 23°C, es decir, en lugar de aumentar la cantidad de botones, esta permanece estable o con un aumento pequeño a pesar del aumento de la temperatura ambiente. Al explorar en adultos, la función cerebral y neuromuscular en ausencia de DLGS97, los datos obtenidos en larvas se correlacionan con la disminución, en las capacidades locomotora, gustativa-olfativa y fototáctil observadas durante este estudio tanto en individuos larvales como en adultos de las distintas cepas en estudio, aunque no fue posible determinar mediante inmunohistoquímica el cambio en el patrón de distribución de terminaciones sinápticas, por falta de una técnica adecuada para la obtención de muestras de tejido muscular en moscas adultas.

Las motoneuronas que inervan los músculos adultos, se desarrollan a partir de motoneuronas larvales por medio de remodelaciones periféricas, así como también, en sus arborizaciones dendíticas.(Albornoz *et al.*, 2008). En este estudio, la integridad de la sinapsis fue medida en forma indirecta en individuos adultos juveniles de *D. melanogaster*, mediante ensayos de olfacción y locomoción, realizados en cepas control, mutantes recombinadas para pérdida de función y posteriormente en cruza rescate a fin de determinar el grado de afección que resulta de la expresión deficiente de *dlg* en situaciones de estrés térmico agudo.

Los resultados, obtenidos en mutantes arrojaron un comportamiento similar al de la cepa pseudo nativa en ensayos realizados a 23°C y una disminución de ambos parámetros en moscas mutantes nulas *dlgS97* cuando la tarea se exigía a mayor temperatura, la pérdida de función total se logró realizando cruza consecutivas de mutantes parciales de *dlgS97* con cepas transgénicas *UAS-Gal4*, para luego ser sometidas a los mismos tests de esfuerzo, donde las cepas obtenidas presentaron

un detrimento significativo en cada uno de los parámetros cuantificados inclusive a 23°C y aún más significativos a 29°C.

El rescate de la expresión de la proteína sináptica Dlg, se logró de forma análoga, utilizando el sistema de cruzas UAS-Gal4 con el *driver* neuronal Elav y el *driver* muscular Gal4-C57. El gen Elav, pertenece a una familia de proteínas citoplasmáticas de unión a RNAm, cuya función es hacer que cada isoforma proteica tome su alternativa correcta de splicing, cumpliendo así una función reguladora; *elav* se expresa en todas las neuronas después del nacimiento, y es requerido para la correcta diferenciación y mantenimiento del sistema nervioso, (Yao, & White., 1994). Las cruzas con *elav* permitieron recuperar la correcta expresión de *dlgS97* y *dlgA*, observado como una recuperación de la motilidad normal al realizar los ensayos a 23°C, sin embargo, en ensayos realizados a 29°C, sólo la cruce que expresaba *dlgS97* y *dlgA* conjuntamente, obtuvo una mejora significativa de la función locomotora. Por otra parte, al medir la capacidad olfativa en las mismas cepas, se obtuvo un rescate total de la función a 23°C y una mejora significativa de la respuesta olfativa al realizar el mismo ensayo a 29°.

Para descartar la posible expresión reducida de *dlgS97* y *dlgA* a causa de una mala localización en la unión neuromuscular, utilizamos la cepa Gal4-C,57 un *driver* músculo-específico (Koh *et al.*, 1999), estas cruzas permitieron el rescate total de la función locomotora en larvas y adultos a 23°C y una respuesta mejorada significativamente al realizar los ensayos a 29°C. además se obtuvo un rescate parcial en el caso de ensayos de olfacción realizados a 23°C, pero a 29°C no se obtuvieron mejoras significativas de la respuesta olfatoria. Estos resultados confirman los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados en cepas mutantes DLG, y permiten concluir que Dlg es esencial en la regulación de conductas complejas altamente coordinadas, que requieren una función sináptica perfecta, y su rol es aún más crítico cuando el organismo es sometido a temperaturas superiores a 25°C

5. Conclusiones

1. Las cepas de Dlg mutantes nulas para el dominio S97N presentan defectos medibles en la capacidad de locomoción y olfacción en individuos adultos al ser sometidos a un estrés térmico agudo.
2. Las mutantes nulas para la proteína *dlgS97* presentan defectos en su fertilidad relativa vista como una menor tasa de postura, y dificultad en completar satisfactoriamente el desarrollo embrionario, así como también una disminución en la tasa de longevidad cuando son sometidas a estrés térmico crónico.
3. Las larvas de segundo estadio de mutantes nulas de *dlgS97*, presentan defectos medibles y significativos en su capacidad locomotora y olfativa al ser sometidos a estrés térmico agudo.
4. La inhibición de la expresión de DlgS97 en el músculo comprueba que larvas de tercer estadio, presentan defectos medibles y significativos en su plasticidad sináptica, vista como una menor capacidad de aumentar el número de botones sinápticos, al ser sometidas a estrés térmico crónico.
5. La falta de expresión total de DlgS97 y parcial de DlgA a nivel pre o postsináptico, causa defectos medibles y significativos, en la capacidad locomotora y olfativa tanto en larvas como adultos al ser sometidos a estrés térmico tanto agudo como crónico.

