



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

“Requerimiento de Slit en la morfogénesis del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster*”

Memoria para optar al Título de Bioquímico

Lorena Isabel Caipo Coral

DIRECTORES

Dr. Carlos Oliva Olave

Laboratorio de Neurodesarrollo

Departamento de Biología Celular y
Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Pontificia Universidad Católica de Chile

Dra. Jimena Sierralta

Laboratorio de Neurobiología Celular y
Molecular

Departamento de Neurociencia

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

PATROCINANTE

Dr. Dante Miranda

Laboratorio de Bioquímica

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

Diciembre, Santiago, Chile 2017

Dedicado a Dios y a mis padres por su esfuerzo para darme todo...

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer:

Al Dr. Carlos Oliva por recibirme en su laboratorio y por su dirección en mi trabajo.

A las profesoras miembros de mi comisión por sus valiosos aportes recibidos.

A mi profesor patrocinante por su apoyo y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de la Universidad de Chile y a los de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por brindarme su ayuda y conocimientos, y por los buenos momentos que pasamos.

A mis padres Oscar y Edit, y a mis hermanas por estar siempre conmigo.

A Luis por ser mi amor y mi apoyo incondicional.

A todos mis familiares y amigos por todo su cariño y por la motivación para seguir siempre adelante.

A Conicyt, Proyecto Fondecyt 11150610.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice de Contenidos.....	III
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas.....	V
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	IX
Summary.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Compartimentalización del Sistema Nervioso.....	1
1.2 Vía de señalización Slit/Robo.....	4
1.3 El sistema visual de <i>Drosophila</i> como modelo para estudiar la compartimentalización.....	5
1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
1.5 HIPÓTESIS.....	11
1.6 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Reactivos y soluciones.....	12
2.1.1 Disección de cerebros e Inmunofluorescencia.....	12
2.1.2 Anticuerpos.....	13
2.2 Cepas de moscas	14
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.2.2 Sistema Gal4-UAS.....	17

2.3	Generación de construcciones de Slit.....	22
2.4	Disección de cerebros e inmunofluorescencia de cerebros.....	22
2.5	Microscopía confocal de fluorescencia.....	23
3.	RESULTADOS.....	24
3.1	Slit influye en el establecimiento de límites entre compartimentos durante el desarrollo del lóbulo óptico.....	25
3.2	La reintroducción de Slit, en glías, fotorreceptores y neuronas de la médula, rescata diferencialmente el fenotipo de mutantes <i>slit</i>	26
3.2.1	La reintroducción de <i>slit</i> en glías rescata parcialmente el fenotipo del mutante <i>slit</i>	26
3.2.2	La reintroducción de <i>slit</i> en fotorreceptores no rescata el fenotipo del mutante <i>slit</i>	28
3.2.3	La reintroducción de <i>slit</i> en neuronas de la médula rescata el fenotipo del mutante <i>slit</i>	30
3.3	La sobreexpresión de Slit en glías genera defectos en el lóbulo óptico.....	31
3.4	El fenotipo del mutante <i>slit</i> no se rescata con Slit-TM.....	34
3.5	El fenotipo del mutante <i>slit</i> se rescata con Slit-UC.....	35
4.	DISCUSIÓN.....	39
5.	CONCLUSIONES.....	44
6.	REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Cerebro y sistema visual de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Fig. 2 Etapas del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	17
Fig. 3 Sistema Gal4/UAS.....	18
Fig. 4 Esquema simplificado de construcciones de la proteína Slit.....	21
Fig. 5 Defectos en el desarrollo del lóbulo óptico de mutantes <i>slit</i>	25
Fig. 6 Reintroducción de Slit en células gliales rescata parcialmente el fenotipo mutante del lóbulo óptico.....	28
Fig.7 Reintroducción de Slit en fotorreceptores no rescata el fenotipo mutante del lóbulo óptico.....	29
Fig. 8 Reintroducción de Slit en neuronas de la médula rescata el fenotipo mutante del lóbulo óptico.....	31
Fig.9 Sobreexpresión de Slit en glías conduce a un fenotipo defectuoso del lóbulo óptico.....	32
Fig. 10. Reintroducción de Slit-UC en neuronas de la médula rescata el fenotipo mutante del lóbulo óptico.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios.....	13
Tabla 2. Anticuerpos secundarios.....	13
Tabla 3. Cepas transgénicas.....	15
Tabla 4. Tabla de genotipos y fenotipos de los experimentos de rescate y sobreexpresión.....	33
Tabla 5. Tabla de genotipos y fenotipos de los experimentos con Slit-TM y Slit-UC.....	38

ABREVIATURAS

SIGLA: SIGNIFICADO

Abl: Tirosina Quinasa Abelson

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Albúmina de suero bovino

CD8: *Cluster of differentiation 8*

CL: Complejo del lóbulo óptico

CO₂: Dióxido de Carbono

CS: *Cantonese S.*

C-Slit: Fragmento C-terminal de la proteína Slit

Cyo: *Curly oyster*

Dapi: 4',6-diamino-2-fenilindol

D. melanogaster. Drosophila melanogaster

DSHB: *Developmental Studies Hybridoma Bank*

dSlit: Proteína Slit de *Drosophila*

dui: Por las siglas en inglés *disrupted innervation*, inervación alterada

EGF: Factor de crecimiento epidermal

Ena: Enabled

ey+: *eyeless* positivo

F1: Primera generación filial

Gal4: Factor transcripcional de levadura Gal4

GFP: Proteína verde fluorescente

GMR: *Glass Multiple Reporter*

if: *Irregular facet*

IPC: Centro de proliferación Interna

L3: Tercer estadio de larva

lam: Lámina

L-GMR: *Long GMR-Gal4*

lo: Lóbula

LO: Lóbulo óptico

me: médula

merge: Fusión de canales obtenidos en microscopio confocal

min: Minuto

Mira: Proteína Miranda

Mkrs: Mn(minute), kar(karmoisina), ry(rosy), sb(stubble)

mm: Milímetro

N-Cad: Cadherina neuronal

NIH: *National Institutes of Health*

N-Slit: Fragmento N-terminal de la proteína Slit

Nº: Número

P25: Estadio de pupa 25

P50: Estadio de pupa 25

PBS: Amortiguador fosfato de sodio

pl: Placa de la lóbula

PT: Amortiguador fosfato de sodio con Tritón X-100

R1-R8: Fotorreceptores 1-8

Repo: *Reversed polarity protein*

RIG1: Homólogo de Robo3

Robo: Receptor *Roundabout*

SemD: Semaforina D

sli: Gen *slit*

Slit: Proteína Slit

Slit-TM: Proteína Slit con un fragmento transmembrana

Slit-UC: Proteína Slit no procesada proteolíticamente

SNC: Sistema Nervioso Central

srGAPs: Slit-Robo Proteínas que activan la Rho GTPasa

Tm6b: *Third multiple 6b*

Tm: Neuronas transmedulares

TmY: Neuronas transmedulares Y

UAS: Secuencia de Activación río arriba

VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

W1118: Cepa pseudo-nativa del tipo cantonés

μl: Microlitro

μm: Micrómetro

°C: Grado Celsius

RESUMEN

La vía de señalización Slit/Robo es una vía conservada en muchas especies que está involucrada en la guía de axones y dendritas durante el desarrollo del SNC. Estudios previos han demostrado que esta vía cumple un rol importante en la formación y mantención de límites en estadios tempranos del desarrollo del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster*. En este trabajo nos centramos en caracterizar la función del ligando de esta vía, la proteína Slit, la cual es secretada al medio extracelular y es procesada proteolíticamente. Encontramos que Slit influye en el establecimiento de límites entre compartimentos durante el desarrollo del lóbulo óptico. Mediante experimentos de rescate del fenotipo de mutantes Slit, usando el sistema Gal4/UAS, evaluamos la contribución de Slit en las diferentes subpoblaciones celulares del lóbulo óptico, donde se expresa: células gliales, neuronas de la médula y fotorreceptores. Descubrimos que la fuente principal de Slit son las neuronas de la médula, aunque investigaciones pasadas sugerían que Slit era secretada por glías. Además, analizamos si la función de Slit es a corta distancia, para lo cual realizamos experimentos de rescate específico en neuronas de la médula utilizando una versión de la proteína Slit con un segmento transmembrana en su extremo N-terminal, para mantenerla anclada a la membrana plasmática. Encontramos que esta versión de la proteína no rescata el fenotipo mutante de *slit*, por lo que creemos que Slit estaría actuando a largo alcance. Finalmente, realizamos experimentos de rescate específico en neuronas de la médula con una versión de Slit que no se procesa, para determinar si el corte proteolítico de Slit era requerido para su función y encontramos que este procesamiento es dispensable en este contexto. De esta forma, concluimos que Slit en el lóbulo óptico es secretado principalmente por las neuronas de la médula, actúa a larga distancia, y no requiere ser procesado para su acción.

SUMMARY

Slit is required in *Drosophila melanogaster* optic lobe morphogenesis

The Slit/Robo pathway is a widely conserved across species. It is involved in axon guidance during the development of the Central Nervous System (CNS). Previous studies have demonstrated the importance of this pathway in the formation and maintenance of boundaries in the optic lobe during early developmental stages in *Drosophila melanogaster*. During this thesis we focused on the characterization of the ligand of this pathway, the Slit protein, which is secreted to the extracellular medium and proteolytically processed. We observed that Slit is important in the establishment of boundaries in the optic lobe during the entire development of the animal. Through rescue experiments using the Gal4/UAS system, we evaluated the role of Slit in different optic lobe subpopulations where is expressed: glia, medulla neurons and photoreceptors. Thereby, we found out that the main source of Slit expression are medulla neurons, even though previous studies suggested that Slit is secreted by glial cells. Then, we assessed if the role of Slit is performed at short-range. For this aim we performed rescue experiments in medulla neurons using a Slit construct bound to a transmembrane domain to keep it attached to the plasma membrane. We observed that this construct did not rescue the mutant phenotype when expressed in medulla neurons. Finally, we performed rescue experiments using a Slit construct that cannot be processed because it lacks the cleavage site, and found that the proteolytic cleavage is not necessary in this cellular context. In summary, we found that during the development of the optic lobe, Slit protein is mainly secreted by medulla neurons, acts as a long-range cue and does not require proteolytic processing for its activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Compartimentalización del Sistema Nervioso

El sistema nervioso presenta un alto grado de organización, el cual es generado durante el desarrollo y da lugar al establecimiento de un patrón correcto de circuitos neuronales esenciales para la vida del animal. Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) existe un control genético que dirige la diferenciación celular y la morfogénesis en un patrón espacio-temporal determinado. En el caso de las neuronas, se establecen trayectorias definidas para los axones en crecimiento y patrones de conexión neuronales específicos para cada uno de los subtipos. La estructura en formación no solo precisa de conexiones finamente reguladas, ya que también requiere de la existencia de límites que definen los territorios ocupados por las diferentes poblaciones celulares (Kiecker y Lumsden, 2005), de manera de generar centros especializados en el procesamiento de las diferentes modalidades sensoriales en una zona cerebral definida.

En el estudio de este proceso tan complejo como organizado, es que podemos preguntarnos cuáles son los mecanismos que confluyen para generar el sistema nervioso que permite percibir tanto señales externas como internas del organismo y responder a éstas. En este contexto, el establecimiento de grupos celulares segregados es logrado mediante mecanismos que limitan la migración e intercalación celular, para mantener poblaciones específicas circunscritas a regiones particulares y dirigir decisiones de trayectoria axonal (Kiecker y Lumsden, 2005), definiendo así límites entre poblaciones neuronales.

Se ha demostrado que durante el desarrollo del SNC de vertebrado existe compartimentalización, es decir, se van estableciendo límites en los que se ha demostrado restricción a la migración e intercalación celular (Pasini y Wilkinson, 2002). Este proceso de compartimentalización está presente probablemente en todas las especies animales.

En el caso de los animales que poseen un sistema nervioso con simetría bilateral, existe un límite denominado línea media, que cumple la función de guiar conos de crecimiento (Long *et al.*, 2004). Algunos conos son repelidos de esta región evitando el cruce de neuronas que se proyectan en el mismo lado cerebral, denominadas ipsilaterales, y otros conos son atraídos por lo que estas neuronas, denominadas comisurales, cruzan la línea media y conectan ambos lados del sistema nervioso. Ambos tipos neuronales detectan y responden a las señales presentes en esta zona.

La línea media en vertebrados posee un grupo especializado de células en la región ventral de la médula espinal en desarrollo, denominada placa del piso (Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995). En invertebrados como *Drosophila*, las células análogas son un conjunto de glías especializadas que ocupan la línea media (Simpson *et al.*, 2000a), las que forman el límite y separan las dos mitades simétricas del SNC como un espejo. Las glías de la línea media secretan una serie de factores que cumplen una función en el modelado de las trayectorias axonales y en las decisiones de orientación específicas. La mayoría de los conos de crecimiento entran y cruzan la línea media y una vez que lo hacen no vuelven a cruzar, luego se extienden y avanzan hacia su blanco. Esto ocurre debido a que la línea media es capaz de modificar la capacidad de un axón para responder a estas señales (Brose *et al.*, 1999). Existen señales atrayentes como las

netrinas que dirigen a los conos de crecimiento a extenderse hacia la línea media, sin embargo, esta última también presenta señales repulsivas para muchos axones. En consecuencia, la línea media juega un rol activo en el cruce de axones comisurales y prevención de un segundo cruce de los mismos, así como en la prevención del cruce de axones ipsilaterales. Los axones en desarrollo responden a señales presentes en el medio a través de cambios en la expresión de proteínas de superficie celular, como lo son los receptores de las moléculas de guía axonal (Rajagopalan *et al.*, 2000a; Simpson *et al.*, 2000b)

Los mecanismos que determinan la formación de compartimentos han sido extensamente estudiados en cuanto a factores de transcripción que definen los compartimentos. Por ejemplo, se conoce ampliamente como los factores de transcripción Hox participan en la generación de compartimentos en el cerebro posterior de mamífero (Kiecker y Lumsden, 2005), aunque los mecanismos moleculares, blancos transcripcionales y posteriores efectores que mantienen la segregación entre territorios no han sido completamente descritos. Se sabe, por ejemplo, que la expresión diferencial de moléculas de adhesión, como las cadherinas, participan en procesos de segregación de tejidos (Duguay *et al.*, 2003).

Dado que las vías de señalización que regulan la guía de los axones, también se han involucrado en migración celular (Ordan *et al.*, 2015), es posible que estas también limiten el movimiento celular durante la generación de compartimentos, especialmente aquellas involucradas en repulsión.

1.2 Vía de señalización Slit/Robo

La vía de señalización Slit-Robo, formada por el ligando Slit y el receptor Robo, está involucrada principalmente en la guía de axones y dendritas en crecimiento durante el desarrollo del sistema nervioso (Dickson y Gilestro, 2006). Slit es una proteína secretada que puede actuar como señal de guía principalmente repulsiva (Kramer *et al.*, 2001; Englund *et al.*, 2002). Una vez secretado Slit es procesado, dando origen a un fragmento N-terminal, responsable de su actividad, que se une al receptor Robo, y otro fragmento C-terminal (Brose *et al.*, 1999; Kidd *et al.* 1999), cuya función no está completamente definida. Se ha observado que cuando Slit se une a su receptor Robo, los axones son repelidos de la fuente de Slit a través de la modificación de la dinámica del citoesqueleto de actina (Dickson y Gilestro, 2006).

La vía de señalización Slit/Robo se encuentra evolutivamente conservada desde invertebrados hasta vertebrados (Brose y Tessier-Lavigne, 2000; Wong *et al.*, 2002), por lo que es posible estudiarla en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* que ha sido de gran ayuda para entender su funcionamiento (Kidd *et al.*, 1999; Rajagopalan *et al.*, 2000b; Simpson *et al.*, 2000a,b).

En mamíferos se han descrito tres ligandos Slit (Slit 1, 2 y 3) y cuatro receptores Robo (Robo 1 al 4), mientras que en *Drosophila* se expresa solo un ligando Slit y tres receptores Robo (Robo, Robo2 y Robo3) (Dickson y Gilestro, 2006). Diferentes estudios han determinado que todas las proteínas Slit de mamífero comparten una estructura de dominios común con Slit de *Drosophila* (dSlit), con un 43,5%, 44,3% y 41,1% homología de secuencia entre la Slit de la mosca y las Slit 1, 2 y 3 de mamíferos, respectivamente (Brose, 1999).

Robo promueve la repulsión neuronal en la línea media a través de su dominio citoplasmático, el cual se une directamente a Abl, Ena/Vasp (Bashaw et al., 2000) y srGAPs (Wong et al., 2001), efectores río abajo de los que se cree modulan directamente la polimerización de actina durante la guía axonal. Otros estudios minuciosos de la señalización de Robo y Netrina *in vitro* con cultivos neuronales de *Xenopus*, dan cuenta de un segundo mecanismo de repulsión axonal, donde el dominio citoplasmático de Robo media la repulsión axonal parcialmente por unión al dominio citoplasmático de los receptores de netrina, silenciando la señal atractiva de esta última (Stein y TessierLavigne, 2001). La reciente identificación de mutaciones en Robo3 humano (RIG1) ha demostrado que su función es importante para el desarrollo del cerebro (Jen *et al.*, 2004).

1.3 El sistema visual de *Drosophila* como modelo para estudiar la compartimentalización

El sistema visual de *Drosophila* está formado por la retina y el lóbulo óptico (LO), el cual a su vez puede subdividirse en cuatro regiones o neuropilas: lámina, médula, lóbula y placa de la lóbula (Sanes y Zipursky, 2010; Fig. 1; Fig. 5 D). Estas regiones se distinguen claramente en el adulto y realizan diferentes funciones involucradas en el procesamiento de información visual (Hadjieconomou *et al.*, 2011), por lo que este sistema es ideal para investigar los procesos involucrados en la mantención de territorios debido a la fácil visualización de defectos en moscas adultas. Durante el desarrollo no hay una clara distinción entre ellas sin el uso de marcadores moleculares específicos ya que las poblaciones celulares están mucho más próximas entre ellas, sin embargo, se puede distinguir una segregación clara donde los grupos celulares

son restringidos a compartimentos discretos que darán origen a cada una de las neuropilas mencionadas anteriormente.

El ojo de *Drosophila* es una estructura compuesta que tiene aproximadamente 800 unidades, llamadas omatidios. Cada omatidio tiene 8 células fotorreceptoras, 6 neuronas externas las cuales son las responsables de la formación de imagen y detección de movimiento (R1-R6) y 2 neuronas internas (R7 y R8) que son responsables de la visión del color (Hadjieconomou et al., 2011). Una vez que el estímulo visual alcanza la retina, éste es transmitido a la lámina por las células R1-R6 que conectan con las neuronas de la lámina. Las neuronas de la lámina conectan con neuronas de orden superior en la médula, y estas neuronas a su vez se conectan a la lóbula y placa de la lóbula donde el componente de movimiento del estímulo visual se procesa adicionalmente antes de ir al cerebro central (el protocerebrum). Por otra parte, los fotorreceptores R7 y R8 transmiten la información directamente a la médula (neuronas Tm o TmY), desde donde es enviada a la lóbula para el análisis del componente de color de la imagen visual. (Jagadish et al., 2014).

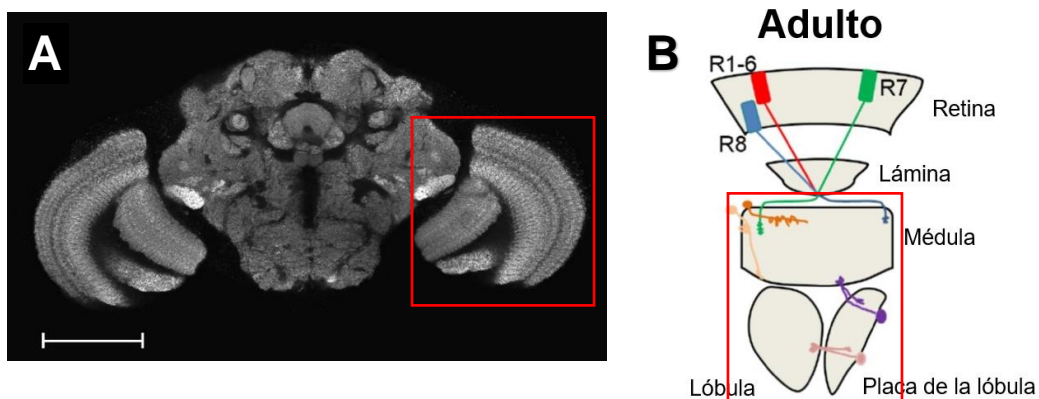


Fig. 1. Cerebro y sistema visual de *Drosophila melanogaster*

(A) Esquema del cerebro adulto de *Drosophila* (Rein, 2002). (B) Sistema visual de *Drosophila*, en cada neuropila son representados ejemplos de subtipos neuronales (modificado de Hadjieconomou, 2011).

(A y B) En recuadro rojo se muestra la zona del cerebro donde se encuentra la neuropila de la médula, la lóbula y la placa de la lóbula. La barra de escala representa 100 μ m.

Esta primera etapa en la transferencia de información posee pasos similares en el sistema visual de vertebrados. Estudios estructurales y funcionales indican que existe una estrecha similitud entre los circuitos neuronales que subyacen a la visión en vertebrados y moscas, compartiendo una arquitectura sorprendentemente conservada de unidades sinápticas organizadas en columnas y capas. Además, estudios genéticos han revelado mecanismos moleculares comunes que controlan el desarrollo de ambos sistemas visuales (Sanes y Zipursky, 2010). De esta forma, el estudio más detallado de estos mecanismos moleculares compartidos puede llevarnos a comprender de mejor manera como estos circuitos se forman, y una vez formados funcionan para procesar la información de estímulos percibidos, no sólo en las moscas sino también en vertebrados.

1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el estudio del desarrollo de la arquitectura y morfología del cerebro, se ha encontrado que la vía Slit/Robo desempeña un rol importante en el desarrollo cerebral. La interrupción de los tres genes *slit* en ratones conduce a defectos similares, aunque menos severos que aquellos vistos en mutantes *slit* de *Drosophila*, con axones cruzando aberrantemente o estancándose en la línea media (Long *et al.*, 2004).

Usando como modelo el LO de *Drosophila* se ha encontrado que tanto Slit como los receptores Robo inhiben la intercalación de poblaciones celulares adyacentes, pertenecientes a diferentes compartimentos (Tayler *et al.*, 2004). La pérdida de función de la proteína Slit o simultáneo knockdown (usando la técnica de ARN de interferencia) de los tres receptores Robo en el LO de *Drosophila*, se

relacionan con defectos en la morfogénesis del LO (Tayler *et al.*, 2004). Aunque estos estudios indican que la vía Slit-Robo participa en el proceso de compartimentalización del cerebro, los mecanismos moleculares no están claros, así como se desconoce cuáles son las poblaciones celulares involucradas en la secreción de Slit al sistema.

De acuerdo a trabajos anteriores y datos preliminares de nuestro laboratorio, el ligando Slit es expresado en el sistema visual en desarrollo por una subpoblación de células gliales, neuronas de la médula (una de las cuatro neuropilas del LO) y la retina. Sin embargo, no está claro en qué tipos celulares esta molécula es necesaria para lograr una separación adecuada de las poblaciones. ¿Podría ser la secreción por parte de una de estas poblaciones, más relevante y fundamental para la delimitación de los compartimentos?

Aunque no se han realizado experimentos dirigidos a determinar la fuente relevante de Slit, es aceptado que las células gliales son las que proveen de Slit al sistema. Los experimentos sugieren esta hipótesis debido a que las células gliales están presentes en la zona del límite entre las neuropilas, mientras que la importancia de la expresión de Slit en las otras dos poblaciones no se ha investigado. Por lo anterior, en este trabajo decidimos revisar el supuesto de que la glía es la encargada de proveer Slit al LO.

De acuerdo a resultados preliminares de nuestro laboratorio, las neuronas de la médula durante el desarrollo proyectan neuritas hacia la zona donde se genera el borde entre médula, lámina y complejo de la lóbula (lóbula y placa de la lóbula). De esta forma, creemos que esta población neuronal puede ser un buen candidato para proveer de Slit al sistema.

Existen además otras preguntas interesantes de abordar. Es conocido que después de su secreción, Slit es procesado proteolíticamente generando dos fragmentos: N-terminal (N-Slit) y C-terminal (C-Slit). El fragmento N-terminal lleva el dominio de unión a Robo, donde tanto el fragmento N-terminal de Slit como la proteína completa pueden gatillar la respuesta en células receptoras. No se han identificado aun las proteasas que median esta escisión, sin embargo, algunos candidatos incluyen metaloproteasas o furin proteasas (metaloproteasas por analogía con la escisión del ligando de Notch Delta por la metaloproteasa Kuzbanian: Qi *et al.*, 1999, o proteasas relacionadas con Furin por analogía con la escisión de Semaphorin III por Furin: Adams *et al.*, 1997).

Cómo el procesamiento de Slit influye en la función de la vía Slit/Robo es controversial, ya que se ha determinado que esta modificación no parece ser necesaria en todos los contextos. Experimentos en el cordón nervioso ventral de embriones de *Drosophila* indican que la escisión es dispensable (Coleman *et al.*, 2010). Sin embargo, un estudio reciente concluye que el procesamiento juega un rol en interacciones a corta distancia de Slit observadas durante el desarrollo muscular de *Drosophila* (Ordan *et al.*, 2015). ¿Cuál es la importancia del procesamiento en nuestro sistema? ¿Qué sucedería si esta modificación post-traducciona no se lleva a cabo?

Por otra parte, se ha mostrado que algunos factores secretados pueden funcionar a larga y a corta distancia (contacto célula-célula) (Alexandre *et al.*, 2014) ¿Slit ejerce un rol a nivel local? ¿La función de Slit requiere de contactos célula-célula?

Slit al ser secretada, puede asociarse con la membrana celular para funcionar como una señal a corta distancia o puede difundir en la matriz extracelular

obteniendo diferentes concentraciones de la proteína respecto a la distancia de la fuente. Por ejemplo, Slit se requiere para la migración de los precursores musculares lejos de la línea media, lo que sugiere que puede actuar tanto como un repelente de largo y corto alcance (Kidd *et al.*, 1999), aunque en el campo de los morfógenos y señales de guía, la existencia de gradientes de estos factores está empezando a ser cuestionada en algunos contextos (Alexandre *et al.*, 2014). Los fragmentos obtenidos del procesamiento de Slit difieren en tamaño, siendo el C-terminal más fácilmente difusible, por lo que se sugiere que las características de asociación de estos fragmentos a células o a la matriz extracelular pueden ser diferentes, presentando distinta extensión de difusión e interacciones de unión *in vivo*. El N-terminal de Slit podría actuar de manera local asociado a membranas celulares, mientras el C-terminal actuaría a larga distancia debido a su fácil difusión. Otra posibilidad es que solo uno de los fragmentos explique todas las actividades de la proteína, lo que sería justificado por la capacidad de respuesta de axones lejanos a la fuente de Slit frente a bajas concentraciones de este fragmento, indicando que probablemente N-Slit es esencial para la señalización mediante Robo, dado que C-Slit no posee sitios de unión al receptor.