6. Referencias Bibliográficas

Albornoz, V., Mendoza-Topaz, C., Oliva, C., Tello, J., Olguín, P., Sierralta, J. (2008). Temporal and spatial expression of *Drosophila* DLGS57 during neural development. *Gene Expression Patterns*. **8**: 443-451.

Bate, M y Martínez Arias, A. (1993). The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, capítulos 18, 19, 20.

Bilder, D (2001). Cell Polarity: Squaring the circle. *Curr. Biol.* **11**: 132-135.

Bilder, D., Li, M. Perrimon, N (2000) Cooperative Regulation of Cell Polarity and Growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**:113-116

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.

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.

Budnik, V. y Gramates, L. S. (1999). Neuromuscular Junctions in *Drosophila* (San Diego, Academic Press).

Campos AR., Lee K J., Steller H. (1995). Establishment of neuronal connectivity during development of the *Drosophila* larval visual system. *J Neurobiol*; **28**: 313-29.

Caruana, G. (2002). Genetic studies define MAGUK proteins as regulators of epithelial cell polarity. *Int. J. Dev. Biol.*, **46**, 511-518.

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.

Cobb, M and Domain, I (2000). Olfactory coding in a simple nervous system: Modulation of locomotion by light in the *Drosophila melanogaster* larva requires genetically distinct visual system functions. *J. Neurosci.* **19**: 3337-3344.

Doyle, D., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., Mackinnon, R. 1996. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein binding domain: Molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85:1067-1076.

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.

Garner, CC., Nash, J y Huganir, RL (2000). PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biology*.10: 274-280.

Green P., Hartenstein AY., Hartenstein V. (1993) The embryonic development of the *Drosophila* visual system. *Cell Tissue Res*; 273: 583-98.

Hassan B.A., Bermingham N.A., He Y., Sun Y., Jan Y.-N., Zoghbi H.Y., Bellen H.J.(2000) Atonal regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron*, 25 (3), pp. 549-561.

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Häberlin, C., and Stocker, R.F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: Toxin expression studies in chemosensory neurons. *J. Neurosci.* **19**: 1617-1630.

Houh, CD, Woods, DF., Parks, S y Bryant, PJ (1997). Organizing a functional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Disc-Large. *Gene Dev.* 11: 3242-53.

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.

Keshishian, H., Kim, YS. (2004). Orchestrating development and function; retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends Neurosci Res* 19: 143-154.

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

Koh, Y. H., Popova, E., Thomas, U., Griffith, L. C. and Budnik, V. (1999). Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* **98**, 353-363

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

Kuhlendahl S., Spangerber 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.

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.

Mendoza, C., Olguín, P., Lafferte, G., Thomas, U., Ebitsch, 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.

Mendoza- Topaz, C., Urra, F., Barria, R., Albornoz, V., Ugalde, D., Thomas, U., Ceriani, M.F., Budnik, V., Sierralta, J., (2008). *DLGS97/SAP97* is developmentally upregulated and is required for complex adult behaviors and synapse morphology and function. *The journal of Neuroscience* **28**, 304-314.

Oppliger, F.Y., Guerin, P.M., and Vlimant, M., (2000). Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Insect Physiol.* **46**: 135-144.

Peng, C., Manning, L., Albertson, R. and Doe, CQ. (2000) The Tumor Suppressor Genes, *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* Neuroblast. *Nature* **408**: 596-600.

Python, F and Stocker, R.F (2002). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J. Compar. Neurol.* **445**: 374-387.

Sawin-McCormack, E.P., Sokolowski, M.B., and Campos, A.R. (1995). Characterization and genetic analysis of *Drosophila melanogaster*, photobehavior during larval development. *J. Neurogenet.* **10**: 119-135.

Sheng, M Sala, C. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complex. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**:1-29.

Sierralta J. and Mendoza C. (2004). PDZ-Containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity. *Brain Research Rev.* **47**, 105-115.

Singh, R.N and Singh, K. (1984). Fine structure of the sensory organs of *Drosophila melanogaster* Meigen larva (Diptera: Drosophilidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **13**: 255-273.

Sullivan W., Ashburner M, Scout R. 2000. *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p678.

Suster M L., Martin JR., Sung C., Robinow S. (2003). Targeted expression of tetanus toxin revealed set of neurons involved in larval locomotion in *Drosophila*. *J Neurobiol* 55:233-46.

Stocker, R.F., (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and Tissue Research* 275, 3-26.

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.

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.

Tissot, M., Gendre, N., Hawken, A., Störtkuhl, K. F., and Stocker, R.F. (1997). Larval chemosensory projections and invasion of adult afferents in the antennal lobe of *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **32**: 281-297.

Truman, J.W., (1990). Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* **21**, 1072-1084.

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.

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.

Wu, H., Reissner, C., S., Khulendahl, S., Coblenz, B., Reuver, S., Kindler, S., Gundelfinger, E. and Garner, C (2000). Intramolecular interactions regulate SAP 97 binding GKAP. *EMBO J*, 19: 5740-5751.

Yao, KM and White, K. (1994). Neural specificity of elav expression: defining a *Drosophila* promoter for directing expression to the nervous system. *J. Neurochem.* **63**: 41-51

Woods D. F. y. Bryant P. J. (1989). Molecular cloning of the lethal (1) Discs large-1 oncogene of *Drosophila*. *Dev. Biol* 134: 222-235.