1.5 HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los antecedentes ya mencionados, se plantea la siguiente hipótesis:

“Slit es requerida en las neuronas de la médula para la generación de bordes entre las neuropilas del lóbulo óptico de *Drosophila*, su función es independiente de su procesamiento proteolítico y se ejerce a nivel local”

Esta tesis tiene por objetivo determinar en qué tipo o tipos de poblaciones celulares del LO se requiere la participación de Slit, evaluando la importancia de su procesamiento proteolítico y analizando si funciona como un factor a corta distancia (contacto célula-célula), para determinar cómo esto influye en la función de Slit y por lo tanto en la compartimentalización del LO en *Drosophila melanogaster*.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de Slit en las diferentes poblaciones celulares y si su función en la morfogénesis del LO de *Drosophila melanogaster* requiere de su procesamiento proteolítico y se ejerce a nivel local.

1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la contribución de Slit en diferentes poblaciones celulares del LO: células gliales de la lámina, neuronas de la médula y fotorreceptores.
2. Determinar si el procesamiento proteolítico de Slit es requerido para su función.
3. Analizar el rol local de Slit utilizando una versión de Slit con un segmento transmembrana en su extremo N-terminal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y soluciones

2.1.1 Disección de cerebros e Inmunofluorescencia

- PBS = Amortiguador fosfato de sodio 0,1 M (Na_2HPO_4 0,2 M, NaH_2PO_4 0,2 M, NaCl 140 mM KCl 2,7 mM H_2O pH: 7,4)
- Tritón X-100, Winkler (Santiago, Chile)
- PT = Amortiguador fosfato de sodio, Tritón X-100 (PBS 1X; Tritón X-100 0,3%)
- Placa de disección de 6 mm, Trueline (D.F., México)
- Elastómero de silicona Sylgard 184, para placas de disección, Dow Corning Corporation (Midland, Michigan, EEUU)
- Pinzas Nº 5, Fine Science Tools, FST (North Vancouver, Canadá)
- Formaldehído, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Suero de cabra, Invitrogen (Carlsbad, California, EEUU)
- BSA (albúmina de suero bovino), Winkler (Santiago, Chile)
- Medio de montaje para fluorescencia Vecta Shield, Vector Lab (Burlingame, California, EEUU)
- Portaobjetos, Heathrow (Vernon Hills, Illinois, EEUU)
- Cubreobjetos, Heathrow (Vernon Hills, Illinois, EEUU)
- Dapi o Hoechst, Invitrogen (Carlsbad, California, EEUU)
- H_2O destilada

2.1.2 Anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos primarios

Anticuerpos primarios usados en esta tesis.

Anticuerpo	Descripción	Origen	Dilución
anti-rat-Ncadherina	Cadherina Neuronal	DSHB	1:50
anti-mouse-Chaoptin	Marcador de Fotorreceptores	DSHB	1:25
anti-Myc	Epítopo Myc	SANTA CRUZ	1:200
anti-Acj6	Antígeno Acj6	DSHB	1:20
anti-miranda	Neuroblastos	Cortesía de Yuh Nung Jan (Universidad de California, San Francisco, EEUU)	1:500

Tabla 2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpos secundarios usados en esta tesis.

Anticuerpo	Descripción	Origen	Dilución
anti-rat-Cy5	Cyanine Cy TM 5 F AffiniPURE Donkey Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson InmunoResearch	1:200
anti-mouse -Rhodamine	Rhodamine Red TM -X(RRX) AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson InmunoResearch	1:200
anti-rat-Alexa 647	Alexa Fluor® AffiniPURE Donkey Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson InmunoResearch	1:200
anti-mouse-Alexa 594	Alexa Fluor® 594 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson InmunoResearch	1:200

2.2 Cepas de moscas

Para este trabajo se utilizaron moscas de la especie *Drosophila melanogaster* en estadio de larva, pupa y adulto de 5 días de edad, empleando como cepa silvestre la línea pseudo-nativa W1118 (CS) del tipo cantonés, además de diferentes líneas transgénicas en base a cada objetivo planteado (Tabla 3).

Algunas de las cepas están en nuestro laboratorio, otras se obtuvieron del banco de cepas de *Drosophila* (Bloomington, Indiana, EEUU) y otras se mandaron a inyectar, para insertar en su genoma la construcción deseada a empresas especializadas en estas técnicas.

Tabla. 3. Cepas transgénicas

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

Nombre	Descripción	Fuente
W1118	Cepa silvestre	Bloomington Stock center
GMR-Gal4, UAS-mCD8=GFP	Expresa una proteína de fusión mCD8=GFP bajo el control del promotor GMR (Glass Multiple Reporter).	Generado por recombinación mediante cruza de cepas parentales. Cepas originales obtenidas del Bloomington Stock Center
OK107-Gal4	Stock sistema UAS/Gal4, expresa Gal4 bajo el control del promotor OK107 específico para neuronas de la médula.	Bloomington Stock Center
Repo-Gal4	Stock sistema UAS/Gal4, expresa Gal4 bajo el control del promotor Repo específico para células gliales.	Bloomington Stock Center
L-GMR-Gal4	Stock sistema UAS/Gal4, expresa Gal4 bajo el control del promotor L-GMR específico para fotorreceptores.	Bloomington Stock Center
UAS-Sli	Stock sistema UAS/Gal4, permite la expresión de la proteína Slit.	Bloomington Stock Center
UAS-22339_1_1M (Slit-UC)	Stock sistema UAS/Gal4, permite la expresión de la proteína Slit que no se procesa proteolíticamente.	Generado por la empresa Bestgene, usando ADN diseñado en nuestro laboratorio
UAS-22339_2_1M (Slit-TM)	Stock sistema UAS/Gal4, permite la expresión de la proteína Slit que contiene un fragmento transmembrana añadido.	Generado por la empresa Bestgene, usando ADN diseñado en nuestro laboratorio
<i>slit^{dui}</i>	Mutante hipomorfo del gen <i>slit</i>	Bloomington Stock Center
<i>slit²</i>	Mutante nulo del gen <i>slit</i>	Bloomington Stock Center

Todas estas cepas de moscas fueron mantenidas a temperatura ambiente en viales o botellas plásticas conteniendo medio de cultivo preparado a base de levadura fresca, glucosa, harina, agar, nipagin y ácido propiónico. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C.

Drosophila melanogaster posee varias ventajas sobre otros modelos, como un ciclo de vida corto, costo de mantención bajo, posee solo 4 cromosomas los cuales están secuenciados y es altamente manipulable genéticamente, debido a que se cuenta con herramientas como los cromosomas balanceadores y marcadores de selección dominantes (Greenspan, 2004).

En este trabajo se utilizaron cromosomas balanceadores (Ashburner, 1989), los cuales poseen inversiones que impiden su recombinación con sus cromosomas homólogos y así mantener stocks mutantes letales y facilitar la generación de cepas transgénicas que requieren la combinación de elementos genéticos en varios cromosomas. Los utilizados en este trabajo fueron (1) *Cyo* (*curly oyster*) que se manifiesta con alas curvas y (2) *Tm6b* (*third multiple 6b*) que muestra un exceso de quetas en la región humeral del tórax; estos cromosomas son letales en homocigosis. Los cromosomas marcadores con mutaciones visibles en el fenotipo usados fueron (1) *if* (*irregular facet*) que se manifiesta con ojos de facetas irregulares o rugosos y (2) *Mkrs* (*Mn*(*minute*), *kar*(*karmoisina*), *ry*(*rosy*), *sb*(*stubble*)) que se manifiesta con quetas notoriamente más cortas y gruesas que la mosca silvestre.

2.2.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de la mosca del vinagre se divide en cuatro estados: embrión, larva, pupa y adulto (Fig. 2). Su duración es de 10 días aproximadamente a 25°C.

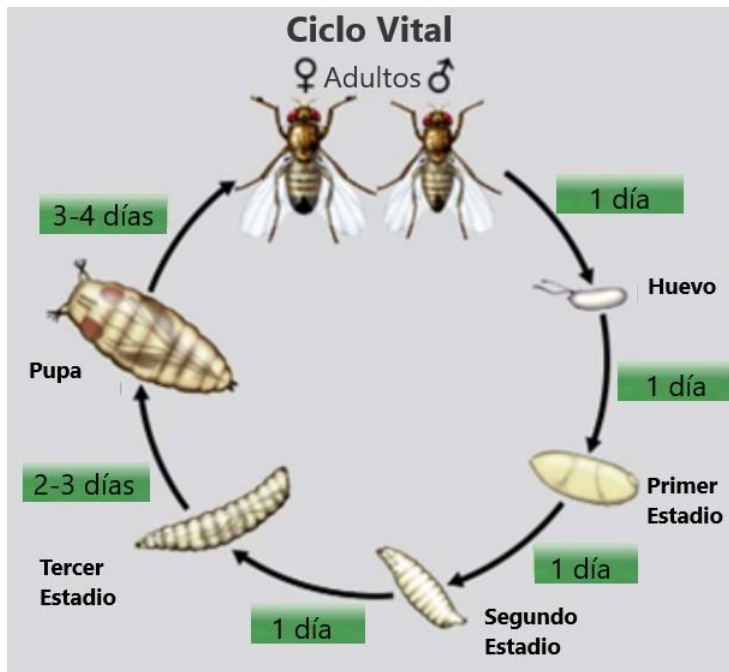


Fig. 2. Etapas del desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Ilustración de las etapas del desarrollo desde huevo hasta adulto. (modificado de Roote y Prokop, 2013)

2.2.2 Sistema Gal4-UAS

El sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993) permite dirigir la expresión de un gen de interés bajo un patrón de expresión deseado (Fig. 3). Este sistema está basado en el uso del factor transcripcional de levadura Gal4 y su unión a la secuencia reguladora río arriba llamada UAS (del inglés: *Upstream Activation Sequence*). Se requiere cruzar dos cepas transgénicas, una que posea en su genoma un promotor cualquiera acoplado a la secuencia del factor de transcripción Gal4 y otra que posea la secuencia UAS río arriba del gen de interés, las cuales reciben el nombre de *driver* y *responder*, respectivamente. Los descendientes de esta cruce genética contendrán ambas construcciones (Gal4 y UAS) por lo que el factor de transcripción Gal4 se unirá a la región UAS y dirigirá la expresión de la región de interés colocada río abajo de la secuencia UAS en un patrón espacio-temporal definido por su propio promotor. La eficiencia de este sistema depende de la temperatura, siendo mínima a 18°C y máxima a 29°C.

Sistema Gal-4 / UAS

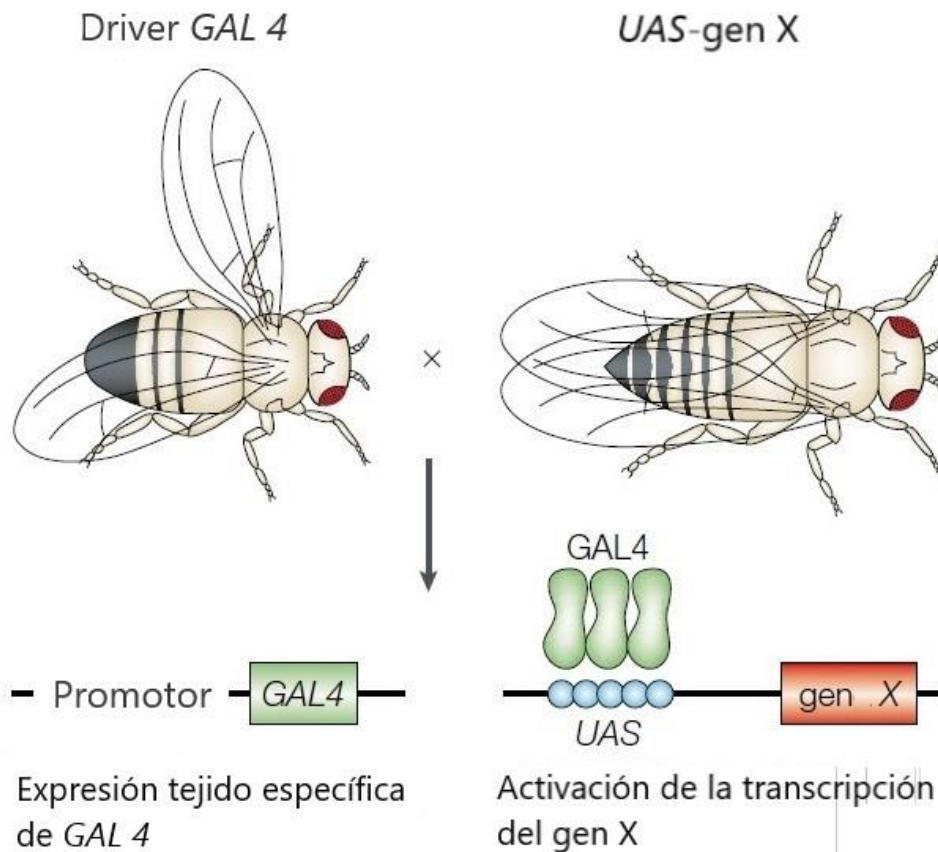


Fig. 3 Sistema Gal4/UAS

Las moscas hembras que poseen la secuencia UAS se cruzan con los machos que llevan el factor transcripcional Gal4, parte de la F1 corresponderá a la progenie que contiene tanto el factor transcripcional como su secuencia de unión UAS, activándose la expresión río abajo del UAS en el tejido y periodo de desarrollo donde se exprese Gal4. (modificado de Johnston, 2002)

Usando este sistema, las moscas que portan el gen *slit* de interés situado río abajo de la secuencia UAS fueron apareadas con moscas llevando los diferentes drivers GAL4, en este caso dirigidos a neuronas de la médula, glías y fotorreceptores. Se generó un número determinado de progenie con ambos elementos del sistema, lo que permitió activar la expresión del gen de interés junto a la secuencia UAS solamente en los tejidos mencionados dados por cada uno de los *drivers* GAL4.

Para abordar los objetivos propuestos en esta tesis se realizaron experimentos de rescate de fenotipo y de ganancia de función, mediante este sistema genético. Los experimentos de rescate de fenotipo mutante consistieron en reincorporar la expresión de un gen de interés en un fondo genético mutante del mismo mediante el sistema Gal4-UAS. Se esperaba obtener individuos con un fenotipo silvestre si el rescate ha sido exitoso, mientras que en los experimentos de sobreexpresión se sumó la expresión endógena del gen a la expresión dirigida por el sistema Gal4-UAS.

Se decidió analizar cómo se afecta el desarrollo del LO en mutantes *slit*, para lo cual se comparó el fenotipo del LO en diferentes estadios del desarrollo de moscas mutantes y silvestres.

Con el objetivo de evaluar la contribución de Slit en diferentes poblaciones celulares del LO como células gliales de la lámina, neuronas de la médula y retina, se determinó si la expresión selectiva de la proteína Slit en diferentes poblaciones celulares podía rescatar el fenotipo morfológico observado en los mutantes *slit*, mediante el uso del sistema Gal4-UAS.

Para determinar si el procesamiento proteolítico es requerido para la función de Slit, se evaluó el rescate de fenotipo morfológico observado en los mutantes Slit con una versión de Slit que no se procesa. Para esto se generó en primer lugar una construcción en donde se eliminó el sitio de reconocimiento para el procesamiento proteolítico mediante la técnica indicada en el punto **2.3** de este trabajo. Luego se obtuvieron moscas transgénicas que codificaban esta construcción en su genoma, adaptado para su inducción mediante el sistema UAS/Gal4.

Además, se expresó selectivamente la proteína Slit de manera tipo celular específica. Usamos la cepa OK107, una cepa Gal4 que dirigió la expresión de Slit en neuronas de la médula que expresan el factor de transcripción *eyeless* ($Me(ey^+)$) (Morante y Desplan, 2008), la cepa Repo-Gal4 que dirigió la expresión de Slit en células gliales y la cepa L-GMR-Gal4 que expresa Slit bajo el control del promotor GMR (*Glass Multiple Reporter*). Por otro lado, se usó la cepa UAS-Slit la cual posee la secuencia de activación de la transcripción río arriba del gen codificante de Slit. Cada cepa Gal-4 se cruzó con la cepa UAS y se evaluó el rescate de fenotipo, dado que los experimentos se realizaron sobre un fondo mutante. Esta cepa UAS posee una mutación de pérdida de función de Slit, denominada *slit^{dui}* (por las siglas en inglés *disrupted innervation*), la cual reduce significativamente la expresión de Slit en el LO sin eliminar completamente su expresión en otras regiones (Tayler, 2004). La cepa Gal4 también contenía una mutación de Slit denominada *slit²*, mutante nulo (Tayler, 2004). En ambos casos la mutación se encontraba en uno de los alelos del gen, de manera que luego de la cruce, la primera generación filial (F1) elegida fue la cepa mutante *slit^{dui}/slit²*, que a su vez expresaba ambos componentes del sistema Gal4-UAS. La selección se logró gracias a los marcadores fenotípicos ya mencionados.

Los fenotipos pudieron ser visualizados por la marca fluorescente, donde los anticuerpos primarios usados fueron N-cadherina, proteína estructural que permite visualizar la estructura general de las neuropilas del LO y 24B10 que reconoce a la proteína caoptina, una proteína de membrana específica de células fotorreceptoras. Además, se usó Dapi o Hoechst para visualizar núcleos celulares, ya que marcan ADN. También se observó la expresión endógena de

la proteína GFP en los fotorreceptores dirigida por el promotor GMR para algunas cepas usadas en este trabajo.

Finalmente se analizó el efecto local de Slit asociado a una versión de Slit con un segmento transmembrana en su extremo N-terminal, mediante experimentos de rescate de fenotipo con una versión de Slit que contiene una secuencia transmembrana en su extremo N-terminal (Fig. 4). Esta construcción también se sintetizó usando la técnica indicada en el punto 2.3. Los fenotipos se visualizaron en moscas adultas (5 días) mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal.

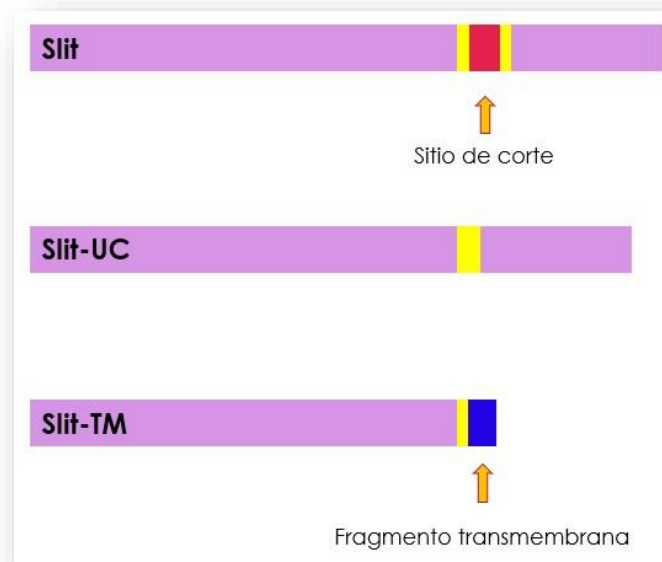


Fig. 4. Esquema simplificado de construcciones de la proteína Slit

Se muestra un esquema simple de la versión de la proteína Slit de largo completo con el sitio de corte indicado en rojo, la versión de Slit que no se procesa proteolíticamente (Slit-UC) ya que no posee el sitio de corte y la versión de Slit con un fragmento transmembrana añadido indicado en azul (Slit-TM).

2.3 Generación de construcciones de Slit

Construcción de Slit-UC (*uncleaved*): La construcción de Slit-UC se diseñó eliminando 39 nucleótidos correspondientes a una secuencia entre el 5^o y 6^o dominio de EGF que encerraban el sitio de corte (HNMISMMYPQTSP), tal como se realizó previamente (Ordan *et al.*, 2015). Además, se añadió una etiqueta Myc al extremo C-terminal usando un péptido enlazador (IASKPKGASVRA).

Construcción de Slit TM (Slit-N-CD8): Esta construcción se diseñó eliminando el fragmento C-terminal (el péptido indicado anteriormente más el resto del C-terminal) y añadiendo una secuencia CD8 unida al resto de la proteína por el mismo péptido enlazador, seguido mediante una etiqueta Myc también con este péptido enlazador.

La construcción fue sintetizada por Genewiz (South Plainfield, New Jersey, EEUU) y clonada en el vector pUAST-attB. Las moscas transgénicas fueron generadas por Bestgene, Inc, (Chino Hills, California, EEUU).

2.4 Disección de cerebros e inmunofluorescencia de cerebros

Una vez obtenidas las moscas deseadas resultantes de las cruzas genéticas pertinentes, se realizó la disección e inmunofluorescencia de cerebros de larvas, pupas y adultos de *Drosophila*, utilizando el protocolo diseñado por Wu *et al.*, (2006) con ciertas modificaciones como se describe a continuación. Con las moscas previamente anestesiadas con CO₂, se procedió a cortarles la cabeza, manteniéndolas en amortiguador fosfato salino pH 7,2 (PBS 1X) frío sobre una placa Petri de 60 mm cubierta con elastómero de silicona Sylgard 184. Posteriormente, se disectaron los cerebros utilizando pinzas hasta obtener una cantidad aproximada de 10 cerebros de la condición experimental determinada

e inmediatamente se trasladaron a un tubo eppendorf de 0,6 ml conteniendo 500 µl de paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador PT (Na_2HPO_4 0,1M pH 7,5; TritónX-100 0,3%). Los cerebros fueron fijados durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego lavados 3 veces durante 15 min en 500 µl de PBT bajo agitación constante a temperatura ambiente. Después, las muestras fueron bloqueadas por media hora con 500 µl de suero de cabra al 5% y se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (Tabla 1) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se volvieron a lavar 3 veces con 500 µl de PBT durante 15 min para cada lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 2) durante 2-4 horas a temperatura ambiente evitando la luz con papel aluminio. Finalmente, se volvieron a lavar los cerebros con 500 µl de PBT durante 15 min 3 veces y se montaron usando medio de montaje (Vectashield) en un portaobjetos.

2.5 Microscopía confocal de fluorescencia

Los resultados obtenidos se observaron mediante microscopía confocal, la cual permitió construir imágenes tridimensionales del tejido, en este caso el cerebro de *Drosophila* marcado por fluorescencia. Las imágenes se obtuvieron usando un equipo Olympus Flueview FV1000 con láseres. Se usaron objetivos de inmersión en aceite de 40x. Todas las imágenes fueron procesadas con el software imageJ (NIH).

3. RESULTADOS

3.1 Slit influye en el establecimiento de límites entre compartimentos durante el desarrollo del lóbulo óptico

Con la finalidad de observar cómo la ausencia de Slit afecta la morfología del LO de *Drosophila* durante el desarrollo, se decidió analizar el fenotipo de estas mutantes en 4 etapas del desarrollo: tercer estadio larval, estadio de pupa 25, estadio de pupa 50 y estadio adulto. Para ello, se realizó la disección e inmunofluorescencia de cerebros en cada estadio de una cepa heterocigota para la mutación (*slit^{dui}/+*) que presenta un fenotipo silvestre y de una cepa mutante homocigota (*slit^{dui}/slit^{dui}*).

Los resultados muestran que en el tercer estadio larval los neuroblastos del IPC (células Miranda positiva, Mira +) residentes del complejo del LO (CL) están claramente segregados de la región precursora de la lámina, destacada por los axones de células fotorreceptoras tipo R1-R6 en esta vista (GFP). Este límite está marcado por una línea blanca punteada en la figura (Fig. 5 A), pero se observa que en las mutantes las poblaciones celulares se entremezclan perdiéndose el límite definido (Fig. 5 E). Observamos también que a medida que el desarrollo avanza en el animal silvestre, el complejo del LO genera la lóbula y la placa de la lóbula donde ambas neuropilas son rodeadas por la neuropila de la médula. Adyacente a ésta se encuentra la neuropila de la lámina que en el adulto se separa completamente de la región de la médula (Fig. 5 B-D). En el desarrollo del mutante se observó que la estructura general es defectuosa. Gran parte de la neuropila de la médula presenta una morfología alterada en el estadio P25, manteniéndose esta condición hasta el adulto. También se observa que la

lámina queda fuertemente adherida al resto del LO y se observan defectos en la inervación fotorreceptora (GFP) (Fig. 5 F-H). De esta forma, los defectos en la generación y/o mantención de los compartimientos en estadios tempranos de mutantes *slit* producen efectos dramáticos en la morfología del LO adulto.

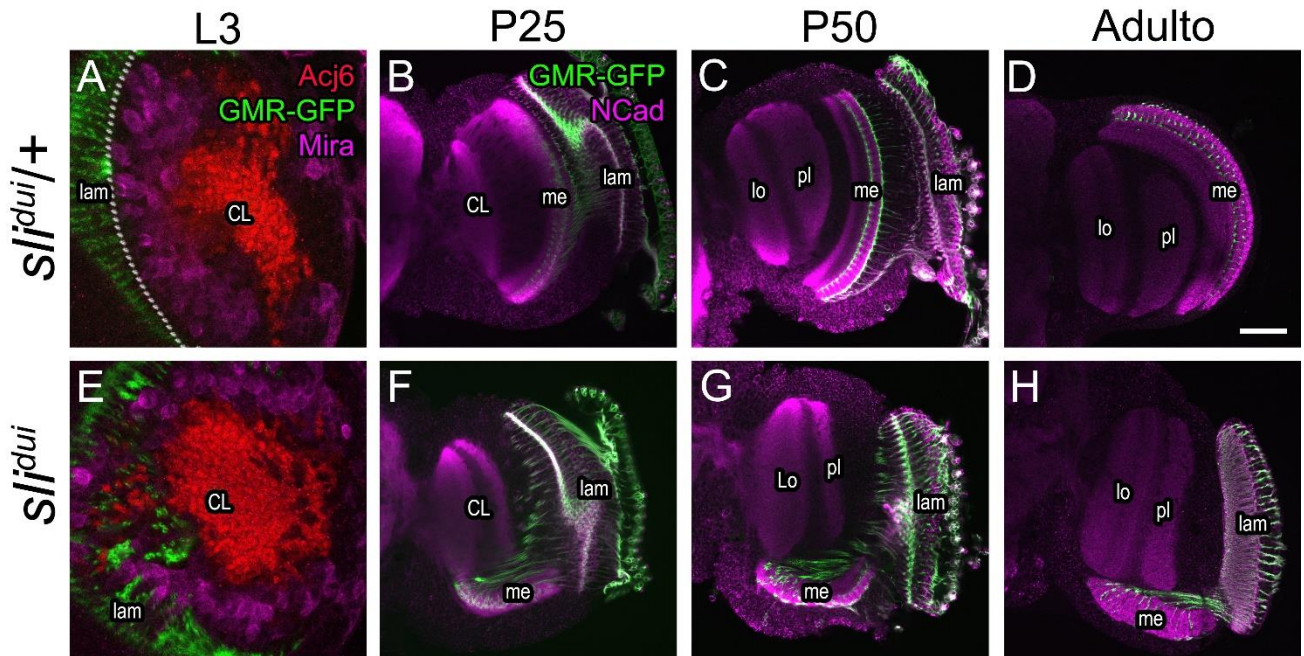


Fig. 5. Defectos en el desarrollo del lóbulo óptico de mutantes *slit*

Lóbulos ópticos teñidos con los anticuerpos anti-Miranda que marca neuroblastos del IPC (magenta), anti-Acj6 que marca el IPC (rojo) en estadio L3, anti-N-Cadherina que marca estructura general de las neuropilas del LO (magenta) en estadios P25, P50 y Adulto. En todos los estadios GMR-GFP marca fotorreceptores (verde) (vista lateral en A y E, las demás imágenes corresponden a una vista frontal). (A-D) Animales heterocigotos *slt^{+/+}* que poseen fenotipo silvestre. (A) Línea blanca punteada indica el límite entre poblaciones neuronales. (B-D) Se muestra como las neuropilas se forman normalmente y la lámina está separada del CL en el adulto. (E-H) Mutantes homocigotos *slt^{slt}*, presentan defectos en el desarrollo del LO. (E) Muestra la pérdida del límite entre poblaciones, se observa mezcla de poblaciones celulares. (F-H) Notar que la médula no se forma completamente y la lámina queda adherida al CL en el adulto. (L3: Tercer estadio de larva, P25: Estadio 25 de pupa, P50: Estadio 50 de pupa, CL: Complejo del lóbulo óptico, lo: lóbula, pl: placa de la lóbula, me: médula y lam: lámina). La barra de escala representa 50 μ m.

3.2 La reintroducción de Slit, en glías, fotorreceptores y neuronas de la médula, rescata diferencialmente el fenotipo de mutantes *slit*

La fuente principal de la proteína Slit aún no ha sido determinada, sin embargo, hay antecedentes en la literatura que indican que Slit se expresa en glías, fotorreceptores y neuronas de la médula (Tayler *et al.*, 2004). Se llevaron a cabo experimentos de rescate de fenotipo con el objetivo de evaluar la contribución de Slit en cada una de estas tres poblaciones de manera tipo celular específica y se observó el efecto en la compartimentalización del LO por la expresión de la guía de señalización Slit en cada una de ellas.

3.2.1 La reintroducción de Slit en glías rescata parcialmente el fenotipo del mutante *slit*

Mediante la cruce de la cepa Repo-Gal4 con la cepa UAS-Slit (en fondo genético mutante) se obtuvo el genotipo que permitió evaluar el rescate en las células gliales. Además, se realizaron los respectivos controles, un control silvestre y un control mutante, el cual contenía solo el componente Gal-4 en un fondo genético mutante (*slit^{dui}/slit²*) sin UAS-Slit.

La condición control posee un LO circular y organizado (Fig. 6 A-D), donde las neuropilas de la médula, la lóbula y placa de la lóbula se diferencian claramente (Fig. 6 B). La corteza de la médula se observa continua (Fig. 6 C) y los fotorreceptores se posicionan de manera ordenada, con inervación en la neuropila de la médula (Fig. 6 D). En la condición mutante observamos un LO que pierde la circularidad, y posee una forma más alargada (Fig. 6 E-H), la morfología general de las neuropilas cambia, e incluso en algunos casos se pierde parte de la neuropila de la médula (Fig. 6 F), la corteza se muestra

discontinua (Fig. 6 G) y los axones de los fotorreceptores colapsan y se proyectan aberrantemente hacia la médula proximal (Fig. 6 H).

La expresión de Slit en células gliales recupera parcialmente el fenotipo morfológico de las mutantes *slit* (Fig. 6 I-L). El fenotipo obtenido es incluso más aberrante que la condición mutante, presenta una morfología muy afectada, con una invaginación central y gran pérdida de la neuropila de la médula, sin embargo, existen regiones donde se rescata parcialmente la morfología en capas de esta neuropila (Fig. 6 J), se mantiene una estructura general de la corteza similar a la de la condición mutante (Fig. 6 K). Además, los axones de fotorreceptores se proyectan aberrantemente formando fascículos que interrumpen la continuidad de las neuropilas de la lóbula y la placa de la lóbula (Fig. 6 L). Estos resultados indican que la expresión de Slit por parte de las células gliales no contribuye de manera importante al fenotipo morfológico compartimentalizado del LO.

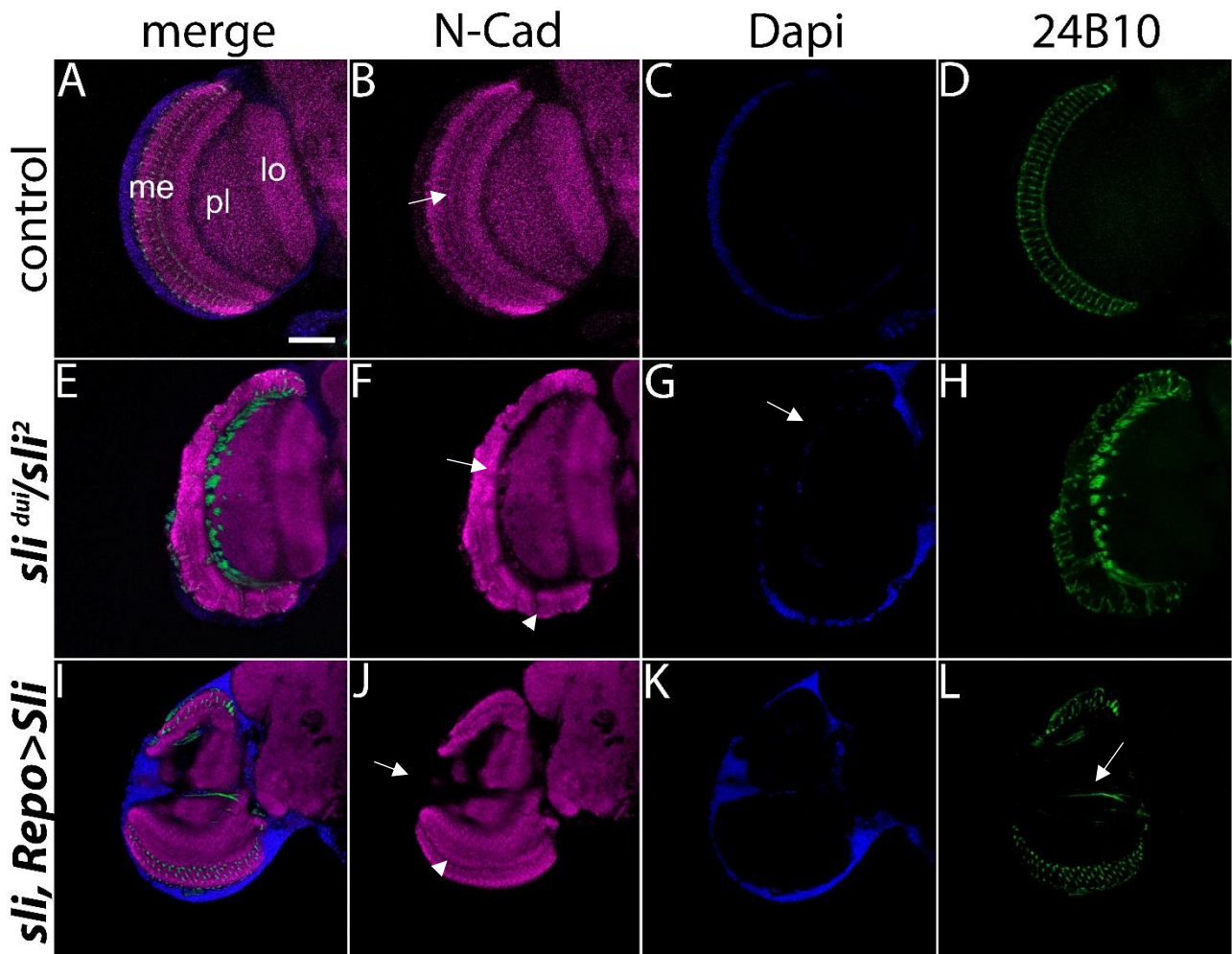


Fig. 6. Reintroducción de Slit en células gliales rescata parcialmente el fenotipo mutante del lóbulo óptico

Lóbulos ópticos adultos teñidos con los anticuerpos anti-N-cadherina (N-Cad) que marca estructura general de neuropilas (magenta), anti-caoptina (24B10) que marca axones de fotorreceptores (verde), Dapi marca fluorescente de ADN presente en núcleos neuronales en la corteza del LO (azul), merge: Fusión de las tres marcas anteriores. (A-D) Lóbulo óptico silvestre, muestra formación normal de las neuropilas; (B) LO circular y compartimentalizado, formación de capas en la neuropila de la médula (flecha), (C) corteza continua, (D) axones de fotorreceptores organizados de forma casi paralela. (E-H) Mutante *slit* (heterocigoto *slit^{dui}/slit²*), presentan defectos en el LO; (F) pérdida de la circularidad del lóbulo, muestra una forma más alargada, no presenta formación de capas en la médula (flecha) y existen zonas donde no se ha formado (punta de flecha), (G) la corteza es discontinua, no se forma en la parte lateral del LO (flecha), (H) los axones de fotorreceptores colapsan y se proyectan aberrantemente. (I-L) Rescate parcial en glías con Repo-Gal4; (J) se observa un fenotipo más aberrante que el mutante con una invaginación central (flecha) y gran pérdida de la médula, sin embargo, existen zonas de la médula con formación de capas (punta de flecha), (K) la corteza tiene forma similar a mutante, (L) se forma un fascículo de fotorreceptores (flecha). (Vista lateral del LO, me: médula, pl: placa de la lóbula, lo: lóbula). La barra de escala representa 50 μ m.

3.2.2 La reintroducción de Slit en fotorreceptores no rescata el fenotipo del mutante *slit*

Se experimentó el rescate de fenotipo expresando Slit en fotorreceptores, mediante la cruce de L-GMR-Gal4 con UAS-Slit (en fondo genético mutante), donde también se realizó un control silvestre y un control Gal4, que posee un fenotipo mutante, ya que no presenta el componente UAS del sistema de rescate. Los resultados mostraron que cuando se reintrodujo *slit* en

fotorreceptores, la morfología del LO es irregular y muy similar al fenotipo del mutante *slit* (Fig. 7 I-L); en este caso no se rescata el fenotipo mutante. Los bordes de las neuropilas se observan más irregulares, principalmente el borde de la médula proximal y la neuropila de la placa de la lóbula está casi ausente formándose sólo pequeñas crestas (Fig. 7 J). La corteza de la médula distinguible por los núcleos marcados con Dapi desaparece en gran parte (Fig. 7 K) y los fotorreceptores colapsan entre sí, sin embargo, no se observan fascículos como en el experimento de rescate en glías (Fig. 7 L).

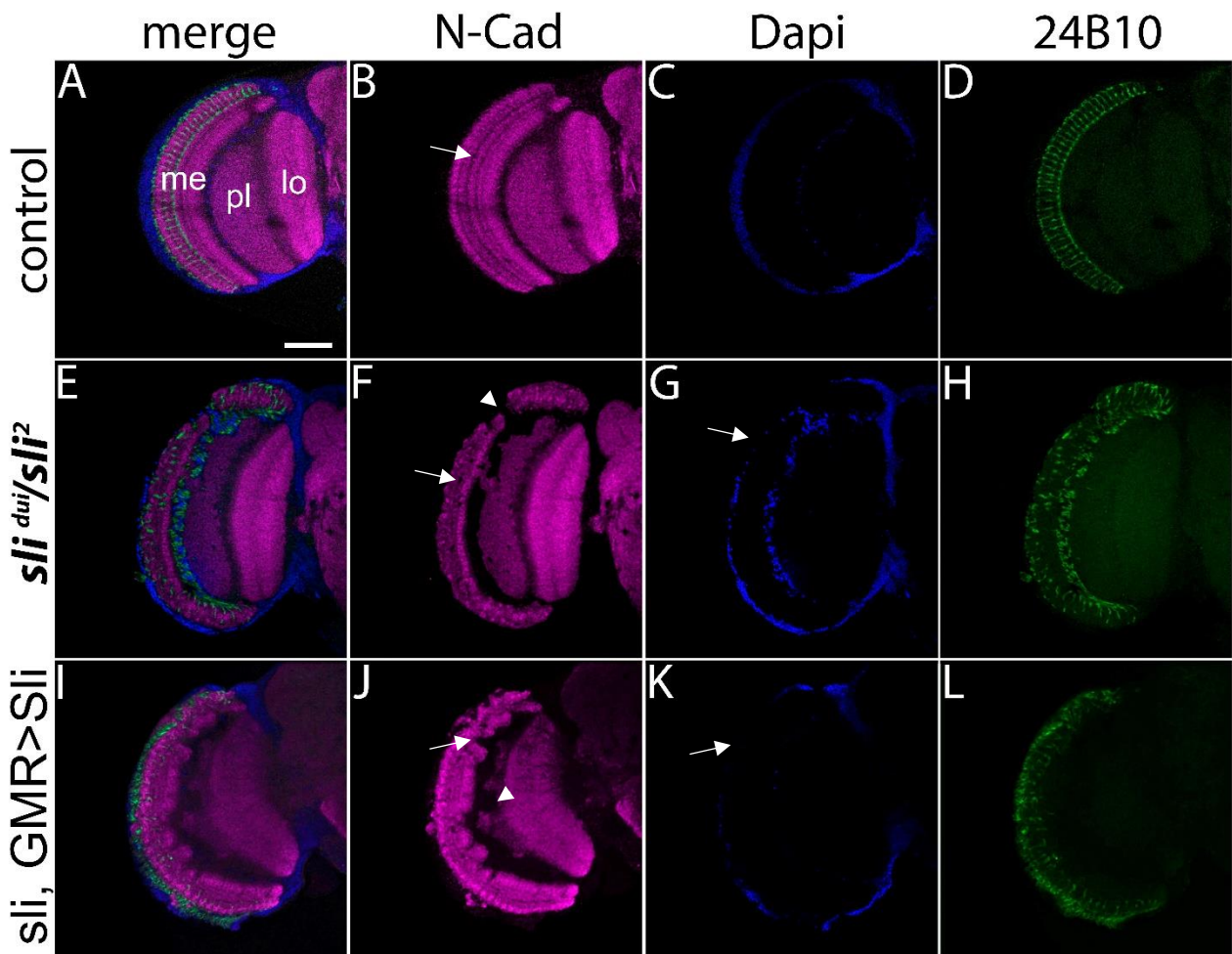


Fig. 7. Reintroducción de Slit en fotorreceptores no rescata el fenotipo mutante del lóbulo óptico

Lóbulos ópticos adultos teñidos con los anticuerpos anti-N-cadherina (N-Cad) que marca estructura general de neuropilas (magenta), anti-caoptina (24B10) que marca axones de fotorreceptores (verde), Dapi marca fluorescente de ADN presente en núcleos neuronales en la corteza del LO (azul), merge: Fusión de las tres marcas anteriores. (A-D) Lóbulo óptico silvestre, muestra formación normal de las neuropilas; (B) LO circular y compartimentalizado, formación de capas en la neuropila de la médula (flecha), (C) corteza continua, (D) axones de fotorreceptores organizados de forma casi paralela. (E-H) Mutante *slit* (heterocigoto *slit^{dual}/slit²*), presentan defectos en el LO; (F) pérdida de la circularidad del lóbulo, muestra una forma más alargada, no presenta formación de capas en la médula (flecha) y existen zonas donde no se ha formado (punta de flecha), (G) corteza discontinua, no se forma en la parte lateral del LO (flecha), (H) los axones de fotorreceptores colapsan y se proyectan aberrantemente. (I-L) No ocurre rescate en fotorreceptores con GMR-Gal4; (J) los bordes de la médula se observan irregulares (flecha) y la placa de la lóbula está casi ausente, sólo se forman pequeñas crestas (punta de flecha), (K) la corteza es discontinua, no se forma en la parte lateral del LO (flecha), (L) los fotorreceptores colapsan. (Vista lateral del LO, me: médula, pl: placa de la lóbula, lo: lóbula). La barra de escala representa 50 μ m.

3.2.3 La reintroducción de Slit en neuronas de la médula rescata el fenotipo del mutante *slit*

El experimento de rescate de fenotipo en las neuronas de la médula se llevó a cabo mediante la cruce de la cepa OK107-Gal4 con la cepa UAS-Slit (en el fondo genético mutante). Se realizaron los dos controles para este experimento, la condición control normal y la condición mutante. En este caso se trata de un control UAS, dado que se tiene solo el componente UAS y no el Gal4, obteniendo el mutante *slit^{dui}/slit²* sin el sistema de rescate. Los resultados indican que la reintroducción de *slit* en las neuronas de la médula logró rescatar el fenotipo de los mutantes *slit* (Fig. 8 I-L). Se observó que en el rescate se obtuvo un fenotipo sorprendentemente similar a la condición silvestre (Fig. 8 A-D), en cuanto a morfología general de las neuropilas (Fig. 8 B y J), circularidad y continuidad de la marca con Dapi (Fig. 8 C y K) y organización y distribución uniforme de los fotorreceptores intervando en la neuropila de la médula. (Fig. 8 D y L).

Estos resultados revelan que esta población tiene una mayor contribución en la secreción de Slit al sistema, comprobándose que Slit secretado por la médula cumple un rol fundamental en la compartimentalización de las neuropilas en el LO de *Drosophila melanogaster*.

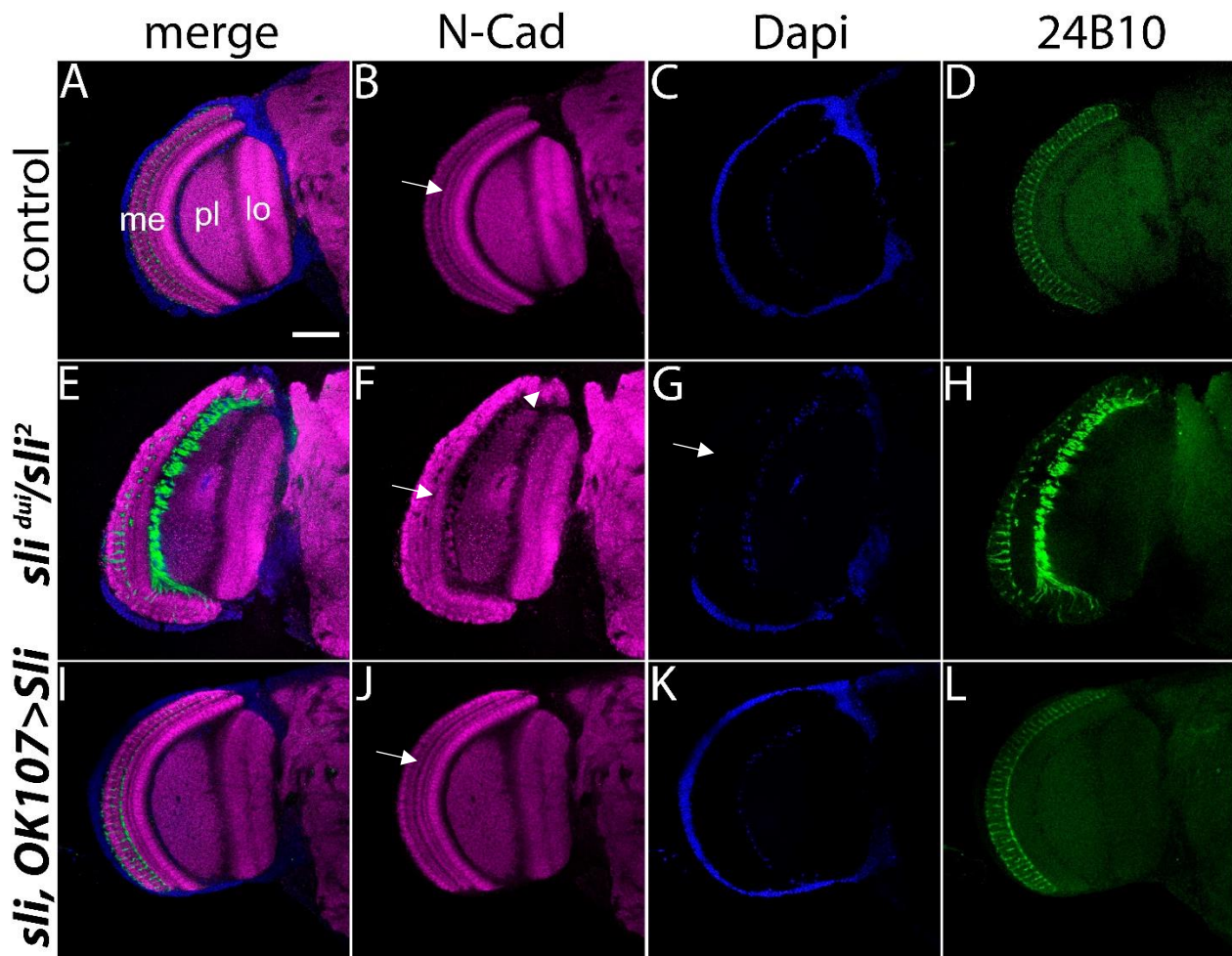


Fig. 8. Reintroducción de Slit en neuronas de la médula rescata el fenotipo mutante del lóbulo óptico

Lóbulos ópticos adultos teñidos con los anticuerpos anti-N-cadherina (N-Cad) que marca estructura general de neuropilas (magenta), anti-caoptina (24B10) que marca axones de fotorreceptores (verde), Dapi marca fluorescente de ADN presente en núcleos neuronales en la corteza del LO (azul), merge: Fusión de las tres marcas anteriores. (A-D) Lóbulo óptico silvestre, muestra formación normal de las neuropilas; (B) LO circular y compartimentalizado, formación de capas en la neuropila de la médula (flecha), (C) corteza continua, (D) axones de fotorreceptores organizados de forma casi paralela. (E-H) Mutante *slit* (heterocigoto *slit^{duj/sli²}*), presentan defectos en el LO; (F) pérdida de la circularidad del lóbulo, muestra una forma más alargada, no presenta formación de capas en la médula (flecha) y existen zonas donde no se ha formado (punta de flecha), (G) la corteza es discontinua, no se forma en la parte lateral del LO (flecha), (H) los axones de fotorreceptores colapsan y se proyectan aberrantemente. (I-L) Rescate total en neuronas de la médula con OK107-Gal4, fenotipo igual al silvestre; (J) se observa un fenotipo circular y compartimentalizado, con formación de capas en la médula (flecha), (K) la corteza es continua, (L) los axones de fotorreceptores se organizan de forma casi paralela. (Vista lateral del LO, me: médula, pl: placa de la lóbula, lo: lóbula). La barra de escala representa 50 μ m.

3.3 La sobreexpresión de *slit* en glías genera defectos en el lóbulo óptico

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que el *knockdown* de *slit* conducía a un fenotipo aberrante usando ARN interferente en neuronas de la médula ey+ (OK107-Gal4). Se observó un cambio dramático en la morfología y los defectos eran similares a los observados en el mutante *slit*. El *knockdown* de *slit* en glías (Repo-Gal4) produjo desorganización de los axones retinales, sin embargo, no afectaba la morfología general del LO, al igual que el *knockdown*

de *slit* en fotorreceptores (GMR-Gal4) que sólo producía ocasionalmente algunos *gaps* en la neuropila de la médula.

Con el objetivo de complementar estos antecedentes previos y nuestros resultados de los experimentos de rescate de cada tipo celular, se decidió realizar experimentos de sobreexpresión de *slit* en glías, fotorreceptores y neuronas de la médula. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de *slit* en neuronas de la médula no conduce a un fenotipo aberrante, y que la sobreexpresión de *slit* en los fotorreceptores sólo indujo una leve desorganización de sus axones. Contrariamente, la sobreexpresión de *slit* en glías condujo a un fenotipo aberrante del LO (Fig. 9 E-H), distinto al control silvestre (Fig. 9 A-D) que incluso fue más aberrante que los fenotipos de los mutantes vistos anteriormente (Fig. 6 E-H; 7 E-H y 8 E-H), el cual podría ser causado por la sobreexpresión sumada a expresión ectópica de Slit.

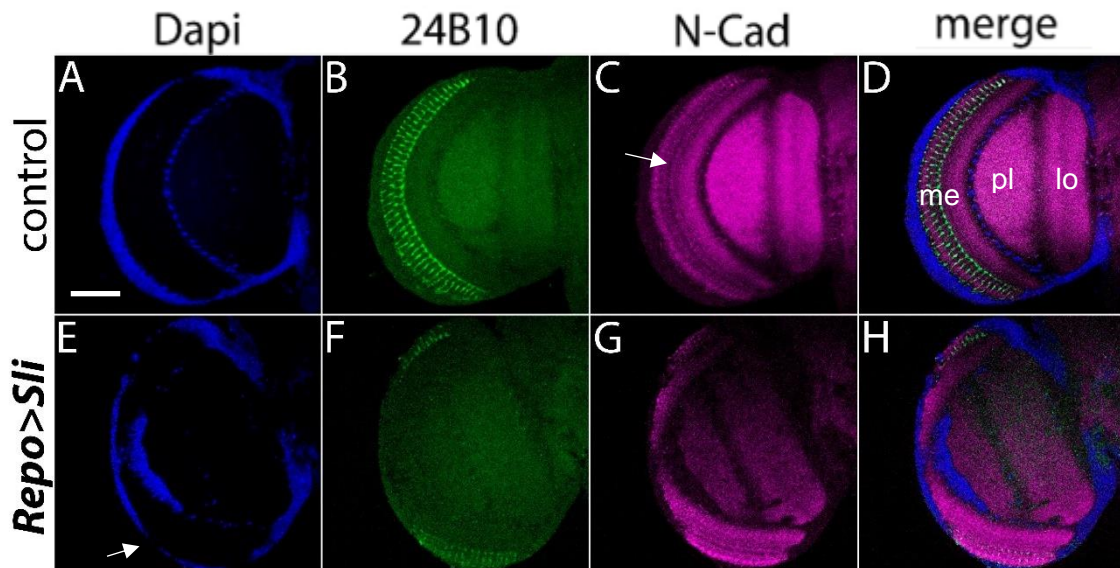


Fig. 9. Sobreexpresión de Slit en glías conduce a un fenotipo defectuoso del lóbulo óptico

Lóbulos ópticos adultos teñidos con los anticuerpos anti-N-cadherina (N-Cad) que marca estructura general de neuropilas (magenta), anti-caoptina (24B10) que marca axones de fotorreceptores (verde), Dapi marca fluorescente de ADN presente en núcleos neuronales en la corteza del LO (azul), merge: Fusión de las tres marcas anteriores. (A-D) Lóbulo óptico silvestre, muestra formación normal de las neuropilas; (A) corteza del LO continua, (B) axones de fotorreceptores organizados de forma casi paralela, (C) LO circular y compartimentalizado, formación de capas en la neuropila de la médula (flecha). (E-H) Sobreexpresión de *slit* con Repo-Gal4, muestra un fenotipo defectuoso en el LO; (E) la corteza es discontinua (flecha), (F) los axones de fotorreceptores se encuentran ordenados, sin embargo, su inervación es interrumpida en la zona lateral del lóbulo donde estos no se observan, (G) existe pérdida de la circularidad del lóbulo, muestra una forma un poco más alargada con gran pérdida de la neuropila de la médula, las neuropilas de la lóbula y la placa de la lóbula también se ven afectadas. (Vista lateral del LO, me: médula, pl: placa de la lóbula, lo: lóbula). La barra de escala representa 50 μ m.

Los genotipos y fenotipos resultantes de cada cruce se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4. Tabla de genotipos y fenotipos de los experimentos de rescate y sobreexpresión

Se indican los genotipos y fenotipos obtenidos para los experimentos de rescate y sobreexpresión, y para los controles mutante y silvestre de cada condición. Se indica el número de muestras con fenotipo silvestre y fenotipo defectuoso obtenidas para cada condición, y el número total de muestras.

Genotipo	N° de Muestras		N° de Muestras Totales
	Fenotipo silvestre	Fenotipo Defectuoso	
Rescate en neuronas de la médula			
$\frac{Sli^{dui}, GMR - GFP}{Sli^2}; \frac{U - Sli}{+}; \frac{OK107}{+}$	10	0	10
$\frac{Sli^{dui}, GMR - GFP}{Sli^{(2)}}; \frac{U - Sli}{+}$	0	10	10
$\frac{cyo}{+}; \frac{OK107}{+}$	10	0	10
Rescate en Glías			
$\frac{Sli^{dui}, GMR - GFP}{Sli^2}; \frac{U - Sli}{Repo - Gal4}$	0	17	17
$\frac{Sli^{dui}, GMR - GFP}{Sli^2}; \frac{Repo - Gal4}{+}$	0	21	21
$\frac{Repo - Gal4}{+}$	20	0	20
Rescate en Fotorreceptores			
$\frac{Sli^{dui}, GMR - GFP}{Sli^2}; \frac{U - Sli}{L - GMR - Gal4}$	0	15	15
$\frac{Sli^{dui}, GMR - GFP}{Sli^2}; \frac{L - GMR - Gal4}{+}$	0	17	17
$\frac{cyo}{+}; \frac{L - GMR - Gal4}{+}$	13	0	13
Sobreexpresión con Repo-Gal4			
$\frac{Repo - Gal4}{U - Sli}$	0	11	11
$\frac{Repo - Gal4}{+}$	12	0	12

3.4 El fenotipo del mutante *slit* no se rescata con Slit-TM

Existe conocimiento de que algunas proteínas de señalización similares a Slit como, por ejemplo, las netrinas, pueden ejercer un rol local o a corta distancia, permaneciendo asociadas a la célula que las produce (Brankatschk y Dickson, 2006), o bien extenderse desde su sitio de síntesis formando un gradiente de largo alcance, activando su blanco a distancia. Los gradientes de proteínas atrayentes o repelentes han sido propuestos para guiar a axones en crecimiento durante el desarrollo del sistema nervioso (Tessier-Lavigne, 1992). Sin embargo, el requerimiento de Slit de difundir y expandirse para cumplir su función nunca se ha probado directamente, por lo que nos propusimos analizar el rol local de Slit utilizando una versión de esta proteína con un segmento transmembrana en su extremo N-terminal, que la mantendría unida a la membrana celular de las neuronas de la médula.

La cruce de la cepa UAS-Slit-TM con la cepa OK107-Gal4 (en fondo genético mutante) fue llevada a cabo junto a sus respectivos controles. En los ensayos se incluyó un control silvestre, un control mutante, que contenía solo el componente Gal-4 en un fondo genético mutante (*slit^{dui}/slit²*) sin UAS-Slit, y un control del rescate de fenotipo mutante en neuronas de la médula, mediante la cruce de UAS-Slit (Slit silvestre) con OK107-Gal4.

Los resultados muestran que la introducción de Slit-TM en las neuronas de la médula no rescató el fenotipo mutante Slit (Fig. 10 M-P). El fenotipo obtenido fue similar a la condición mutante (Fig. 10 E-H), con una estructura lobular más alargada (Fig. 10 N) y con la neuropila de la médula afectada. Además, la marca de Dapi mostró que los núcleos neuronales no se encuentran presentes en la parte central de la médula distal, por lo que la corteza del LO se observó

discontinua (Fig. 10 O), y la trayectoria axonal fotorreceptora fue defectuosa (Fig. 10 P). Estos datos nos sugieren que la versión de Slit unida a membrana no es activa y no permite la formación normal del LO de *Drosophila*. Al parecer Slit actuaría a distancia de su fuente principal para guiar a los axones en crecimiento y regular la migración celular durante el desarrollo del LO, por lo que la existencia hipotética de gradientes de la proteína Slit aún debe ser evaluada.

3.5 El fenotipo del mutante *slit* se rescata con Slit-UC

El procesamiento proteolítico es un mecanismo de regulación fisiológica común y efectivo. Estudios anteriores muestran que el procesamiento proteolítico de Semaforinas secretadas como SemD, llevado a cabo por proteasas de tipo furin-proteasa regula la actividad quimiorrepulsiva de esta señal neuronal. Los datos experimentales sugieren que el procesamiento proteolítico diferencial determina la potencia repulsiva de las semaforinas secretadas, implicando a la proteólisis como un mecanismo regulatorio importante en la búsqueda de trayectorias axonales (Adams *et al.*, 1997).

En este trabajo se decidió evaluar la importancia de la escisión de Slit, con el objetivo de determinar si este procesamiento proteolítico es requerido para su función en la compartimentalización del LO de *Drosophila*. Para ello, se realizaron experimentos en los que se introdujo la expresión de una versión de Slit no procesada proteolíticamente (Slit-UC), específicamente en las neuronas de la médula con OK107-Gal4. La versión Slit-UC se generó por delección del sitio de corte en Slit, el cual se encuentra entre los dominios similares al Factor de crecimiento epidermal (EGF) presentes en Slit (quinto y sexto).

La cepa UAS-Slit-UC se cruzó con la cepa OK107-Gal4 (en fondo genético mutante). Este experimento se realizó junto al control silvestre, al control mutante que contenía sólo el componente Gal-4 en un fondo genético mutante (*slit^{duj}/slit²*) sin UAS-Slit, y al control del rescate de fenotipo mutante en neuronas de la médula, mediante la cruce de UAS-Slit (Slit silvestre) con OK107-Gal4.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de la versión de Slit-UC que se reintrodujo específicamente en neuronas de la médula logra rescatar el fenotipo del mutante Slit (Fig. 10 Q-T) observándose un fenotipo muy similar al de la condición silvestre (Fig. 10 A-D). Observamos que la estructura compartimentalizada del LO se mantiene, aunque se observan pequeños surcos en el borde distal (Fig. 10 R) de la neuropila de la médula. El LO posee circularidad y clara compartimentalización (Fig. 10 R), continuidad en la corteza marcada con Dapi (Fig. 10 S) y organización axonal de los fotorreceptores. (Fig. 10 T). No se observaron grandes diferencias respecto al rescate obtenido con la versión de Slit silvestre (Fig. 10 I-L); es decir, independientemente de su procesamiento proteolítico, Slit-UC rescata el fenotipo mutante al introducir su expresión en neuronas de la médula. De estos resultados concluimos que el procesamiento proteolítico de Slit es dispensable para la función que ejerce esta proteína en la compartimentalización del LO de *Drosophila*.

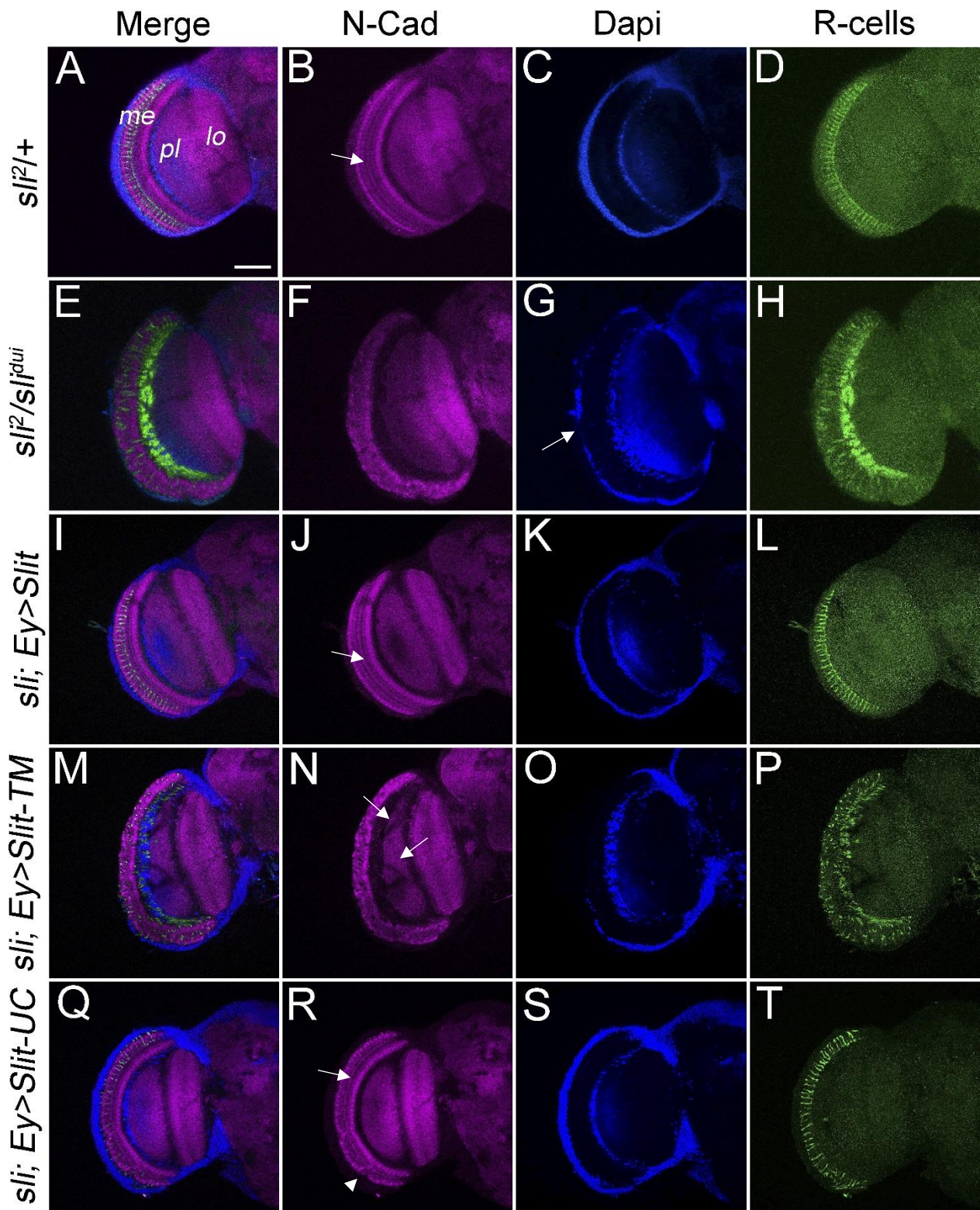


Fig. 10. Reintroducción de Slit-UC en neuronas de la médula rescata el fenotipo mutante del lóbulo óptico

Lóbulos ópticos adultos teñidos con los anticuerpos anti-N-cadherina (N-Cad) que marca estructura general de neuropilas (magenta), anti-caoptina (24B10) que marca axones de fotorreceptores (verde), Dapi marca fluorescente de ADN presente en núcleos neuronales en la corteza del LO (azul), merge: Fusión de las tres marcas anteriores. (A-D) Lóbulo óptico silvestre, muestra formación normal de las neuropilas; (B) LO circular y compartimentalizado, formación de capas en la neuropila de la médula (flecha), (C) corteza continua, (D) axones de fotorreceptores organizados de forma casi paralela. (E-H) Mutante *slit* (heterocigoto *slit^{d^{ui}}/slit²*), presentan defectos en el LO; (F) pérdida de la circularidad del lóbulo, muestra una forma alargada, no presenta formación de capas en la médula, (G) la corteza es discontinua, no se forma en la parte lateral del LO (flecha), (H) los axones de fotorreceptores colapsan y se proyectan aberrantemente. (I-L) Rescate total en neuronas de la médula con OK107-Gal4, fenotipo igual al silvestre; (J) se observa un fenotipo circular y compartimentalizado, con formación de capas en la médula (flecha), (K) la corteza es continua, (L) los axones de fotorreceptores se organizan de forma casi paralela. (Vista lateral del LO, me: médula, pl: placa de la lóbula, lo: lóbula). La barra de escala representa 50 μ m. (M-P) Introducción de Slit-TM en las neuronas de la médula con OK107-Gal4, no rescata el fenotipo del mutante *slit*. El fenotipo obtenido posee las mismas características que el fenotipo del mutante *slit*, (N) aunque muestra que la formación de la neuropila de la placa de la lóbula se encuentra más afectada en algunas zonas (flechas). (Q-T) Introducción de Slit-UC en las neuronas de la médula con OK107-Gal4, rescata totalmente el fenotipo del mutante *slit*. El fenotipo obtenido posee las mismas características que el fenotipo silvestre. (R) Existe formación de capas (flecha), notar que se observan pequeñas invaginaciones en el borde distal de la médula (punta de flecha). (Vista lateral del LO, me: médula, pl: placa de la lóbula, lo: lóbula). La barra de escala representa 50 μ m.

Los genotipos y fenotipos resultantes de cada cruce se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5):

Tabla 5. Tabla de genotipos y fenotipos de los experimentos con Slit-TM y Slit-UC

Se indican los genotipos y fenotipos obtenidos para los experimentos de rescate con Slit-TM y Slit-UC, y para el control con Slit silvestre, control mutante y control silvestre. Se indica el número de muestras con fenotipo silvestre y fenotipo defectuoso obtenidas para cada condición, y el número total de muestras.

Genotipo	N° de Muestras		N° de Muestras Totales
	Fenotipo silvestre	Fenotipo Defectuoso	
Rescate Slit-UC y Slit-TM			
$\frac{Slit^{dui}, GMR - GFP}{Slit^2}; \frac{Slit - TM}{+}; \frac{OK107}{+}$	0	11	11
$\frac{Slit^{dui}, GMR - GFP}{Slit^2}; \frac{Slit - UC}{+}; \frac{OK107}{+}$	10	0	10
$\frac{Slit^{dui}, GMR - GFP}{Slit^2}; \frac{U - Slit}{+}; \frac{OK107}{+}$	6	0	6
$\frac{Slit^{dui}, GMR - GFP}{Slit^2}; \frac{OK107}{+}$	0	11	11
$\frac{Slit^2}{+}; \frac{OK107}{+}$	11	0	11

4. DISCUSIÓN

El sistema visual de *Drosophila* es una poderosa herramienta para explorar la conexión entre desarrollo y función en un circuito neural, donde podemos investigar los mecanismos y determinantes claves en la búsqueda de una comprensión de la formación del sistema nervioso.

La función de la vía de señalización Slit/Robo en el LO de *Drosophila* ha sido poco estudiada, pero se ha demostrado que esta vía está involucrada en el establecimiento de límites durante el desarrollo del LO (Tayler *et al.*, 2004). Nuestros resultados muestran que la pérdida de función de *slit* conduce a la pérdida de los límites definidos entre neuropilas del LO, con mutantes *slit* mostrando una intercalación de poblaciones celulares adyacentes en estadios tempranos del desarrollo.

Los defectos provocados por la ausencia de esta proteína se observan durante todo el desarrollo. En el tercer estadio de larva de un animal silvestre, se visualiza una clara segregación de los neuroblastos del IPC con la región precursora de la lámina, mientras que en los mutantes Slit estas poblaciones celulares adyacentes se entremezclan. Esto conlleva a que en estadio adulto estos mutantes presenten defectos en la organización de las neuropilas.

Slit se expresa en tres poblaciones celulares que contribuyen al ensamblaje del LO, correspondientes a células gliales de la lámina, neuronas de la médula y de la retina (Tayler *et al.*, 2004). Se ha propuesto y es aceptado que las células gliales son la fuente principal de esta proteína debido a la posición que ocupan en el borde entre la lámina y la médula (Chotard y Salecker, 2007; Fischbach y Hiesinger, 2008). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que Slit es secretada principalmente por las neuronas de la médula, las que ocupan

regiones cercanas a las células gliales de la lámina. Estos resultados son coherentes con datos previos de nuestro laboratorio que sugerían que la población de las neuronas de la médula era buena candidata para proveer al sistema de Slit, puesto que análisis anatómicos de las proyecciones de esta subpoblación mostraban que las neuritas de estas neuronas se posicionaban en las zonas donde se generaban los límites y que además algunas de estas neuronas (ey+) colocalizaban con la marca de Slit.

Otros resultados previos que apoyan lo observado en este trabajo, son los obtenidos en experimentos de *knockdown* de *slit*, específico para cada una de las poblaciones de glías, fotorreceptores y neuronas de la médula usando el sistema Gal4-UAS. El *knockdown* de *slit* en neuronas de la médula (ey+) usando ARN de interferencia provoca un fenotipo defectuoso del LO similar al mutante *slit*, mientras que el *knockdown* de *slit* en glías y fotorreceptores, no afecta la morfología general del LO.

Los resultados de los experimentos de sobreexpresión de *slit* en glías mostraron un fenotipo defectuoso. Creemos que la reintroducción de *slit* en glías ocasionó un fenotipo más aberrante que el mutante *slit* debido a la condición de sobreexpresión sumada a una expresión ectópica de esta proteína. Slit se expresaría en las glías en niveles más bajos que el nivel de expresión logrado con el sistema Gal4-UAS. En consecuencia, la mayor presencia de esta proteína además de su expresión ectópica en otras poblaciones de glías, conducirían a un fenotipo defectuoso por sobreexpresión. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la fuente principal de la proteína Slit son las neuronas de la médula y no las glías.

Por otro lado, decidimos estudiar la función del procesamiento proteolítico y analizar el rol local de la proteína Slit en el contexto de guía axonal para el desarrollo del LO.

El rol de la proteólisis de esta proteína ha sido estudiado en cuanto a su función en la dirección y detención de la migración del músculo. Se demostró que este procesamiento restringía su distribución en las células del tendón, las cuales la secretan, permitiendo que funcione como un repelente de corto alcance para las células musculares. En este mismo estudio se mostró que el fragmento C-terminal, resultante del corte enzimático, era rápidamente degradado y que el polipéptido N-terminal estable se unía a la membrana de la célula del tendón. De esta manera se evitaba su degradación y se restringía su distribución, consistente con una señalización de Slit a corto alcance por estas células. Estos resultados dan luces de que el mecanismo de regulación dependiente de proteólisis es importante en este contexto (Ordan *et al.*, 2015).

Estudios anteriores, basados en cultivos de ganglios de la raíz dorsal de rata y neuronas del bulbo olfatorio, ya sugerían la importancia de este corte proteolítico, al demostrar que N-Slit estimulaba la ramificación axonal, mientras que la versión completa de Slit inhibía esta actividad (Ba-Charvet *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios en el SNC de *Drosophila* demostraron que una versión de Slit no procesada proteolíticamente rescataba el fenotipo de guía de la línea media de mutantes *slit* tan eficientemente como la proteína silvestre. Esto sugirió que la escisión no es esencial para su rol en la repulsión en la línea media (Coleman *et al.*, 2010); por lo tanto, la relevancia funcional de este procesamiento no está clara aún.

Nuestros resultados mostraron que Slit-UC rescata el fenotipo aberrante de mutantes *slit* cuando se expresa específicamente en las neuronas de la médula, al igual que la proteína silvestre, y que ambos rescates muestran un fenotipo del LO muy similar a la mosca silvestre. Por lo que podemos concluir que el procesamiento proteolítico de Slit no es requerido para la función que esta ejerce en la morfogénesis del LO de *Drosophila melanogaster*.

En cuanto al análisis del rol de Slit a corta distancia, pudimos demostrar que la versión de Slit-TM no rescata el fenotipo aberrante de mutantes *slit* cuando se expresa específicamente en las neuronas de la médula. Esto indica que la guía de señalización Slit, funciona de manera diferente a lo observado en otras moléculas guía, como es el caso de las netrinas.

Estudios han propuesto un mecanismo diferente para las netrinas. Experimentos llevados a cabo en el cordón nervioso ventral de embriones de *D. melanogaster*, en los cuales los animales transgénicos que expresaban una isoforma de netrina anclada a la membrana, en un fondo genético mutante, mostraron formación casi normal de las comisuras. Esto representó una fuerte evidencia de que las netrinas son señales locales para los axones comisurales y no quimioatrayentes de largo alcance. (Brankatschk y Dickson, 2006).

Sin embargo, otros trabajos se contraponen a esta hipótesis, sugiriendo la existencia de gradientes de la proteína netrina que sostienen la operación de mecanismos quimiotrópicos de largo alcance en el desarrollo del SNC (Kennedy *et al.*, 2006).

Nuestros resultados mostraron que la versión de Slit unida a membrana no es efectiva en restaurar la formación normal del LO de *Drosophila*, favoreciendo un modelo en el cual Slit ejercería un rol de largo alcance. Creemos que

probablemente Slit-TM no rescata el fenotipo debido a su retención en la membrana plasmática, lo que impediría la señalización Slit/Robo normal. La probabilidad de que Slit forme gradientes actuando a largo alcance no se descarta y podría ser estudiada en futuros experimentos.

Los resultados de este trabajo indican que nuestra hipótesis se cumple en cuanto a que la proteína Slit en el LO de *Drosophila*, sería secretada principalmente por las neuronas de la médula, lo cual da luces de un rol activo de las neuronas en desarrollo en la formación del patrón de conexiones correcto del cerebro. También se cumple que la función de Slit en la guía de los axones en desarrollo del LO no estaría influenciada por su procesamiento proteolítico, quedando la pregunta abierta de cuál es entonces la significancia biológica del procesamiento de Slit, si es que la hay, en este contexto. La hipótesis de que Slit ejerce un rol a nivel local mediante contacto célula-célula no se cumple. Los resultados sugieren que Slit requeriría ser secretada al espacio extracelular para unirse libremente a su receptor Robo y cumplir su función, un rol a distancia de su fuente de secreción.

Existen muchos mecanismos que dirigen trayectorias axonales específicas y mantienen un balance en el proceso de formación del SNC. Este trabajo es una contribución a entender de mejor manera como estos operan, es un estudio base de cómo se lleva a cabo la correcta formación del cerebro en *Drosophila*. En un futuro este mismo trabajo puede llevarse a cabo en modelos de estudio más complejos e incluso investigar como funcionan en humanos para comprender las patologías asociadas a la falla en estos procesos y buscar soluciones. Los mecanismos de morfogénesis neuronal, como la vía de señalización Slit/Robo, aún requieren ser profundamente estudiados.

5. CONCLUSIONES

- 1) Slit influye en el establecimiento de límites entre compartimentos durante el desarrollo del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster*.
- 2) La expresión de Slit por parte de las células gliales y fotorreceptores no contribuye de manera importante al fenotipo morfológico compartimentalizado del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster*.
- 3) Slit es requerida principalmente en las neuronas de la médula para un correcto desarrollo del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster*.
- 4) Slit actuaría a distancia de su fuente principal para guiar a los axones en crecimiento y regular la migración celular durante el desarrollo del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster*.
- 5) El procesamiento proteolítico de Slit es dispensable para su función en la compartimentalización del lóbulo óptico de *Drosophila*.

5. REFERENCIAS

- Adams, R. H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H., & Püschel, A. W.** (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *The EMBO Journal*, 16(20), 6077-6086.
- Alexandre, C., Baena-Lopez, A., & Vincent, J. P.** (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature*, 505(7482), 180-185.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ba-Charvet, K. T. N., Brose, K., Ma, L., Wang, K. H., Marillat, V., Sotelo, C., ... & Chédotal, A.** (2001). Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *Journal of Neuroscience*, 21(12), 4281-4289.
- Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. and Goodman, C. S.** (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the Roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.
- Brand, A. H., & Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401-415.
- Brankatschk, M., & Dickson, B. J.** (2006). Netrins guide Drosophila commissural axons at short range. *Nature Neuroscience*, 9(2), 188-194.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., ... & Kidd, T.** (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, 96(6), 795-806.
- Brose, K., & Tessier-Lavigne, M.** (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(1), 95-102.
- Chotard, C., & Salecker, I.** (2007). Glial cell development and function in the Drosophila visual system. *Neuron Glia Biology*, 3(1), 17-25.
- Colamarino, S. A., & Tessier-Lavigne, M.** (1995). The role of the floor plate in axon guidance. *Annual Review of Neuroscience*, 18(1), 497-529.
- Coleman, H. A., Labrador, J. P., Chance, R. K., & Bashaw, G. J.** (2010). The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development*, 137(14), 2417-2426.
- Dickson, B. J., & Gilestro, G. F.** (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.*, 22, 651-675.
- Duguay, D., Foty, R. A., & Steinberg, M. S.** (2003). Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Developmental Biology*, 253(2), 309-323.

- Englund, C., Steneberg, P., Falileeva, L., Xylourgidis, N., & Samakovlis, C.** (2002). Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the *Drosophila* trachea. *Development*, 129(21), 4941-4951.
- Fischbach, K. F., & Hiesinger, P. R.** (2008). Optic lobe development. In *Brain Development in Drosophila melanogaster* (pp. 115-136). Springer New York.
- Greenspan, R. J.** (2004). Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics.
- Hadjieconomou, D., Timofeev, K., & Salecker, I.** (2011). A step-by-step guide to visual circuit assembly in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(1), 76-84.
- Jagdish, S., Barnea, G., Clandinin, T. R., & Axel, R.** (2014). Identifying functional connections of the inner photoreceptors in *Drosophila* using Tango-Trace. *Neuron*, 83(3), 630-644.
- Jen, J. C., Chan, W. M., Bosley, T. M., Wan, J., Carr, J. R., Rüb, U., ... & Lin, D. D.** (2004). Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science*, 304(5676), 1509-1513.
- Kennedy, T. E., Wang, H., Marshall, W., & Tessier-Lavigne, M.** (2006). Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 26(34), 8866-8874.
- Kidd, T., Bland, K. S., & Goodman, C. S.** (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell*, 96(6), 785-794.
- Kiecker, C., & Lumsden, A.** (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(7), 553-564.
- Kramer, S. G., Kidd, T., Simpson, J. H., & Goodman, C. S.** (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science*, 292(5517), 737-740.
- Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D. M., ... & Tessier-Lavigne, M.** (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron*, 42(2), 213-223.
- Morante, J., & Desplan, C.** (2008). The color-vision circuit in the medulla of *Drosophila*. *Current Biology*, 18(8), 553-565.
- Ordan, E., Brankatschk, M., Dickson, B., Schnorrer, F., & Volk, T.** (2015). Slit cleavage is essential for producing an active, stable, non-diffusible short-range signal that guides muscle migration. *Development*, 142(8), 1431-1436.
- Pasini, A., & Wilkinson, D. G.** (2002). Stabilizing the regionalisation of the developing vertebrate central nervous system. *Bioessays*, 24(5), 427-438.
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S.** (1999). Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science*, 283(5398), 91-94.

- Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J., & Dickson, B. J.** (2000a). Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron*, 28(3), 767-777.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E., & Dickson, B. J.** (2000b). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the Drosophila CNS. *Cell*, 103(7), 1033-1045.
- Rein, K., Zöckler, M., Mader, M. T., Grübel, C., & Heisenberg, M.** (2002). The Drosophila standard brain. *Current Biology*, 12(3), 227-231.
- Roote, J., & Prokop, A.** (2013). How to design a genetic mating scheme: a basic training package for Drosophila genetics. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(2), 353-358.
- Sanes, J. R., & Zipursky, S. L.** (2010). Design principles of insect and vertebrate visual systems. *Neuron*, 66(1), 15-36.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D., & Goodman, C. S.** (2000b). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell*, 103(7), 1019-1032.
- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S., & Goodman, C. S.** (2000a). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron*, 28(3), 753-766.
- Stein, E. and Tessier-Lavigne, M.** (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: Silencing of Netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928-1938.
- St Johnston, D.** (2002). The art and design of genetic screens: Drosophila melanogaster. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 176-188.
- Tayler, T. D., Robichaux, M. B., & Garrity, P. A.** (2004). Compartmentalization of visual centers in the Drosophila brain requires Slit and Robo proteins. *Development*, 131(23), 5935-5945.
- Tessier-Lavigne, M.** (1992). Axon guidance by molecular gradients. *Current Opinion in Neurobiology*, 2(1), 60-65.
- Wong, K., Park, H. T., Wu, J. Y., & Rao, Y.** (2002). Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(5), 583-591.
- Wong, K., Ren, X.-R., Huang, Y.-Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L. et al.** (2001). Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221.
- Wu, J. S., & Luo, L.** (2006). A protocol for dissecting Drosophila melanogaster brains for live imaging or immunostaining. *Nature Protocols*, 1(4), 2110-2115.